

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.406>

<https://orcid.org/0000-0001-5289-5617>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Tatjana Kirtiklienė

Patogeninių mikroorganizmų  
virulentiškų kamienų charakteristikų ir  
plitimo dinamikos tyrimai molekulinės  
epidemiologijos aspektu

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biologija (N 010)

VILNIUS 2022

Disertacija rengta 2017–2021 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute, Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedroje. Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (doktorantūra buvo finansuojama ES struktūrinių fondų lėšomis, Nr. KD-17072).

**Mokslinė vadovė** – prof. dr. Nomedą Kuisienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Gynimo taryba:

**Pirmininkas** – prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

**Nariai:**

dr. Renata Gudiukaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

prof. dr. Denis E. Kainov (Klinikinės ir molekulinės medicinos departamentas, Norvegijos mokslo ir technologijų universitetas, Norvegija, gamtos mokslai, biologija – N 010),

prof. dr. Modestas Ružauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, žemės ūkio mokslai, veterinarija – A 002),

Dr. Vesta Skrodenytė-Arbačiauskienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – N 012).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2022 m. gruodžio mėn. 15 d. 11 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R 401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius, Lietuva, tel. +370 5 223 4419; el. paštas: info@gmc.vu.lt

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.406>

<https://orcid.org/0000-0001-5289-5617>

VILNIUS UNIVERSITY

Tatjana Kirtiklienė

# Investigation of characteristics and transmission of the virulent strains of pathogenic microorganisms in the view of molecular epidemiology

**DOCTORAL DISSERTATION**

Natural Sciences,  
Biology (N 010)

VILNIUS 2022

The dissertation was prepared between 2017 and 2021 at Vilnius University, Life Science Center, Institute of Bioscience, Department of Microbiology and Biotechnology. The research was supported by Research Council of Lithuania.

**Academic supervisor –**

Prof. Dr. Nomedė Kuisienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman** – Prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Magnus University, Natural Sciences, Biology – N 010).

**Members:**

Dr. Renata Gudiukaitė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

Prof. Dr. Denis E. Kainov (Department of Clinical and Molecular Medicine (IKOM), Norwegian University of Science and Technology, Norway, Natural Sciences, Biology – N 010),

Prof. Dr. Modestas Ružauskas (Lithuanian University of Health Sciences, Agricultural Sciences, Veterinary – A 002),

Dr. Vesta Skrodenytė-Arbačiauskienė (Nature Research Center, Natural Sciences, Ecology and Environmental Studies – N 012).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 11 (hour)/ on 15th of December 2022 in Room R 401 of the Life Science Center (Vilnius University).

Address: 7 Saulėtekio Ave, LT- 10257 Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 223 4419; e-mail: info@gmc.vu.lt

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

## SANTRUMPOS

<b>APEC</b>	Paukščių patogeninės <i>E. coli</i> bakterijos (ang. <i>Avian Pathogenic Escherichia coli</i> )
<b>CRISPR</b>	Taisyklingai pertraukti trumpi susitelkę palindrominiai pasikartojimai (ang. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> )
<b>DAA</b>	Daugiavaistis atsparumas antibiotikams
<b>ECDC</b>	Europos ligų kontrolės ir prevencijos centras (ang. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
<b>EDTA</b>	Etilen-diamino-tetra-acto rūgštis
<b>ESBL</b>	Plataus veikimo spektro $\beta$ -laktamazės (ang. <i>Extended-Spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i> )
<b>EUCAST</b>	Europos jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tyrimų komitetas (ang. <i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> )
<b>ExPEC</b>	Nežarnybinė patogeninė <i>E. coli</i> bakterija (ang. <i>Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli</i> )
<b>HI</b>	Hospitalinė infekcija
<b>IS</b>	Insercinė seka
<b>LPS</b>	Lipopolisacharidas
<b>MALDI-TOF MS</b>	Matricos jonizacijos masių spektrometras (ang. <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i> )
<b>MIC</b>	Mažiausia slopinanti koncentracija (ang. <i>Minimal inhibitory concentration</i> )
<b>MLVA</b>	Daugybinių lokusų VNTR analizė (ang. <i>Multiple loci VNTR analysis</i> )
<b>MRSA</b>	Meticilinui atspari <i>Staphylococcus aureus</i> bakterija (ang. <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> )
<b>MST</b>	Minimaliai apimantis medis (ang. <i>Minimum spanning tree</i> )
<b>NMEC</b>	Naujagimių meningito <i>E. coli</i> bakterija (ang. <i>Neonatal Meningitis Escherichia coli</i> )

<b>NVSPL</b>	Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija
<b>OmpA</b>	Išorinės membranos baltymas A
<b>Rep-PGR</b>	Pasikartojančių sekų polimerazės grandininė reakcija (ang. <i>Repetitive element sequence based-polymerase chain reaction</i> ).
<b>ROS</b>	Reaktyvios deguonies formos (ang. <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>SEPEC</b>	Septicemijos <i>E. coli</i> bakterija (ang. <i>Human sepsis-associated Escherichia coli</i> )
<b>STEC</b>	Šiga toksiną produkuojanti <i>E. coli</i> bakterija (ang. <i>Shiga toxin-producing E. coli</i> )
<b>T2SS</b>	II tipo sekrecijos sistema
<b>T6SS</b>	VI tipo sekrecijos sistema
<b>UPEC</b>	Uropatogeninė <i>E. coli</i> (ang. <i>Uropathogenic Escherichia coli</i> )
<b>UPGMA</b>	Nesvertos poros grupavimo metodas su aritmetiniu reikšmės vidurkiu (ang. <i>unweighted-pair group method with the arithmetic mean</i> )
<b>VISA</b>	Vankomicinui vidutiniškai atspari <i>S. aureus</i> bakterija (ang. <i>Vancomycin-intermediate S. aureus</i> )
<b>VNTR</b>	Kintamo skaičiaus tandeminiai pasikartojimai (ang. <i>variable-number tandem repeat</i> )
<b>VRE</b>	Vankomicinui atspari <i>Enterococcus</i> spp. bakterija (ang. <i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i> )
<b>VRSA</b>	Vankomicinui atspari <i>S. aureus</i> bakterija (ang. <i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> )

# TURINYS

ĮVADAS .....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	14
1.1. Hospitalinės bakterijų sukeltos infekcijos ir jų paplitimas .....	14
1.1.1. <i>Acinetobacter</i> spp. klinikinė reikšmė ir genominės charakteristikos .....	16
1.1.2. <i>E. coli</i> klinikinė reikšmė bei genominės charakteristikos .....	18
1.2. Virulentiškumo faktorių įtaka hospitalinių infekcijų plitime.....	19
1.2.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> virulentiškumo faktoriai ir jų įtaka patogenezei ..	19
1.2.2. <i>E. coli</i> virulentiškumo faktoriai ir jų įtaka patogenezei .....	26
1.3. Gramneigiamų bakterijų sukeltų infekcijų gydymui naudojami antibiotikai ir atsirandantys atsparumo mechanizmai .....	32
1.3.1. <i>A. baumannii</i> atsparumo antibiotikams mechanizmai .....	35
1.3.2. <i>E. coli</i> atsparumo antibiotikams mechanizmai.....	39
2. MEDŽIAGOS IR METODAI .....	43
2.1. Medžiagos.....	43
2.1.1. Reagentai .....	43
2.1.2. Bakterijų izoliatai.....	43
2.1.3. Oligonukleotidų pradmenys.....	44
2.2. Metodai.....	51
2.2.1. Izoliatų kultivavimas ir identifikavimas .....	51
2.2.2. Izoliatų genominės DNR išskyrimas .....	52
2.2.3. Atsparumo genų charakterizavimas .....	53
2.2.4. Virulentiškumo genų nustatymas.....	53
2.2.5. Izoliatų genotipavimas.....	54
2.2.6. Filogenetinių grupių nustatymas.....	54
2.2.7. Duomenų analizė ir vizualizavimas .....	55
3. REZULTATAI .....	56
3.1. <i>Acinetobacter</i> spp. antibiotikams atsparių izoliatų analizė .....	56
3.1.1. <i>Acinetobacter</i> spp. izoliatų atsparumo genų charakterizavimas .....	57
3.1.2. <i>Acinetobacter</i> spp. rep-PGR genotipavimo analizė .....	66
3.1.3. <i>Acinetobacter</i> spp. MLVA genotipavimo analizė.....	69

3.2. <i>E. coli</i> antibiotikams atsparių izoliatų analizė .....	78
3.2.1. <i>E. coli</i> atsparumo genų identifikavimas ir charakterizavimas.....	79
3.2.2. <i>E. coli</i> virulentiškumo genų identifikavimas .....	84
3.2.3. <i>E. coli</i> izoliatų filogenetinių grupių nustatymas .....	86
3.2.4. <i>E. coli</i> rep-PGR genotipavimo rezultatai .....	90
3.2.5. <i>E. coli</i> MLVA genotipavimo rezultatai.....	93
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	104
IŠVADOS .....	117
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	119
PRIEDAI.....	152
SUMMARY .....	170
PADĖKA .....	219
PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA .....	220



## ĮVADAS

Antibiotikų vartojimas klinikiniais tikslais, žemės ūkyje ir kitose žmogaus ūkinės veiklos srityse trunka jau kelis dešimtmečius. Toks didelis ir platus antibiotikų vartojimas lėmė tai, kad klinikinėje ir kitoje aplinkoje išsivystė ir paplito bakterijos, pasižyminčios atsparumu antimikrobiniais preparatams. Tarp jų plačiai paplitusios gramneigiamos bakterijos – klinikinės reikšmės infekcijų sukėlėjų grupė, kurioje pastaraisiais metais stebima sparti atsparumo antibiotikams mechanizmų evoliucija ir atsparių kamienų plitimas, tuo tarpu gramteigiamų bakterijų atsparumo antibiotikams tendencija mažėja (ECDC 2020). Tarp šios grupės bakterijų Lietuvoje bei Europoje didžiausią pavojų ligoninėse kelia *Acinetobacter* genties bakterijos bei *Escherichia coli*.

*Acinetobacter* spp. yra oportunistinis patogenas, paplitęs visame pasaulyje. Šiais laikais padaugėjo hospitalinių infekcijų, sukeltų *Acinetobacter* spp. kamienų, kurie yra pavojingi ligoninėse dėl savo sugebėjimo greitai įgauti atsparumą antibiotikams (Poirel et al., 2011) bei greito infekcijos plitimo pacientams su silpna imunine sistema, chroninėmis plaučių ligomis, diabetu arba pacientams, kuriems ligoninėse yra naudojami kateteriai. *Acinetobacter* spp. ligoninėse plinta tiesioginio kontakto su užkrėstu žmogumi metu arba per užkrėtus paviršius.

Yra nustatyta, kad *Acinetobacter* spp. yra išvysčiusi atsparumą beveik visoms antibiotikų grupėms, kurios šiuo metu yra naudojamos šios bakterijos sukeltamų infekcijų gydymui. Šią savybę *Acinetobacter* spp. įgavo dėka dideliu plastiškumu ir mobilumu pasižyminčių genų, esančių bakterijos chromosomoje ir plazmidėse (Poirel ir Nordmann, 2006), bei koduojančių visus šiuo metu žinomus atsparumo mechanizmus: fermentinį antibiotiko degradavimą, efliukso pompų panaudojimą ir kt.

Tam, kad būtų parinkta tinkama gydymo strategija, molekulinis *Acinetobacter* spp. kamienų charakterizavimas aptinkant infekcijos šaltinį bei infekcijos plitimo modelį yra labai svarbus. PGR ir sekoskaita pagrįsti metodai šiuo metu yra plačiausiai taikomi šiam tikslui pasiekti dėl savo atkartojamumo bei tinkamumo vertinant dideles kamienų populiacijas (Higgins et al., 2017). Pasikartojančių sekų polimerazės grandininė reakcija (rep-PGR) pagrįstas genotipavimas yra paprasta, greita ir aukštu atkartojamumu pasižyminti metodų grupė, kuri yra efektyvi *Acinetobacter* spp. epidemiologijos tyrimuose, vertinant šios bakterijos hospitalinius protrūkius (Hauck et al., 2012). Kitas genotipavimo metodas, daugybinių lokusų VNTR analizė (MLVA) taip pat leidžia efektyviai tirti skirtingas *Acinetobacter* spp. populiacijas bei nustatyti bendrą infekcijos kilmę (Hauck et al., 2012).

*E. coli* taip pat yra oportunistinė bakterija, dažniausia hospitalizuotų pacientų bakteremijos priežastis (Mora-Rillo et, 2015), kuri kartais gali būti infekuoto paciento mirties priežastis (Owringi et al., 2018). Dažniausiai bakteremiją sukeltantys *E. coli* kamienai į kraujotakos sistemą išplinta per žarnyną (ExPEC) (Russo ir Johnson, 2003) arba per kolonizuotą šlapimo takų epitelį (Micenková et al., 2017).

*E. coli* pasižymi atsparumu daugeliui antimikrobinių junginių, taip pat šiai bakterijai būdingi visi žinomi antibiotikų atsparumo mechanizmai. Atsparumo genai yra koduojami chromosomoje ir plazmidėse ir dėl savo didelio mobilumo gali būti perduodami tarp skirtingų šios rūšies kamienų arba net tarp kitų *Enterobacteriaceae* šeimos atstovų (Blake et al., 2003). Be to, efektyviam infekcijos plitimui ExPEC kamienai turi virulentiškumo faktorius, kurie dėka mobilių elementų, tokių kaip patogeninės salelės ir plazmidės, perduodami iš vieno bakterijos kamieno į kitą (Dale ir Woodford, 2015), tačiau šie faktoriai ne visada yra susiję su sunkia *E. coli* infekcijos eiga (Jauréguy et al., 2007). Dėl šios priežasties labai svarbu taikyti tokius molekulinis metodus, kaip virulentiškumo ir atsparumo determinacijų nustatymas ir charakterizavimas bei tinkamas kamienų genotipavimas, norint įvertinti kliniškai svarbių *E. coli* kamienų epidemiologinį profilį ir todėl siekti tinkamos *E. coli* infekcijos gydymo ir galimos prevencijos ligoninėse.

Šio **darbo tikslas** buvo nustatyti bakterijų *Acinetobacter* spp. bei *E. coli*, sukeliančių hospitalines infekcijas ir/ar epidemiologinius protrūkius, charakteristikas ir plitimo dinamiką skirtingais tyrimo metais Lietuvos gydymo įstaigose.

Tiksliui pasiekti buvo išskirti tokie **uždaviniai**:

1. Naudojant rep-PGR ir MLVA genotipavimo metodus, atlikti tirtų rūšių izoliatų suskirstymą į giminingumo grupes.
2. Nustatyti tiriamų klinikinių izoliatų atsparumo antibiotikams ir virulentiškumo determinantes.
3. Nustatyti tirtų *E. coli* izoliatų filogenetines grupes.
4. Įvertinti tirtų bakterijų kamienų gimingumo (rep-PGR ir MLVA) ir atsparumo antibakterinėms medžiagoms genų paplitimo koreliaciją.
5. Įvertinti bakterijų kamienų gimingumo (rep-PGR ir MLVA) ir virulentiškumo genų paplitimo koreliaciją.
6. Įvertinti bakterijų kamienų filogenetinių grupių, atsparumo antibiotikams bei virulentiškumo determinančių plitimo dinamiką laike (izoliatų išskyrimo metų) ir skirtingose ligoninėse.
7. Įvertinti tirtų bakterijų izoliatų genotipinių profilių pasiskirstymą Lietuvos ligoninėse.

## Mokslinis naujumas

Pateikiamas darbas yra pirmasis Lietuvoje molekulinis epidemiologinis tyrimas, apimantis *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* įvairių antibiotikų grupių atsparumo genų vertinimą, virulentiškumo genų nustatymą, filogenetinių izoliatų išskirstymą bei skirtingų genotipavimo metodų taikymą ir analizę. Darbe apibūdinti 194 *Acinetobacter* spp. ir 256 *E. coli* daugiavaisių atsparumą skirtingų grupių antibiotikams turintys izoliatai, išskirti iš skirtingų ligoninių pacientų, kuriems buvo diagnozuotas sepsis. Tai pirmasis Lietuvoje darbas, kuriame buvo atrinkti tik daugiavaisčiu atsparumu pasižymintys izoliatai, išskirti iš kraujo arba likvoro.

Darbe buvo nustatyti antibiotikų atsparumo genai, kurie iki šiol Lietuvoje buvo mažai tirti – tai  $\beta$ -laktamazes koduojantys OXA, metalo- $\beta$ -laktamazių ir karbapenemazių grupių genai, iš kurių tik keli OXA grupės genai iki šiol buvo nustatyti Lietuvoje. Metalo- $\beta$ -laktamazes ir karbapenemazes koduojantys genai yra dažnai nustatomi Europoje, tačiau Lietuvoje tyrimų su šios grupės genais dar nebuvo atlikta.

Darbe buvo nustatyti aminoglikozidų, chinolonų ir polimiksinų atsparumą koduojantys genai, kurie Europoje mažai tiriami, bei eflukso pompų reguliaciniai genai, kurie pasaulyje yra vis dažniau nustatomi.

*E. coli* kamienams šiame darbe pirmą kartą Lietuvoje buvo tirti virulentiškumą koduojantys genai, atsakingi už ExPEC kamienų invaziją ir patogenezę žmogaus organizme. Taip pat buvo nustatomos filogenetinės tirtų *E. coli* izoliatų grupės skirtingose Lietuvos ligoninėse ir šie rezultatai papildė jau anksčiau atliktus tyrimus Lietuvoje.

Itin išsamiai skirtingais genotipavimo metodais buvo apibūdinti daugiavaisčiu atsparumu pasižymintys iš skirtingų Lietuvos ligoninių išskirti *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* izoliatai, didelį dėmesį skiriant susidariusių genotipinių profilių analizei bei galimų ryšių tarp izoliatų išskyrimo metų ir konkrečios ligoninės ištyrimui. Šis genotipinis vertinimas yra pirmasis Lietuvoje bei papildoma pasaulinius duomenis apie *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* epidemiologiją, galimą tolimesnę plitimą bei sudaro galimybes formuoti prevencines programas, norint kovoti su šių bakterijų sukeliama infekcija.

**Ginamieji disertacijos teiginiai:**

- Atsparumo ir virulentiškumo determinančių įvairovės kaita *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* klinikiniuose izoliatuose priklauso nuo izoliatų išskyrimo metų ir pasiskirstymo Lietuvos ligoninėse.
- *E. coli* filogenetinių grupių pasiskirstymas tarp tirtų izoliatų rodo žemą infekcijos virulentiškumo laipsnį Lietuvos ligoninėse.
- Rep-PGR genotipavimo profiliai rodo izoliatų artimą genetinį giminingumą bei priklausomumą genetiškai panašioms grupėms (klasteriams), pasižyminčioms savita atsparumo ir virulentiškumo genų įvairove.
- MLVA profilių variabilumas keičiasi priklausomai nuo izoliatų išskyrimo metų ir ligoninių, iš kurių izoliatai buvo išskirti, be to, MLVA profilių kaita priklauso nuo giminingumo ryšių tarp izoliatų.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Hospitalinės bakterijų sukeltos infekcijos ir jų paplitimas

Didelė šių laikų medicinos problema yra hospitalinės infekcijos, kai užsikrečiama sąlyginiais patogenais (oportunistiniais patogenais), cirkuliuojančiomis pačioje gydymo įstaigoje. Hospitalinė infekcija (HI) – tai ligoninėje atsiradusi paciento infekcija, pasireiškianti praėjus 48–72 val. nuo hospitalizacijos (Vincent, 2003). HI sukeliančios bakterijos išgyvena esant intensyviai antibiotikų fonui ir yra įgijusios atsparumą. Dažniausiai pasaulyje hospitalines bakterijų infekcijas sukelia:

- gramteigiamos bakterijos: koagulazės negaminantys stafilokokai, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. ir *Enterococcus* genties atstovai (ypač *Enterococcus faecalis* ir *Enterococcus faecium*);
- gramneigiamos bakterijos: *Enterobacteriaceae* šeimos atstovai (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli*, ir *Enterobacter* spp.), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ir *Burkholderia cepacia* (Jernigan et al., 2020).

Šių bakterijų sukeltos infekcijos yra sunkiai gydomos, dažnai sukeliančios paciento, turinčio nusilpusį imunitetą, mirtį (Giamarellou, 2010).

Dažnai hospitalinių infekcijų sukėlėjai yra daugiavaisčiu atsparumu pasižymintys bakterijos (Jernigan et al., 2020). Pasauliniai tyrimų rezultatai rodo, kad 20 % hospitalinių infekcijų sukėlėjų pasižymi daugiavaisčiu atsparumu antibiotikams (Sievert et al., 2013). Didžiausią pavojų hospitalizuotiems pacientams kelia meticilinui atsparus *S. aureus* (MRSA), vankomicinui vidutiniškai atsparus (VISA) ir vankomicinui atsparus (VRSA) *S. aureus*\*, *Enterobacteriaceae* šeimos atstovai, atsparūs plataus spektro cefalosporinams ir gaminantys plataus veikimo spektro  $\beta$ -laktamazės (ESBL), vankomicinui atsparūs *Enterococcus* genties atstovai (VRE), karbapenemams atsparūs *Enterobacteriaceae* šeimos atstovai ir *Acinetobacter* spp.

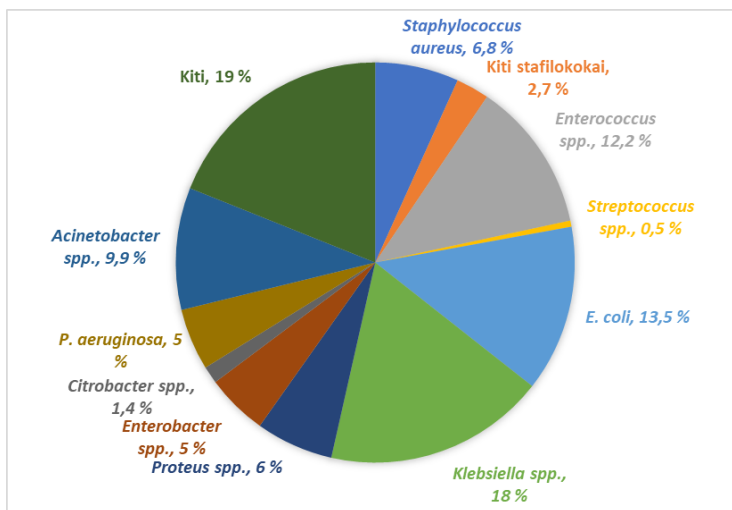
HI infekcijos paplitusios tiek išsivysčiusiose šalyse, tiek besivystančiuose pasaulio regionuose. Yra nustatyta, kad HI yra aptinkamos 10 % visų hospitalizuotų pacientų besivystančiuose šalyse ir 7 % – išsivysčiusiose šalyse (Khan et al., 2017), ir tai pasunkina pacientų gydymą

---

\* VISA ir VRSA apibrėžia mažiausia slopinanti antibiotiko vankomicino koncentracija, kuri inhibuoja patogeninės *S. aureus* bakterijos augimą. VISA atvėju antibiotiko koncentracija yra 4–8  $\mu\text{g/ml}$ , VRSA – daugiau nei 16  $\mu\text{g/ml}$ .

bei didina mirtingumą (Mohajeri et al., 2016). Dažniausiai ligoninėse įgyjamos šios HI: šlapimo takų infekcijos, kraujo užkrėtimas (sepsis, bakteremija), pooperacinės infekcijos, gastroenteritas, kvėpavimo takų infekcijos (pneumonija) (Endalafer et al., 2011; Raka et al., 2006). Nors šiais laikais ligoninės deda daug pastangų siekdamas pažaboti atsirandančias HI, tačiau iki šiol HI išlieka plačiai pasaulyje paplitusi problema, kuri stipriai prisideda prie atsparumo antibiotikams atsiradimo tarp ligoninių pacientų (Farr et al., 2001; Sadeghi et al., 2021).

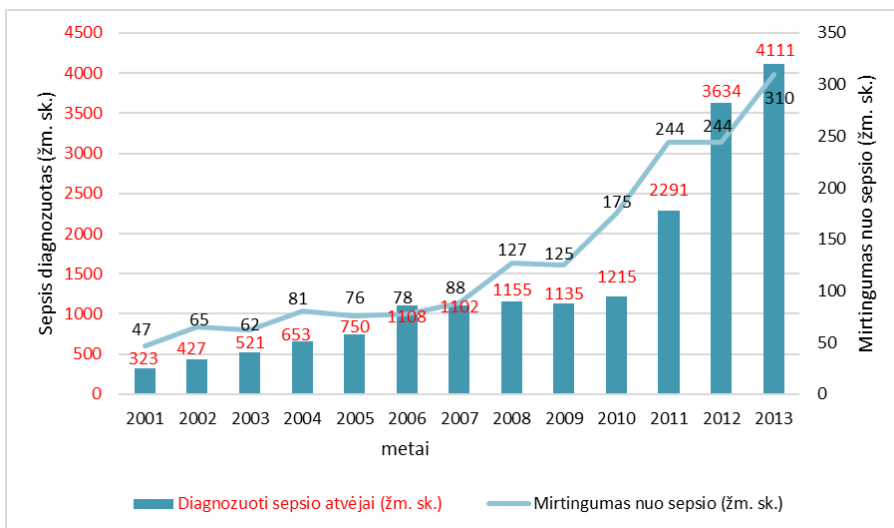
HI problema taip pat aktuali ir Lietuvoje. Remiantis Higienos instituto 2021 m. duomenimis (Higienos institutas, 2021), HI sudaro 4,1 % visų infekcijų. HI Lietuvos ligoninėse dažniausiai užsikrečiama per skirtingų kateterių naudojimą arba po gydymo antibakteriniais vaistais. HI dažniausiai serga moterys (55,2 %), be to, šios infekcijos yra labiau būdingos vyresnio amžiaus pacientams ( $\geq 62,6$  m.). Taip pat nustatyta, kad HI labiausiai būdingos pacientams, hospitalizuotiems ilgą laiką, t. y., daugiau nei 21 dieną (31,1 % visų HI atvejų). Higienos instituto duomenimis, Lietuvos ligoninėse hospitalines infekcijas dažniausiai sukelia gramneigiamos bakterijos (45,9 % *Enterobacteriaceae* šeimos atstovai ir 15,8 % - kitos gramneigiamos lazdelės), tarp kurių labiausiai paplitę yra *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Acinetobacter* spp., *Proteus* spp. ir *Pseudomonas aeruginosa* (1.1 pav.).



**1.1 pav.** Dažniausi HI sukėlėjai bendro pobūdžio ligoninėse (pagal Higienos institutas, 2021).

Ypač pavojingos yra bakterijų infekcijos, kurios sukelia sepsį arba paciento mirtį. Higienos instituto duomenimis, sepsio atvejų 2001–2014 m.

nuolat daugėjo (nuo 323 atvejų 2001 m. iki 4503 atvejų 2014 m.). Didėjo ir mirčių skaičius nuo sepsio, kurio pagrindiniai sukėlėjai – gramneigiamos bakterijos (**1.2 pav.**).



**1.2 pav.** Sepsio diagnozavimas ir mirtingumas nuo sepsio Lietuvoje 2001–2014 m. (pagal Higienos institutas, 2016).

### 1.1.1. *Acinetobacter* spp. klinikinė reikšmė ir genomines charakteristikos

Tarp kliniškai svarbiausių gramneigiamų bakterijų HI sukėlėjų, reikšmingą vietą užima nefermentuojančios bakterijos, negebančios katalizuoti gliukozės. Vienos jų – *Acinetobacter* genties bakterijos, ypač *A. baumannii* rūšis bei *A. baumannii* grupė (Gordon ir Wareham, 2010; Higgins et al., 2010a), kuriai priklauso kitos kliniškai svarbios *Acinetobacter* genties rūšys. Kitos su HI susijusios *Acinetobacter* genties rūšys yra *Acinetobacter nosocomialis* ir *Acinetobacter pittii*. Šios dvi rūšys fenotipiškai yra labai artimos *A. baumannii*, tačiau yra sunkiau diagnozuojamos klinikinėse laboratorijose tradiciniais rūšies nustatymo metodais, bet puikiai nustatomos naudojant MALDI-TOF masių spektrometrą (Šedo et al., 2013). Kitos kliniškai rečiau sutinkamos *Acinetobacter* genties rūšys yra *Acinetobacter ursingii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter parvus*, *Acinetobacter seifertii* ir *Acinetobacter junii* (Hujer et al., 2006). Pastarosios rūšys daugiausia susijusios su infekcijomis, atsirandančiomis dėl kateterių naudojimo (Dijkshoorn et al., 2007; Higgins et al., 2010b).

Labai rimta *A. baumannii* sukeltų HI epidemiologinė situacija susiklostė ir Lietuvos ligoninėse (Higienos institutas, 2021). Dažniausios *A.*



*baumannii* sukeltos infekcijos yra dirbtinai ventiliuojamų plaučių pneumonija, šlapimo takų, pooperacinių žaizdų infekcijos, bakteremija, Lietuvoje vis dažniau – sepsis (Brotfain et al., 2017; Peleg et al., 2008). *Acinetobacter* spp. prisitaikė vienodai gerai išgyventi sausoje ir drėgnoje aplinkoje. Greičiausiai šios savybės ir lėmė, kad *Acinetobacter* spp. puikiai įsitvirtino ligoninėse (Lee et al., 2011). Tačiau ypatingo dėmesio *Acinetobacter* spp. sulaukė dėl beveik neriboto gebėjimo įgyti atsparumą antibiotikams (Zarrilli et al., 2009), ypač atsižvelgiant į tai, kad *Acinetobacter* spp. rūšys turi prigimtinį atsparumą daugeliui antibiotikų – ampicilinui, cefazolinui, III kartos cefalosporinams (cefotaksimui ir ceftriaksonui), trimetoprimui, fosfomicinui ir ertapenemui (Higienos institutas, 2012).

Su atsirandančiomis naujomis genetinėmis metodikomis, yra paprasčiau įvertinti *A. baumannii* ir kitų *Acinetobacter* genties bakterijų evoliucinę dinamiką ir prisitaikymą prie besikeičiančių aplinkos sąlygų. Yra nustatyta, kad *A. baumannii* pasižymi dideliu genetiniu variabilumu, kurį užtikrina pastovus horizontalus genų perdavimas (Antunes et al., 2014). Yra nustatyta keletas mechanizmų, kurių pagalba *A. baumannii* sugebėjo įgauti genetinį variabilumą. Vienas iš tokių faktorių yra *intI1* klasės integronai, kurie yra gausiai aptinkami bakterijos genome. Kitas faktorius – insercinės sekos (IS), kurios savo ruožtu prisidėjo ne tik prie variabilumo, bet ir prie *A. baumannii* atsparumo antibiotikams reguliavimo. Viena iš insercinių sekų *ISAbal1* atlieka promotoriaus funkciją, vykdant karbapenemazių genų ekspresiją (Turton et al., 2006). Nustatyta, kad genetiniam *A. baumannii* variabilumui įtakos daro natūraliai vykstanti genomo transformacija (Perez et al., 2007).

Horizontali genų pernaša *Acinetobacter* genties bakterijose gali būti palengvinta bakteriofagų transdukcijos mechanizmu. Genominė *A. baumannii* analizė parodė bakteriofagų liekanas bakterijų genome, kurios apima trumpas į genomą įterptas sekas arba įvairius stambius konjugacinius elementus. Įvertinus daugumos *Acinetobacter* genties bakterijų transformacijoje dalyvaujančius genetinius elementus buvo nustatyta, kad jie yra aktyvuojami priklausomai nuo tam tikrų sąlygų. Tam, kad bakterija išvengtų aplinkoje esančių plazmidžių arba virusų įterpimo į genomą, ji turi reguliariai įterptas trumpas palindromines sekas (CRISPR), kurios besijungdamos su kitomis sekomis (tokiomis kaip *cas*, koduojančias Cas baltymus) formuoja CRISPR-Cas kompleksą, kurio dėka formuojamas imunitetas. *A. baumannii* genome dažniausiai sutinkama 1-Fb tipo CRISPR-Cas sistema, kuri galėtų būti genetinis žymuo skirtingų izoliatų genotipavime (Karah et al., 2015). Manoma, kad CRISPR-Cas sistema yra svarbi kontroliuojant genomines transformacijas, vykstančias *Acinetobacter* spp. Sistema labiausiai prisideda reguliuojant įvairių konjugacinių elementų, tokių kaip genomines saleles

AbaR1, koduojančių daugelį antibiotikus koduojančių determinančių, perdavimą (Fournier et al., 2006).

Be horizontalios genų pernašos, genetinės insercijos ir delecijos užtikrina *Acinetobacter* genčiai priklausančių bakterijų genomo variabilumą. Yra nustatyta, kad šie pakitimai vyksta tik 5 % viso bakterijų genomo, kur ir yra fiksuojamas didžiausias genomis variabilumas (Touchon et al., 2014). Taip pat yra nustatyta, kad genetiniam *A. baumannii* variabilumui įtakos turi atsirandančios taškinės mutacijos, kurios gali atsirasti dėka antibiotikų poveikio bakterijai, kas galiausiai gali aktyvinti bakterijos hipermutagenzę ir potencialiai padidėjusią eflukso pompų ekspresiją (Yoon et al., 2013).

### 1.1.2. *E. coli* klinikinė reikšmė bei genomines charakteristikos

*Enterobacteriaceae* – heterogeniška gramneigiamų bakterijų grupė, kuri yra normalios žmonių ir gyvūnų žarnyno mikrobiotos dalis. Šios šeimos atstovai yra plačiai paplitę augaluose ir dirvožemyje, vandenyje, gyvūnų ir žmonių virškinamajame trakte. Kai kurios šios šeimos rūšys paplitusios labai siaurose ekologinėse nišose. Tarp jų *E. coli* yra laikomi antriniais oportunistiniais patogenais (Tenaillon et al., 2010).

Dauguma *Enterobacteriaceae* atstovų sudaro pūlinius, sukelia pneumoniją, bakteremiją, žaizdų infekcijas, šlapimo takų ir žarnyno infekcijas (Adya et al., 2015). Nors jie yra viena pagrindinių normalios žmogaus žarnyno mikrobiotos sudėtinių dalių, tačiau kelios *Enterobacteriaceae* šeimos rūšys yra svarbios ligoninėse plintančių hospitalinių infekcijų sukėlėjos (Ergönül et al., 2016).

Viena svarbiausių HI sukėlėjų yra *E. coli*. Tai gramneigiama bakterija, kuri žmogaus organizme iš komensalo lengvai virsta į oportunistinį patogeną. Tai viena gausiausių bakterijų rūšių, aptinkamų šiltakraujų gyvūnų žarnyne (Tenaillon et al., 2010). *E. coli* sukelia žmogaus žarnyno infekcijas, pilvo ertmės uždegimą, bakteremiją, odos ir minkštųjų audinių infekcijas, naujagimių meningitą (Lausch et al., 2013). Ši bakterija yra geras indikatorius tyriant maisto taršą (Tenaillon et al., 2010). Be to, kiekvienais metais daugėja šios bakterijos atsparumo antibiotikams atvejų (Cassini et al., 2019) ir Pasaulinė sveikatos organizacija įtraukė *E. coli* bakteriją į 12 mikroorganizmų, kurių atsparumas antibiotikams turi būti griežtai kontroliuojamas, sąrašą.

Patogeniniai *E. coli* izoliatai yra skirstomi į patogeniškumo tipus (Kaper et al. 2004; Croxen ir Finlay, 2010), atsižvelgiant į tai, kuriuos organus kolonizuoja (pavyzdžiui, šlapimo takų sistemą kolonizuoja uropatogeninė *E. coli* (UPEC)), bei specifinių genų arba virulentiškumo buvimą gyvūnų

modeliuose (pvz., nežarnininė patogeninė *E. coli* (ExPEC), šiga toksiną produkuojanti *E. coli* (STEC). Didžiausia pavojų ligoninėse kelia ExPEC grupės *E. coli* kamienai, kurie infekuoja šlapimo takus (UPEC), yra septicemijos (kraujo užkrėtimo) sukėlėjai (SEPEC) bei sukelia naujagimių meningitą (NMEC) (Sarowska et al., 2019), iš kurių dažniausia HI yra šlapimo takų infekcija (Foxman, 2014).

ExPEC kamienai lengvai prisitaiko prie skirtingų aplinkos sąlygų, todėl geba infekuoti šlapimo takus, kraujotakos sistemą ir kitas žmogaus organizmo vietas, kurios nėra lengvai pasiekiamos kitiems patogenams (Foxman, 2002). Net 90 % visų šlapimo takų infekcijų atsirandančių ligoninėse yra susiję su ExPEC (Brede ir Shoskes, 2011; Talan et al., 2000). Taip pat ExPEC yra dažnas peritonito bei dubens uždegimo sukėlėjas (Chen ir Hsueh, 2012; Sharma et al., 2014) be to, užsitęsusi vidaus organų arba šlapimo takų ExPEC infekcija dažnai pereina į septicemiją, kuri be tinkamo gydymo sukelia paciento mirtį (Dale ir Woodford, 2015).

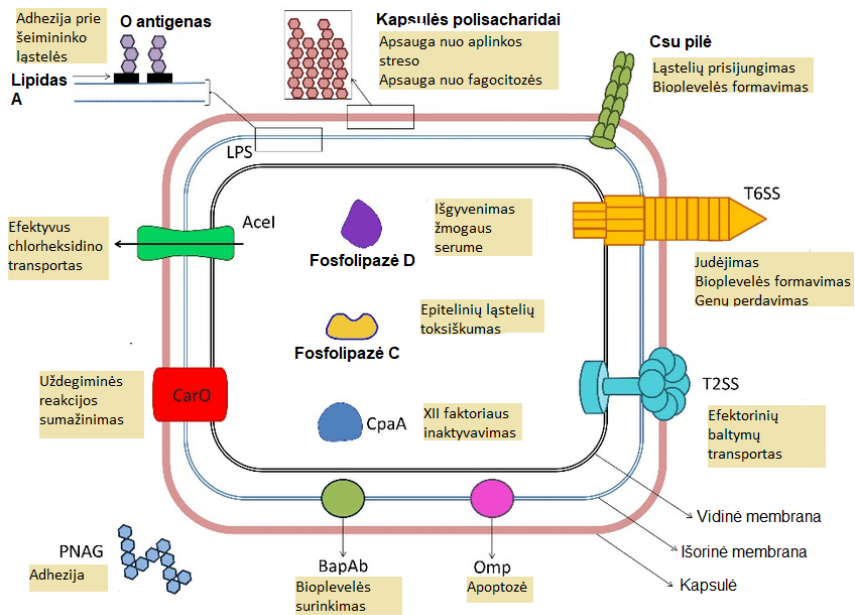
*E. coli* kamienai gali būti išskirstyti į filogenetines grupes (A, B1, B2, C, D, E, F ir G) rūšies viduje, kas leidžia labiau pažinti galimą infekcijos kilmę bei plėtrą (Lu et al., 2016). Tyrimai parodė, kad šių filogenetinių grupių kamienai skiriasi savo virulentiškumo faktoriais, genomo dydžiu, jos priklauso skirtingoms ekologinėms nišoms (Tenaillon et al., 2010). Taip pat yra nustatyta, kad filogenetinės grupės A ir B1 pasižymi mažiausiu genomo dydžiu, tuo tarpu filogenetinė grupė E turi didžiausią genomą (Denamur et al., 2021; Touchon et al., 2020). Kamienai, priklausantys B2 ir D filogenetinėms grupėms, yra virulentiški, ir dažnai sukelia šlapimo takų bei kitas nežarnyno infekcijas (Ferjani et al., 2012; Sannes et al., 2004). Remiantis Tenaillon ir kitų mokslininkų tyrimų rezultatais, galima teigti, kad B2 filogenetinė grupė yra visų *E. coli* filogenetinių grupių pirmtakas (Tenaillon et al., 2010). A ir B1 filogenetinių grupių kamienai – komensalai, kurie gali būti atsparesni nei B2 ir D filogenetinėms grupėms priklausantys kamienai (Ho et al., 2009). 2010 m. atliktame tyrime (Lee et al., 2010) nustatyta, kad kamienai, išskirti iš kraujo ar šlapimo, dažniausiai buvo priskirti B2 filogenetinei grupei, ir tik apie 20 % *E. coli* kamienų, išskirtų iš išmatų – B2 filogenetinei grupei (Lee et al., 2010).

## 1.2. Virulentiškumo faktorių įtaka hospitalinių infekcijų plitimui

### 1.2.1. *Acinetobacter baumannii* virulentiškumo faktoriai ir jų įtaka patogenezėi

*A. baumannii* virulentiškumo faktoriai iki šiol kelia klausimų, vertinant jų įtaką bakterinės infekcijos plitimui žmogaus organizme, tačiau šiais laikais

atrandami galimi virulentiškumo faktorių modeliai (Antunes et al., 2014). Naujausi tyrimai rodo virulentiškumo faktorių kombinacijų ir multifunktionalumo strategiją bei yra nustatyta 16 genų salų, koduojančių virulentiškumo faktorius, kuriuos bakterija atrankiai pasirenka konkrečiai infekcijai plisti (Smith et al., 2007) (**1.3 pav.**).

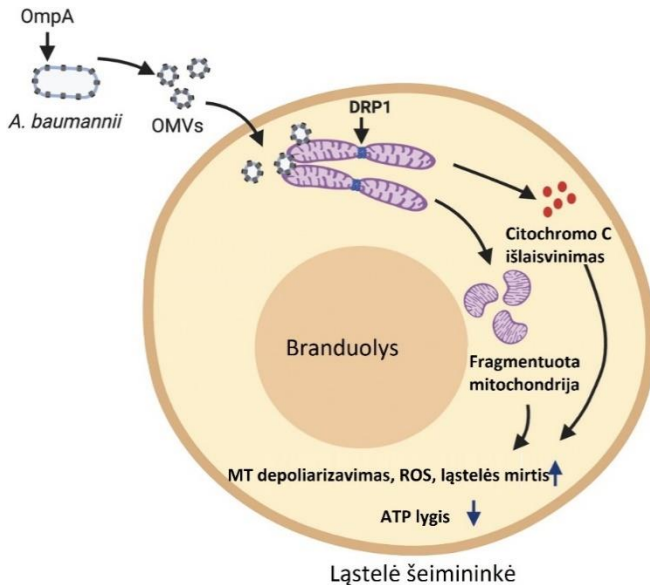


**1.3 pav.** *A. baumannii* virulentiškumo determinantės (pagal Ayoub Moubareck ir Hammoudi Halat, 2020). *AceI* – *Acinetobacter* chlorheksidino eflukso baltymas; *CpaA* – glikanui specifinė adamalizino grupės proteazė; *Csu* – šaperonas pilės sistemoje; *LPS* – lipopolisacharidas; *Omp* – išorinės membranos baltymas; *PNAg*-1,6-N-acetilgliukozaminas; *T2SS* – II tipo sekrecijos sistema; *T6SS* – VI tipo sekrecijos sistema.

Tačiau nėra nustatyta konkrečių virulentiškumo faktorių, atsakingų už klinikinės infekcijos plitimą. Be to, dėl savo sudėtingas biologijos yra sunku atskirti klinikinių *A. baumannii* izoliatų virulentiškumo faktorius nuo kitų šios genties neklinikinių izoliatų, nes yra nustatyta, kad ir neklinikiniai *Acinetobacter* spp. izoliatai turi tam tikrus virulentiškumo mechanizmus, būdingus ir klinikiniams izoliatams. (Eijkelkamp et al., 2011). Šios bakterijos savybės pabrėžia stiprų adaptacijos potencialą prie skirtingų žmogaus kūno aplinkų keičiant patogeniškumo strategijas (Sahl et al., 2011; Ayoub Moubareck ir Hammoudi Halat, 2020). Pagrindiniai *A. baumannii* virulentiškumo mechanizmai yra pavaizduoti **1.3 pav.**

### 1.2.1.1. Išorinės membranos baltymai (porinai) bei membraninės pūslelės (OMV)

Išorinės membranos baltymai (porinai) gramneigiamose bakterijose yra kertinis faktorius bakterijų prisitaikymui prie aplinkos sąlygų ir yra svarbus patogenų virulentiškumo faktorius (Lin et al., 2002). Pagrindinis išorinės membranos baltymas, atsakingas už *A. baumannii* invaziją į šeimininko ląsteles bei jų apoptozę yra OmpA (Smith et al., 2004). Tai yra 38 kDa dydžio baltymas, kuris prisijungia prie ląstelės šeimininkės paviršiaus, patenka į šeimininkės mitochondriją bei branduolį ir sukelia reaktyvaus deguonies kiekio (ROS) padidėjimą ir tolimesnę ląstelės šeimininkės apoptozę (Choi et al., 2005) (**1.4 pav.**). OmpA baltymas taip pat padeda *A. baumannii* prisitvirtinti ir užkrėsti epitelines ląsteles, dėka ekstraląstelinio matrikso baltymo fibronektino (Smani et al., 2012). Taip pat OmpA sugeba prisijungti prie faktoriaus H žmogaus serume ir taip išvengti komplemento sistemos poveikio bakterijai (Kim et al., 2009). Be to yra nustatyta, kad sumažėjus OmpA kiekiui *A. baumannii* membranoje, sumažėja minimali tam tikrų antibiotikų (aztreonamas, chloramfenikolis) inhibicijos koncentracija (MIC), kas įrodo, kad OmpA baltymas yra svarbus antibiotikų iš bakterijos ląstelės pašalinimui ir gali lemti *A. baumannii* daugiavaistį atsparumą. (Smani et al., 2014).



**1.4 pav.** *Acinetobacter baumannii* sekretuoja membranines pūsleles (OMV), kurių sudėtyje yra OmpA išorinis baltymas, sukeliantis ląstelės šeimininkės apoptozę (pagal Tiku, 2022).

Kitas išorinės membranos baltymas, randamas *A. baumannii*, yra Omp33–36. Jis veikia kaip vandens molekulių kanalas, o jo ekspresija yra tiesiogiai susijusi su atsparumu karbapenemų grupės antibiotikams (Smani et al., 2013). Viename tyrime (Rumbo et al., 2014) buvo nustatyta, kad šis baltymas gali sukelti ląstelės šeimininkės apoptozę blokuodamas ląstelės autofagocitozę, taip skatindamas šios ląstelės citotoksiškumą.

Išorinės membranos baltymas CarO yra svarbus reguliuojant *A. baumannii* atsparumą karbapenemams, taip pat buvo įrodyta, kad šio baltymo hiperekspresija slopina plaučiuose esančių neutrofilų priešūždegiminių poveikį, taip skatinant patogeno proliferaciją ir tolimesnę plaučių kolonizaciją (Sato et al., 2017).

### 1.2.1.2. Lipopolisacharidai ir kapsulė

Lipopolisacharidai (LPS) yra svarbus virulentiškumo faktorius infekcijos plitime gramneigiamose bakterijose. Yra nustatyta, kad LPS *A. baumannii* kamienams suteikia atsparumą sveikame žmoguje funkcionuojantiems serumo komponentams, slopina uždegimines reakcijas (Knapp et al., 2006) ir suteikia bakterijai didesnę galimybę išgyventi *in vivo*. *LpsB* glikoziltransferazė yra kritinis faktorius, reikalingas LPS sintezei *A. baumannii* kamienuose, todėl šio geno mutacijos sukelia pažaidas LPS sluoksnyje bei sumažina bakterijos atsparumą žmogaus serumui (Luke et al., 2010). Yra įrodyta, kad LPS esanti O-polisacharidinė dalis kartu su bakterijos pile prisideda prie patogeno adhezijos prie šeimininko ląstelės bei tolimesnio audinių kolonizavimo (Haseley et al., 1997).

Be LPS, labai svarbus *A. baumannii* struktūrinis komponentas yra kapsulė, kuri taip pat pasižymi virulentinėmis savybėmis. Tankus policukrų sluoksnius sukuria bakterijoje barjerą nuo nepalankių aplinkos sąlygų, tokių kaip išdžiuvimas ir dezinfektantai, nuo šeimininko imuninės sistemos komponentų (fagocitozės) (Iwashkiw et al., 2012) bei nuo tam tikrų antibiotikų (Geisinger ir Isberg, 2015; Singh et al., 2019). Nors kapsulės cukrų struktūra skirtingų *A. baumannii* kamienų skiriasi (aptikta virš 100 skirtingų tipų), tačiau visi tipai padeda patogenui efektyviai išgyventi infekcijos metu bei augti žmogaus serume (Kenyon ir Hall, 2013). Tiriant uždegimines reakcijas, sukeltas *A. baumannii*, buvo atrasti du genai – *ptk* ir *espA*, kurie yra svarbūs kapsulės formavime ir surinkime, o mutacijos šiuose genuose skatina netaisyklingą kapsulės surinkimą ir sutrikdo bakterijos augimą žmogaus serume (Russo et al., 2010).

### 1.2.1.3. Fermentai

Kitas *A. baumannii* aptinkamas virulentiškumo faktorius yra fosfolipazės. Tai yra hidroliziniai fermentai, kurie pasižymi lipoliziniu aktyvumu skaldant fosfolipidus, esančius žmogaus ląstelių membranoje. Fosfolipazė D yra aptinkama žmogaus serume, fosfolipazė C pasižymi toksiškomis savybėmis epiteliniam audiniui (Camarena et al., 2010).

Taip pat yra nustatytas fermentas CpaA, glikanui specifinė adamalizino grupės proteazė, kuri sugeba sustabdyti krešėjimą šeimininko organizme, inaktyvuodama krešėjimo faktorių XII. Taip CpaA fermentas sustabdo trombų formavimą pažaidų vietose ir padidina *A. baumannii* patogeniškų kamienų plitimą šeimininko organizme (Waack et al., 2018).

### 1.2.1.4. Bioplevelių formavimas

Svarbiausias *A. baumannii* virulentiškumo faktorius, atsakingas už šios bakterijos patogeninę bei daugiavaistį atsparumą antibiotikams, yra bioplevelių formavimas. Bioplevelė yra apibrėžiama kaip mikroorganizmų grupė, apgaubta bendra ekstraląsteline medžiaga, kuri bakterijoms padeda apsisaugoti nuo išdžiuvimo, šeimininko imuninės sistemos atsako, antibiotikų ir kitų pavojingų bakterijai aplinkos sąlygų (Doi et al., 2015). Taip pat bioplevelė *A. baumannii* infekcijos atveju padeda suformuoti šeimininkopatogeno sąveiką. Daugelis *A. baumannii* kamienų turi šaperonų valdomą dvikomponentę pilių sistemą BfmRS (Csu pilė), kuri daro įtaką genų ekspresijai bei apsauginės kapsulės formavimui, be to reguliuoja pilių surinkimą bei tolimesnę patogeno adheziją (Greene et al., 2016). Kita dvikomponentė sistema GasSA gali daryti įtaką Csu geno ekspresijai ir netiesiogiai veikti patogeno gebėjimą formuoti bioplevelę (Tomaras et al., 2008). Kaip ir *Staphylococcus aureus* kamienuose, *A. baumannii* kamienuose yra aptinkami baltymai, atsakingi už bioplevelės sintezę Bap (BapAb), kurie sugeba sudaryti agregatus formuojant bioplevelės matricą ir taip apsisaugoti nuo nepalankių aplinkos sąlygų (Goh et al., 2013; Loehfelm et al., 2008). Taip pat yra išskiriamas dar vienas faktorius, atsakingas už bioplevelių formavimą *A. baumannii* kamienuose, tai egzopolisacharidas poli-β-1,6-N-acetilgliukozaminas (PNAG), padedantis patogeno adhezijai ir agregacijai (Choi et al., 2009).

#### 1.2.1.5. *A. baumannii* judėjimas

Bakterijų judėjimas yra tiesiogiai susijęs su infekcijos plitimu bei virulentiškumo padidėjimu daugelyje bakterijų (Alarcon et al., 2009). *A. baumannii* savo išorinėje struktūroje neturi žiuželio, dėl to ji daug metų buvo laikoma nejudria (Skiebe et al., 2012; Vijayakumar et al., 2016). Tačiau tyrimai parodė, kad *A. baumannii* gali išgyventi ant lignoninės paviršių infekcijos metu ir judėti trūkčiojamaisiais (ang. *twitching*) judesiais (Harding et al., 2013). Šis judėjimas yra pagrįstas ląstelės pratęsimu ir įtraukimu terpėje bei vyksta IV tipo pilės pagalba (Wilharm et al., 2013), kuri be judėjimo funkcijos dar padeda bakterijai formuoti bioplevelę bei vykdyti genų pernašą iš bakterijos ląstelės arba į ją (Burrows, 2012). Taip pat tyrimuose buvo palygintas *A. baumannii* judrumas skirtingose žmogaus organizmo vietose ir buvo nustatyta, kad kraujyje esančios bakterijos yra daug judresnės už skrepliuose randamas, kas skatina geresnį patogeno išgyvenimą kraujo aplinkoje (Pérez-Varela et al., 2017).

Taip pat yra nustatytas kitas *A. baumannii* judėjimo tipas – su paviršiumi susijęs judrumas (ang. *surface-associated motility*), kurio metu bakterija gali judėti skirtingais paviršiais nenaudodama žiuželio (Ahmad et al., 2020). Šis judėjimo tipas yra priklausomas nuo IV tipo pilės, aplinkos pojūčio faktorių (ang. *quorum sensing*), lipooligosacharidų ekspresijos ir 1,3-diaminopropano, kuris aktyvuoja signalo perdavimą su paviršiumi susijusio judrumo aktyvavimui dėka aplinkos pojūčio (Skiebe et al., 2012).

#### 1.2.1.6. Mikroelementų pasisavinimas

Sėkmingam *A. baumannii*, kaip hospitalinio patogeno, įsitvirtinimui padeda šios bakterijos gebėjimas pasisavinti šeimininko maistines medžiagas, tokias kaip geležis, manganas ir cinkas, net esant ribotam jų kiekiui šeimininko aplinkoje (Tipton ir Rather, 2017). Pagrindinis mechanizmas, kurį pasitelkdama *A. baumannii* pasisavina surištą geležį, yra sideroforų naudojimas. Taip pat bakterija turi geležies pasisavinimo baltymus FecA ir FecI, kurie sugeba pasisavinti laisvą geležį (hemą), esančią infekuoto šeimininko aplinkoje (Morris et al., 2019). Tyrimai rodo, kad sumažinant geležies transportą į *A. baumannii* ląstelę, sumažėja jos bioplėvelių formavimo produktyvumas bei atsparumas oksidaciniam stresui (Ajiboye et al., 2018).

Taip pat *A. baumannii* kamienuose yra aptinkama aukštu efektyvumu pasižyminti cinko pasisavinimo sistema, kuri yra sudaryta iš ZnuABC transporterio, atsakingo už užląstelinio cinko pasisavinimą, ir ZigA GTPazės,



vykdančios cinko metabolizmą (Moore et al., 2014; Nairn et al., 2016). Dėka cinko pasisavinimo sistemos, *A. baumannii* gali išvengti šeimininko imuninės sistemos baltymo kalprotektino, kuris inhibuoja bakterijų augimą sudarydamas kompleksus su laisvu cinku, manganu ir divalentiniais metalų jonais.

Nors mangano pasisavinimas nėra gerai charakterizuotas, tačiau yra nustatyta, kad NRAMP šeimos transporteriai MumT ir MumC aktyvuoja mangano pasisavinimą *A. baumannii* kamienuose atsakant į kalprotektino veiklą (Juttukonda et al., 2016). Be to yra nustatyta, kad *mumT* genas yra atsakingas už bakterijos sėkmingą šeimininko ląstelių kolonizavimui (Morris et al., 2019).

#### 1.2.1.7. Baltymų sekrecijos sistemos

Baltymų sekrecijos sistemos *A. baumannii* kamienams padeda sudaryti sąveiką su aplinka ir ląstele šeimininke (Weber et al., 2017). Pirmoji sekrecijos sistema, aptikta *A. baumannii*, buvo trivalentis autotransporteris Ata, kuris padeda patogeniui prisitvirtinti prie žmogaus matrikso komponentų, tokių kaip kolagenas, ir skatina bakterijos bioplėvelės formavimą bei virulentiškumą (Bentancor et al., 2012). Taip pat skirtingų dydžių ir funkcijų baltymams sekretuoti *A. baumannii* naudoja II tipo sekrecijos sistemą (T2SS). T2SS yra sudaryta ir dviejų žingsnių sistemos, kurioje pirmame žingsnyje Sec arba Tat sistemos perneša baltymus, turinčius N-terminalinę seką per patogeno vidinę membraną, o antrame žingsnyje sekrecijos signalas yra pašalinamas, T2SS baltymai sekretuoja supakuotus baltymus iš vidinės membranos į išorę (Sandkvist, 2001). T2SS sistemos efektoriai yra CpaA, LipA ir LipH baltymai, iš kurių LipA ir LipH yra lipazės, reikalingos egzogeninių riebalų hidrolizei, o CpaA yra metalo-endopeptidazė, lizuojanti fibrinogeną ir krešėjimo faktorių V, bei neigiamai veikia šeimininko kraujotaką krešėjimo kelią (Tilley et al., 2014).

Kaip ir dauguma kitų gramneigiamų bakterijų, *A. baumannii* koduoja VI tipo sekrecijos sistemos komponentus (T6SS), kurie sudaro multikomponentę sekrecijos sistemą, gebančią suleisti baltyminės kilmės toksinus į kitas bakterijas šių bakterijų sąlyčio metu (Hood et al., 2010). *A. baumannii* kamienai, turintys T6SS sekrecijos sistemą gali produkuoti toksinus, tokius kaip nukleazės, peptidoglikano hidrolazės arba aktyvumu prieš membranos komponentus pasižyminčiais toksinais ir gali atakuoti kitas bakterijas (Elhosseiny ir Attia, 2018). Be to yra nustatyta, kad klinikinėje aplinkoje T6SS dažniausiai turi izoliatai, išskirti iš imunosupresuotų pacientų, kas

parodo, kad ši sekrecijos sistema geba pašalinti konkurencingus patogenus iš infekcijos židinio (Repizo, 2017).

### 1.2.2. *E. coli* virulentiškumo faktoriai ir jų įtaka patogenazei

Pagrindiniai ExPEC virulentiškumo faktoriai gali būti suskirstyti į 5 kategorijas: adhezinais, invazinai, geležies pasisavinimo faktoriai, protektiniai ir toksinai (**1.1 lentelė**).

**1.1 lentelė.** ExPEC virulentiškumo faktoriai, genai ir funkcijos (pagal Sarowska et al., 2019).

Virulentiškumo faktorius	Virulentiškumo genas	Funkcija	ExPEC patotipas
<b>Adhezinais</b>			
I tipo fimbrija	<i>fim</i>	Kolonizavimo ir bioplėvelių formavimo faktorius	UPEC, NMEC, SEPEC, APEC
Afibrinis adhezinai	<i>afa</i>	Jungiasi prie epitelio DAF receptorių bei IV tipo kolageno, pasižymi hemoaglutinacinėmis sąvybėmis	UPEC
Dr fimbrija	<i>dra</i>	Jungiasi prie epitelio DAF receptorių bei IV tipo kolageno, padeda patogenai prikibti prie šeiminko ląstelės	UPEC
P fimbrija	<i>pap</i>	Kolonizavimo faktorius, stimuliuoja T limfocitų, citokinų produkciją	UPEC, SEPEC, APEC
S fimbrija	<i>sfa</i>	Adhezijos faktorius prikibant prie epitelio, kepenų, apatinių šlapimo takų audinių	UPEC, NMEC
FIC fimbrija	<i>foc</i>	Adhezijai prie kepenų ir inkstų audinių	UPEC
Iha	<i>iha</i>	Geležies reguliuojama adhezija	UPEC
Mat	<i>mat</i>	Su meningitu susijusi temperatūros reguliuojama fimbrija	NMEC
<i>Curli fiber</i> genas	<i>crl, csg</i>	Skatina bioplėvelių formavimą	UPEC, SEPEC, APEC

**Lentelės 1.1 tęsinys.** ExPEC virulentiškumo faktoriai, genai ir funkcijos (pagal Sarowska et al., 2019).

Virulentiškumo faktorius	Virulentiškumo genas	Funkcija	ExPEC patotipas
Antigenas 43	<i>agn43(flu)</i>	Autotransporterių grupės baltymas, skatina adheziją ir bioplėvelių formavimą	UPEC
<b>Invaziniai</b>			
Ibe ABC	<i>ibeA,B,C</i>	Įsiskverbimui į šeimininko audinius	NMEC, SEPEC, APEC
<b>Geležies pasisavinimo faktoriai</b>			
Aerobaktinas	<i>iuc, aer</i>	Sideroforas, pasisavinantis Fe <sup>2+</sup> / <sup>3+</sup> jonus šeimininko organizme	UPEC, APEC
Geležį represuojantys baltymai	<i>irp</i>	Sintetina jersinijabaktiną	NMEC
Salmocherinas	<i>iroN</i>	Sideroforų receptorius, naudojantis Fe jonus iš šeimininko organizmo	UPEC, NMEC, SEPEC APEC
ChuA, Hma	<i>chu, hma</i>	Padedą pasisavinti Fe jonus iš hemoglobino	UPEC, SEPEC
SitABC	<i>sitA,B,C</i>	Transportuoja Fe ir Mn jonus	UPEC, APEC
<b>Protektiniai/ atsparumas serumui</b>			
Pernašos baltymas	<i>traT</i>	Inhibuoja klasikinį komplemento veikimo kelią	NMEC, SEPEC APEC
Kapsulės antigenas	<i>KpsMI-neuA, KpsMII</i>	Faktoriai, apsaugantys bakteriją nuo fagocitozės	NMEC, SEPEC
Išorinės membranos baltymas	<i>ompA</i>	Padedą patogenui išgyventi audinių viduje išvengiant imuninio atsako	UPEC, NMEC
Padidintas išgyvenimas serume	<i>iss</i>	Faktorius, apsaugantis nuo fagocitozės	NMEC, SEPEC, APEC

**Lentelės 1.1 tęsinys.** ExPEC virulentiškumo faktoriai, genai ir funkcijos (pagal Sarowska et al., 2019).

Virulentiškumo faktorius	Virulentiškumo genas	Funkcija	ExPEC patotipas
<b>Toksinai</b>			
Serino proteazės autotransporteris	<i>pic</i>	Degraduoja muciną, skatina bakterijų kolonizaciją, sukelia šeiminko audinių pažaidas	UPEC
Sekretuojamas autotransporterio toksinas	<i>sat</i>	Proteolizinis toksinas, sukelia šeiminko ląstelių vakuolizaciją	UPEC
Vakuolizavimą sukeliantis autotransporterio toksinas	<i>vat</i>	Proteolizinis toksinas, sukelia šeiminko ląstelių vakuolizaciją	UPEC, APEC
Hemolizinas A	<i>hlyA</i>	Sudaro poras šeiminko ląstelėse (ląstelių lizė)	UPEC
Citotoksinis nekrozės faktorius	<i>cnf</i>	Prisideda prie šeiminko ląstelių nekrozės	UPEC, SEPEC
Citoletalinis išpūtimo toksinas	<i>cdt</i>	Citoletalinis išpūtimo faktorius	SEPEC

Visi išvardinti faktoriai prisideda prie *E. coli* kamienų plitimo žmogaus organizme, efektyvaus šeiminko ląstelių kolonizavimo bei maistingų medžiagų pasisavinimo. Dėl šios priežasties yra svarbus virulentiškumo faktorių nustatymas klinikiuose *E. coli* kamienuose norint prognozuoti šios bakterijos infekcijos eigą bei potencialius pavojus žmogaus organizmui.

### 1.2.2.1. Adhezinai

Daugelis *E. coli* išorinių struktūrų turi įtakos patogeno adhezijai prie šeiminko ląstelės, bei valdo šaperonų veiklą (Werneburg ir Thanassi, 2018). Yra išskiriami trys pagrindiniai adhezinų tipai: fimbrijos, afimbriniai adhezinai ir išorinės membranos baltymai (OMP) (Lindberg et al., 2008). Skirtingus adhezinus turinčios bakterijos yra prisitaikę kolonizuoti skirtingas nišas. S-fimbrijos adhezinai (*sfa*), F1C fimbrija (*foc*), P pilė (*papC*) ir Iha (*iha*) yra dažniausiai sutinkami adhezinai šlapimo infekcijas sukeliančiose bakterijose (Hagan ir Mobley, 2007). UPEC kamienų P- ir S-fimbrijų receptoriai yra išsidėstę infekcijos šeiminko šlapimo takų epiteliniam audinyje (Mulvey, 2002). Nustatyta, kad S-fimbrija yra būdinga *E. coli* kamienams, atsakingiems už sepsį ir meningitą, dėka savo gebėjimo jungtis

prie ląstelinio šeiminko matrikso komponentų bei sialoglikoproteinų esančių smegenų kapiliaruose. Taip pat yra nustatyta tam tikrų adhezinių priklausomybė nuo infekcijos tipo: pavyzdžiui, IbeA baltymas gali prisijungti prie smegenų kapiliarų endotelio ląstelių ir sukelti patogeno invaziją į nervinę sistemą (Bonacorsi ir Bingen, 2005).

Yra išskiriami du fimbrijų tipai pagal manozės liekaną: manozę turinčios fimbrijos priklauso tipui 1 (jos geba prisijungti prie šeiminko ląstelės paviršiuje esančios D-manozės) ir atsparumu manozei pasižyminčios fimbrijos priklauso tipui 2 (pvz., P, S, Dr fimbrijos) (iš polipeptidų sudarytos struktūros, besijungiančios prie kitų ląstelės šeiminkės stuktūrų nei manozė). Genai *fimB* ir *fimG* yra atsakingi už 1 tipo fimbrijų ekspresiją, kiti trys genai (*fimF*, *fimG*, *fimH*) atsakingi už adheziją prie šlapimo pūslės epitelio ląstelių per uroplakino 1A receptorių (UP1a) bei bioplėvelės formavimą (Eto et al., 2007; Rangel et al., 2013). Atsparumu manozei pasižyminčioms fimbrijoms priklauso F-tipo fimbrija, kuri yra koduojama 11 *pap* grupės genų bei yra dažnas virulentiškumo faktorius vaikų ir moterų šlapimo pūslės uždegimą bei bakteremiją sukeliančiose bakterijose. Kita 2 tipo fimbrija, P fimbrija, yra dažnas virulentiškumo faktorius organų transplantaciją turėjusiuose pacientuose (Bien et al., 2012; Wullt et al., 2001).

#### 1.2.2.2. Invazinai

*E. coli* adhezija prie šeiminko ląstelės membranos paleidžia šeiminko-ląstelės signalų perdavimo kaskadą bei sukelia šeiminko ląstelėje aktino citoskeleto pertvarkymą, reikalingą tolimesniam patogeno patekimui į ląstelės vidų (Kim, 2008; Maruvada et al., 2012).

Rho šeimos invazinai RhoA, Rac1 ir CDC42 yra GTPazės, kurios sugeba reguliuoti šeiminko ląstelės citoskeleto organizavimą, kas padeda patogeniui patekti į ląstelės vidų (Brandt et al., 2007; Shin ir Kim, 2006). Kitas Pfam12831 šeimos invazinas IbeA invazijai naudoja Rac1 baltymą, veikiantį kaip aktyvatorius (Kim, 2008). Yra nustatyta, kad *ibeA* genas nėra būdingas visiems *E. coli* kamienams ir sutinkamas tik patogeniniuose kamienuose (Homeier et al., 2010; Wang et al., 2011), suteikdamas jiems galimybę išgyventi smegenų endotelio ląstelėse (Cieza et al., 2015). Nustatyta, kad *ibeA* genas yra aptinkamas NMEC ir APEC patotipuose (kamienų grupėse, kurios pasižymi tokiu pačiu patogeniškumu tam tikram šeiminkui) (Germon et al., 2005; Sora et al., 2021) tiek žmogaus, tiek galvijų smegenų endotelio ląstelėse (Hui et al., 2009; Zou et al., 2007).

### 1.2.2.3. Geležies pasisavinimo faktoriai

Sideroforai – tai antriniai bakterijų metabolitai, kurie sugeba aptikti ir pasisavinti geležį, kuri skatintų bakterijos augimą bei vystymąsi (Su et al., 2016), nes geležies deficitas bakterijos ląstelėje sumažina atsparumą aplinkos sąlygoms bei nuslopina kapsulės sintezę (Simões et al., 2007). ExPEC kamienams, ypač kraujo serume, geležies pasisavinimas yra kritiškai reikalingas, dėl to prisitaikydamas išgyventi kraujo serume patogenas įgavo gebėjimą pasisavinti geležį net aplinkoje, kurioje laisvo geležies beveik nėra ir išvystė skirtingas strategijas jo gavimui iš šeimininko ląstelių (Gao et al., 2012). Visi sideroforai priklauso penkioms pagrindinėms klasėms: katecholatai, fenoliatai, hidroksamino rūgštis,  $\alpha$ -hidroksikarbohidratai ir mišraus tipo sideroforai. ExPEC sideroforams priklauso patogeno virulentiškumą pagerinantys sideroforai. Pagrindiniai jų yra: enterobaktinas ir salmocherinas (katecholatų sideroforai), aerobaktinas (mišraus tipo sideroforas) ir jersiniabaktinas (fenolatų sideroforas).

Enterobaktiną produkuoja beveik visi *E. coli* kamienai bei kiti *Enterobacteriaceae* šeimos atstovai (Ratledge ir Dover, 2000), jis yra koduojamas *entEBG(AC)* genų klasteryje (Crosa ir Walsh, 2002). Nors enterobaktinas yra randamas tiek patogeniniuose, tiek nepatogeniniuose *E. coli* kamienuose, tačiau jo virulentiškumas pasižymi gebėjimu išvengti šeimininko imuninės sistemos atsako ir sugebėjimu pasisavinti geležį dėka enterobaktino glikozilinimo (Garénaux et al., 2011).

Salmocherinas yra randamas tik ExPEC kamienuose, dėl ko yra laikomas išskirtiniu virulentiškumo faktoriumi šiam patotipui. Salmocherinas yra koduojamas *iroBCDEN* genų klasterio (Bister et al., 2004), kurio svarbiausias genas yra *iroB* genas, atsakingas už glikoziltransferazės sintezę, verčiant enterobaktiną į salmocheriną, bei tolimesnį salmocherino aktyvumą (Dobrindt et al., 2001; Hantke et al., 2003).

Aerobaktinas yra kitas dažnas sideroforas ExPEC kamienuose, o jo baltymų biosintezė yra koduojama *iucABCD* genų klasteryje (Carbonetti ir Williams, 1984). Dažniausiai aerobaktino genai yra randami patogeniniuose *E. coli* izoliatuose, išskirtuose iš mėšinių gyvulių ir paukščių (Dozois et al., 1992). Taip pat buvo nustatyta, kad aerobaktinas padeda patogeniui pasisavinti geležį žmogaus šlapimo takų infekcijos metu (Garcia et al., 2011). Lyginant su enterobaktino poveikiu, aerobaktinas yra daug efektyvesnis stimuliuojant *E. coli* ląstelės augimą, be to aerobaktinas sugeba prisijungti prie albumino, esančio šeimininko serume, ir pasisavinti geležį iš transferinų, skirtingai nuo enterobaktino, kurio geležies pasisavinimas iš transferinų yra neefektyvus (Sora et al., 2021).

Jersiniabaktiną gali gaminti ExPEC kamienai, tačiau originaliai pirmą kartą šis sideroforas buvo aptiktas *Yersinia pestis* bakterijose, kolonizavusiose šlapimo takus. Jersiniabaktinas yra tiesiogiai susijęs su UPEC patogeniškumu, ypač patogeniui kolonizuojant šlapimo takus ir apsaugant nuo šeimininko organizmo imuninio atsako (Caza et al. 2011; Fetherston et al., 2010). Taip pat šis sideroforas aktyvuoja patogeno bioplėvelės formavimą (Hancock et al., 2008) bei sumažina ROS formavimąsi leukocituose, monocituose ir makrofaguose, apsaugant patogeną nuo sunaikinimo (Pauw et al., 2009).

#### 1.2.2.4. Protektiniai ir atsparumas šeimininko serumui

Protektiniai yra ExPEC virulentiškumo faktoriai, atsakingi už bakterijos atsparumą šeimininko serumui, kurių pagrindiniai yra TraT, OmpA ir kapsulinis antigenas K.

TraT yra susijęs su *E. coli* R faktoriaus perdavimu konjugacinėje plazmidėje (Sora et al., 2021). Tai yra išorinės membranos baltymas, kuris nekovalentiškai yra sujungtas su peptidoglikano sluoksniu bei formuojantis ant jo paviršiaus agregatus (Sukupolvi ir O'Connor, 1990). TraT apsaugo bakterijos paviršių nuo komplemento sukeltos lizės bei nuo galimos fagocitozės (Sarowska et al., 2019).

Išorinės membranos baltymas A (OmpA) yra dažniausias *E. coli* išorinis baltymas, kuris yra reikalingas kaip išorinės membranos struktūrinis elementas bei vykdo jonų perdavimo funkciją kaip porinas (Verhelst et al., 2005; Reusch et al., 2012). Vykdydamas jonų mainus, OmpA baltymas padeda bakterijai išgyventi osmosinį stresą (Hong et al., 2006). Šio baltymo ekspresija yra tiesiogiai susijusi su 1 tipo fimbrijos ekspresija (Teng et al., 2006). Yra nustatyta, kad OmpA baltymas pasižymi virulentiškomis savybėmis meningito atvejais, skatindamas NMEC adheziją ir invaziją (Wu et al., 2009), be to padeda sėkmingai išvengti antikūnų poveikio kraujotakos sistemoje (Prasadarao et al., 2002).

Kapsulė patogeninėse bakterijose tarnauja imuninio šeimininko organizmo atsakui išvengti, be to, kapsulės neturintys tos pačios rūšies kamienai yra dažniausiai nepatogeniniai. Be to yra nustatyta, kad kapsulė yra svarbus faktorius gramneigiamų bakterijų fagocitozės išvengimui (Willis ir Whitfield, 2013). Kapsulė yra sudaryta iš ilgų polisacharidų grandinių, vadinamų kapsuliniais polisacharidais (CPS), kurie, kartais, prie savo struktūrų prijungia trumpas aminorūgščių arba riebalų liekanas. Yra aptikta apie 80 skirtingų kapsulės antigenų (K) (Whitfield, 2006), iš kurių K1 ir K2 tipai dažniausiai aptinkami ExPEC kamienuose bei prisideda prie patogeno atsparumo serumui (Buckles et al., 2009). Tam tikri kapsulės pakitimai gali

priversti ExPEC mimikuoti tam tikrus šeimininko audinių komponentus ir taip apsunkinti patogeno imuninį atpažinimą infekcijos metu (Sáez-López et al., 2017).

#### 1.2.2.5. Toksinai

Dažniausi šiuo metu aptikti ExPEC toksinai yra  $\alpha$ -hemolizinas (genai *hlyA*, *hlyD*, *hlyF*), citotoksinis nekrozės faktorius 1 (*cnf1*) bei V tipo sekrecijos toksinai: sekretuojamas autotransporterio toksinas (*sat*), patogeno kolonizacijoje dalyvaujanti proteazė (*pic*) ir vakuolizavimo autotransporterio baltymas (*vat*) (Sora et al., 2021).

$\alpha$ -Hemolizinas tai toksinas, koduojamas *hlyCABD* operono genų (Vila et al., 2016). *E. coli* produkuojamas hemolizinas pasižymi citotoksinėmis savybėmis skirtinguose ląstelių tipuose tiek žmogaus, tiek kitų gyvūnų organizmuose. Manoma, kad hemolizino taikynys yra  $\beta$ 2 integrino receptorių, esantis ant šeimininko imuninių ląstelių paviršiaus (Shanthalingam ir Srikumaran, 2009), kas veda prie porų formavimo ląstelių membranose ir tolimesnės šeimininko ląstelių žūties (Skals et al., 2010). Taip pat hemolizinas gali formuoti poras eritrocituose ir sukelti jų lizę.

Citotoksinis nekrozės faktorius 1 (CNF1) – tai 115 kDa baltymas, pasižymintis citotoksinėmis savybėmis (Knust et al., 2009). CNF1 veda prie šeimininko ląstelės citoskeleto pakitimų bei ląstelės ciklo sutrikdymo (Munro et al., 2004). Yra nustatyta, kad CNF1 daugiausiai yra būdingas UPEC kamienams (Andreu et al., 1997), taip pat jis yra siejamas su neutrofilų funkcijų sutrikdymu (Welch, 2016).

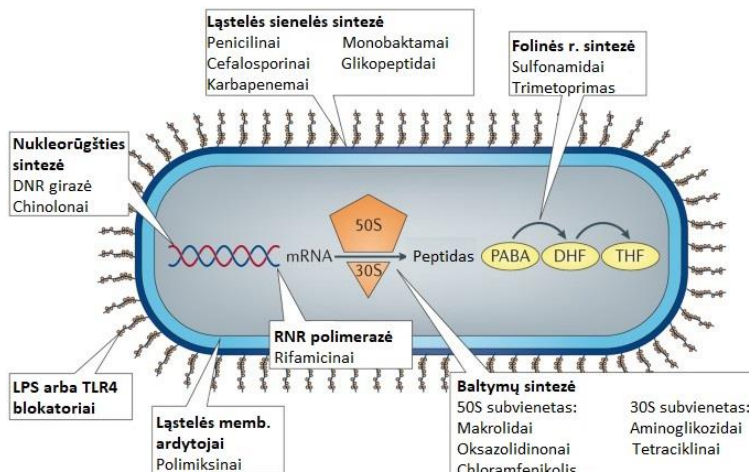
V tipo sekrecijos toksinams priklausantis Sat autotransporterio toksinas yra siejamas su UPEC infekcija bei pasižymi proteoliziniu aktyvumu, sukelia šeimininko ląstelės citoskeleto pakitimus ir epitelinių ląstelių lizę (Maroncle et al., 2006). Kiti du toksinai Pic ir Vat taip pat dažniausiai yra randami UPEC kamienuose (Henderson et al., 1999). Pic toksinas pasižymi šeimininko neurofilų mucino sluoksnio skaldymu (Ruiz-Perez et al., 2011), tuo tarp Vat toksinas sukelia šlapimo takų epitelio ląstelių vakuolizavimą (Parham et al., 2005).

### 1.3. Gramneigiamų bakterijų sukeltų infekcijų gydymui naudojami antibiotikai ir atsirandantys atsparumo mechanizmai

Antibiotikai veikia bakterijos fiziologiją, joje vykstančius biocheminius procesus, sukelia bakterijos žūtį bei stabdo bakterijų augimą (Goldstein, 2011). Pagal struktūrą ir veikimo pobūdį, antibiotikai skirstomi į kelias



grupės. Antibiotikai gali slopinti bakterijų (I) baltymų sintezę; (II) nukleorūgščių sintezę; (III) plazminės membranos funkcijas; (IV) ląstelės sienelės sintezę; ir stabdyti (V) folinės rūgšties (vitamino B9) sintezę (1.5 pav.).



1.5 pav. Antibiotikų taikiniai bakterijose (pagal Brown, 2015).

Atsparumas skirtingų klasių antibiotikams dažniausiai pasireiškia kelių skirtingų mechanizmų kombinacijomis, tik retais atvejais atsparumą nulemia tik vienas mechanizmas. Pavyzdžiui, atsparumą vieniems iš ilgiausiai klinikoje vartojamų antibiotikų – aminoglikozidams, dažniausiai lemia fermentinis antibiotikų deaktyvavimas. Jį atlieka trijų tipų fermentai – acetiltransferazės, nukleotidiltransferazės ir fosfotransferazės (Ramirez ir Tolmanky, 2010). Be to, aminoglikozidai gali būti šalinami iš ląstelės membraniniais siurbliais arba atsparumas šiems antibiotikams atsiranda dėl ribosomų kitimo (Magnet et al., 2001). Labai panašiai pasireiškia atsparumas ir kitiems baltymų sintezę slopinantiems antibiotikams – chloramfenikoliui ir tetraciklinams. Chloramfenkolį dažniausiai deaktyvuoja įvairių tipų acetiltransferazės, gali vykti atsparumą suteikiančios taikinio mutacijos, arba antibiotikas šalinamas membraninių siurblių pagalba (Blair et al., 2015). Yra žinoma daugiau nei 40 skirtingų genų, koduojančių baltymus, lemiančius atsparumą tetraciklinui. Dažniausiai tai membraniniai siurbliai, kartais – ribosomų apsauginiai baltymai (ang. *ribosomal protection proteins*, RPP) (Blair et al., 2015).

Trimetoprimas ir sulfonamidų klasės antibiotikai (dažniausiai sulfametoksazolis), bakterijose slopinantys folinės rūgšties sintezę, turintys

baktericidinį poveikį, terapijoje dažnai naudojami kartu (Roberts, 2002). Jie yra sintetiniai antibiotikai, todėl bakterijose yra mažai fermentų, gebančių inaktyvuoti šiuos antibiotikus arba juos modifikuoti (Blair et al., 2015). Trimetoprimas slopina bakterijų dihidrofoliato reduktazę (DHFR), koduojamą chromosomoje, o sulfonamidai – dihidropteorato sintazę (DHPS).

Chinolonai arba fluorochinolonai – dar viena klasė sintetinių antibiotikų, kurie klinikoje vartojami jau ilgą laiką. Šie vaistai veikia slopindami DNR replikacijoje dalyvaujančius fermentus – DNR girazę ir topoizomerazę IV (Giedraitienė et al., 2011). 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 IV (Jacoby, 2005). Visi šie pokyčiai vyksta bakterijų chromosomoje.

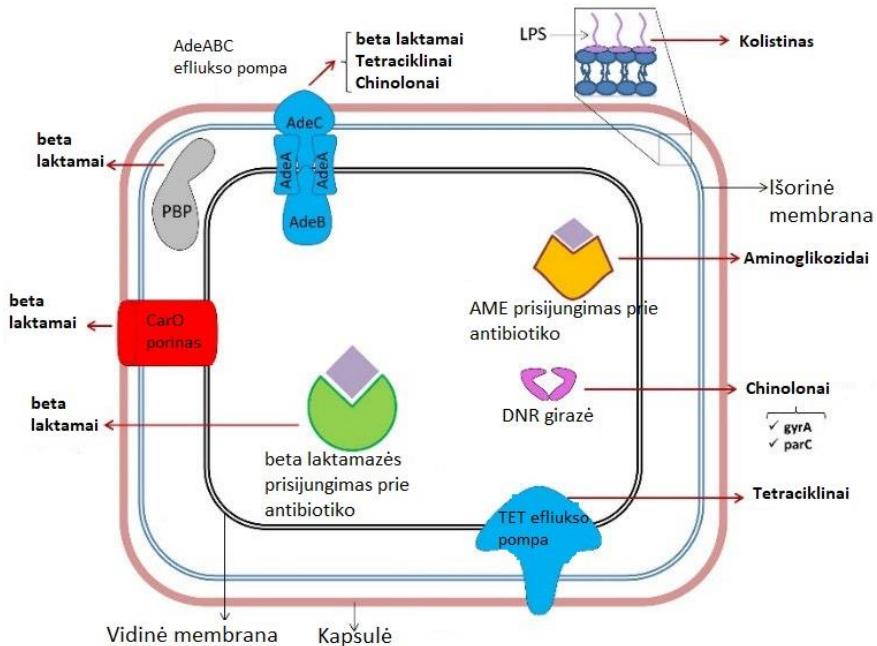
Didžiausia ir plačiausiai vartojamų antibiotikų klasė yra  $\beta$ -laktaminiai antibiotikai, kuriems priskiriami visi antibiotikai, savo molekuliniėje struktūroje turintys  $\beta$ -laktamo žiedą – penicilinai ir modifikuoti jų dariniai, cefalosporinai (I-IV kartos), karbapenemai, monobaktamai, taip pat  $\beta$ -laktamazių slopikliai (Bush ir Jacoby, 2010).  $\beta$ -laktaminių antibiotikų veikimo mechanizmas paremtas bakterijų ląstelės sienelės sintezės slopinimu.  $\beta$ -laktaminiai antibiotikai jungiasi prie transpeptidazių, kurios kartu yra ir penicilinus surišantys baltymai (ang. *penicillin-binding proteins*, PBPs), ir slopina peptidoglikano peptidinių uodegų sujungimą (Blair et al., 2015). Pagrindinis bakterijų išvystytas būdas, leidžiantis apsaugoti nuo šių antibiotikų baktericidinio poveikio –  $\beta$ -laktamazių, skaldančių  $\beta$ -laktamazių ląstelę patekusių antibiotikų  $\beta$ -laktamo žiedą ir tokiu būdu juos suardančių, sintezę (Blair et al., 2015). Taip pat gali vykti mutacijos PBP koduojančiuose genuose, taip susilpninant sąveikos tarp PBP ir  $\beta$ -laktamo žiedo veiksmingumą (Bradford, 2001).

Bakterijos dažnai tampa atsparios iš karto kelių klasių antibiotikams ir įgyja daugiavaisčio atsparumo antibiotikams (DAA) fenotipą. Nustatyti du savitieji DAA pasireiškimų būdai – kryžmiškasis (ang. *cross-resistance*) ir vadinamasis ko-atsparumas (ang. *co-resistance*). Kryžmiškojo atsparumo atveju mikroorganizmai atsparūs ne vienam, o iš karto keliems antibiotikams. Įrodyta, kad čia svarbų vaidmenį vaidina membranų siurbliai, neatrankiai šalinantys svetimą medžiagą iš ląstelės citozolio. Šie siurbliai paplitę tiek tarp gramneigiamųjų, tiek tarp gramteigiamųjų bakterijų (Sundsfjord et al., 2004). Ko-atsparumo atveju atsparumo elementai yra genetiškai susiję, o jų raiška vyksta kartu. Šio mechanizmo pavyzdys yra genetinės struktūros – integronai, pirmiausiai aptikti gramneigiamose, vėliau ir gramteigiamose bakterijose (Rowe-Magnus ir Mazel, 2001).

*E. coli* ir *A. baumannii* atsparumas antibiotikams yra plačiai paplitęs Europoje. ECDC duomenimis (ECDC, 2020) buvo nustatyta, kad pusė visų hospitalinių *E. coli* infekcijų pasižymėjo atsparumu bent vienai stebėsenoje dalyvaujantiems antibiotikų grupei (aminopenicilinams, III kartos cefalosporinams, karbapenemams, fluorochinolonams arba aminoglikozidams), taip pat ir *Acinetobacter* spp. hospitalinių izoliatų atveju (atsparumas fluorochinolonams, aminoglikozidams arba karbapenemams). Nors atsparumas karbapenemams buvo retas *E. coli* izoliatuose (iki 1,6 % visų Europos hospitalinių izoliatų), tačiau *A. baumannii* atveju kai kuriose šalyse jis buvo aptinkamas beveik visuose izoliatuose (96,4 % Kroatijoje, 94,6 % Graikijoje, 93,3 % Rumunijoje ir 91,1 % Lietuvoje). Įvertinus *E. coli* koatsparumo duomenis buvo nustatyta, kad Europoje kombinuotas atsparumas III kartos cefalosporinams, fluorochinolonams ir aminoglikozidams yra būdingas daugiausiai Bulgarijai (18,7 % visų šalies hospitalinių *E. coli* izoliatų), Slovakijai (14,9 %) ir Kiprui (13,6 %). Mažiausiai koatsparumas buvo būdingas Šiaurės Europos šalims – Danijai, Norvegijai ir Estijai (1,6 %). Lietuvoje *E. coli* kombinuotas atsparumas sudarė 6,4 % visų ligoninėse išskirtų *E. coli* izoliatų. Vertinant *Acinetobacter* spp. kombinacinį atsparumą fluorochinolonams, aminoglikozidams ir karbapenemams buvo nustatyta, kad net šešiose Europos šalyse (Kroatija, Kipras, Graikija, Italija, Lietuva ir Rumunija) atsparumo skaičius siekė virš 75 % išskirtų šalies *Acinetobacter* spp. izoliatų. Tarp šių šešių šalių didžiausi skaičiai buvo Kroatijoje (95,1 %), Lietuvoje šis skaičius buvo 86,7 %. Tuo tarpu koatsparumo *Acinetobacter* spp. izoliatuose nebuvo nustatyta Airijoje, Olandijoje ir Norvegijoje. Stebima tendencija, kad *E. coli* izoliatų atsparumas III kartos cefalosporinams didėja (lyginant 2015–2020 metų duomenis; ECDC, 2020), bei kombinuotas atsparumas *Acinetobacter* spp. izoliatuose taip pat didėja (2015–2020 metų duomenys; ECDC, 2020).

### 1.3.1. *A. baumannii* atsparumo antibiotikams mechanizmai

Didelį pavojų hospitalizuotiems pacientams kelia daugiavaisčiu bei atsparumu skirtingoms antibiotikų klasėms pasižymintys *A. baumannii* kamienai. Dėl šios savo savybės *A. baumannii* sukeltos infekcijos yra sunkiai gydomos ir egzistuoja tik keletas antibiotikų vartojimo strategijų, gebančių sustabdyti šios sukeltas bakterijos infekcijas (**1.6 pav.**).



**1.6 pav.** Skirtingi atsparumo mechanizmai, būdingi *A. baumannii* kamienams (pagal Ayoub Moubareck ir Hammoudi Halat, 2020).

Tam, kad *A. baumannii* prisitaikytų prie skirtingų antibiotikų vartojimo, ji išvystė skirtingus atsparumo mechanizmus skirtingoms antibiotikų klasėms, kad užtikrintų efektyvų antibiotikų pašalinimą ir degradavimą.

### 1.3.1.1. *A. baumannii* atsparumo mechanizmai $\beta$ -laktaminiams antibiotikams

Pagrindiniai mechanizmai, kurių dėka *A. baumannii* kamienai įgauna atsparumą  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams yra:  $\beta$ -laktamazių gamyba, išorinės membranos pralaidumo pakitimai bei padidėjęs efluksio pompų aktyvumas (Roca Subirà et al., 2012).

$\beta$ -laktamazė AmpC, priklausanti C klasės  $\beta$ -laktamazėms pagal Ambler klasifikaciją, pasižymi savo gebėjimu hidrolizuoti penicilinus ir cefalosporinus, be to yra efektyvi prieš  $\beta$ -laktaminių antibiotikų slopiklis, tokius kaip klavulaninė rūgštis, sulbaktamas ir tazobaktamas (Hujer et al., 2005). Šio fermento ekspresija yra susijusi su insercine seka IS*Abal*, kuri aktyvuoja AmpC fermentą koduojantį geną.

Kita klinikiniam *A. baumannii* kamienams svarbi  $\beta$ -laktamazių grupė yra oksacilinazės (OXA), priklausančios D klasės fermentams. OXA fermentai gavo savo pavadinimą dėl gebėjimo skaldyti oksaciliną. Be to šie fermentai *A. baumannii* kamienuose pasižymi karbapenemazių aktyvumu ir

dažnai yra vadinami karbapenemazes hidrolizuojančiomis D klasės  $\beta$ -laktamazėmis (ang. *carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamases*, CHDLs). *A. baumannii* atsparume dalyvauja 5 pagrindinės OXA fermentų grupės: OXA-51, OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 ir OXA-143 (Ayoub Moubareck ir Hammoudi Halat, 2020).

B klasės metalo  $\beta$ -laktamazės (MBLs) yra dar viena  $\beta$ -laktamazių grupė, būdinga *A. baumannii* kamienams. Svarbiausia MBL fermentų savybė yra ta, kad jie sugeba skaldyti visus  $\beta$ -laktaminius antibiotikus, išskyrus monobaktamų grupės antibiotiką aztreonamą. MBL įgauna šią unikalią savybę dėl savo sudėtyje esančio cinko, kuris gali prisijungti prie EDTA ir inaktyvuoti ją. Pagrindinės MBL fermentų grupės, sutinkamos *A. baumannii* kamienuose yra IMP, VIM, SIM ir NDM. Idomu tai, kad IMP ir VIM fermentai, aptinkami *A. baumannii* kamienuose, originaliai buvo aptikti *Pseudomonas aeruginosa* izoliatuose Japonijoje ir Italijoje. Tuo tarpu SIM pirmą kartą buvo aptiktas Korėjoje, NDM pirmą kartą aptiktas *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatuose, išskirtuose iš keliautojų, atvykusių iš Indijos (Chen et al., 2011; Espinal et al., 2011).

Be  $\beta$ -laktamazių gamybos, *A. baumannii* kamienai yra išvystę ir nefermentinius atsparumo antibiotikams mechanizmus, tokius kaip išorinių baltymų ir eflukso pompų panaudojimą (Jeon et al., 2015). Išorinės membranos porinas CarO padeda klinikiniams *A. baumannii* izoliatams įgauti atsparumą karbapenemams, tokiems kaip imipenemas ir meropenemas (Benmahmod et al., 2019; Rumbo et al., 2013). RND (ang. *resistance-nodulation-division*) šeimos trikomponentė eflukso pompa AdeABC pasižymi skirtingų antibiotikų klasių pašalinimu iš bakterijos ląstelės (Jeon et al., 2015). Yra nustatyta, kad AdeABC eflukos pompos hiperraiška *A. baumannii* kamienuose yra atsakinga už atsparumą meropenemui (Chopra ir Roberts, 2001).

### 1.3.1.2. *A. baumannii* atsparumo mechanizmai aminoglikozidams

Pagrindinis aminoglikozidų atsparumo mechanizmas *A. baumannii* izoliatuose yra aminoglikozidus modifikuojantys fermentai (ang. *aminoglycoside-modifying enzymes*, AMEs), tokie kaip acetiltransferazė, nukleotidiltransferazė ir fosfotransferazė. Dažniausiai šiuos fermentus koduoja atsparumo genai *aphA6*, *aadA1*, *aadB*, *aacC1* ir *aacC2* (Hujer et al., 2006). Plačiam šių genų paplitimui pasaulyje padeda tai, kad šie genai yra išsidėstę mobiliuose genetiniuose elementuose, tokiuose kaip plazmidės ir I klasės integronai (Nemec et al., 2004). Japonijoje buvo aptiktas kitas aminoglikozidus modifikuojantis fermentas, kurį koduoja genas *aac(6')-Iad*.

Be to, atsparumo genas *armA* prisideda prie 16S rRNR metilinimo ir sukelia atsparumą amikacinui, gentamicinui ir tobramicinui (Doi et al., 2007; Doi ir Arakawa, 2007). Buvo nustatyta, kad efliukso pompos AdeABC taip pat gali padėti pašalinti skirtingus aminoglikozidus iš *A. baumannii* kamienų (Magnet et al., 2001).

#### 1.3.1.3. *A. baumannii* atsparumo mechanizmai fluorochinolonams

Atsparumą fluorochinolonams *A. baumannii* izoliatuose gali sukelti du mechanizmai: DNR gyrazės modifikaciniai pakitimai chinolonų atsparumo atpažinimo regionuose (ang. *quinolone resistance-determining regions*, QRDR) bei DNR topoizomerazėje IV. Šie pakitimai, koduojami atsparumo genų *gyrA* ir *parC*, sumažina jungties tarp chinolono ir DNR afiniškumą ir taip sumažinamas antibiotiko poveikis bakterijai. Kartais, *A. baumannii* izoliatams yra būdingas plazmidžių kontroliuojamas chinolonų atsparumas, koduojamas *qnr* geno, kuris labiausiai yra būdingas *Enterobacteriaceae* šeimos atstovams (Jiang et al., 2014; Touati et al., 2008).

#### 1.3.1.4. *A. baumannii* atsparumo mechanizmai polimiksinams

Dažnėjant atsparių antibiotikams klinikinių *A. baumannii* infekcijų, ypač atsparių karbapenemams, padidėjo polimiksino B ir kolistino vartojimas ligoninėse. Nors šiuo metu *A. baumannii* polimiksinams atsparių kamienų kol kas sutinkama nedažnai, tačiau rizika atsparumui išsivystyti yra didelė (Lima et al., 2018).

Dažniausias atsparumo polimiksinams mechanizmas gramneigiamose bakterijose yra neigiamo krūvio ant išorinės membranos neutralizavimas, esant lipido A modifikacijoms. Yra aptikta dvikomponentė sistema *pmrA/pmrAB*, kuri lemia lipido A modifikavimą pridėdant prie jo molekulės fosfoetanolaminą (Trebosc et al., 2019).

Kitas polimiksinų atsparumo mechanizmas, sutinkamas *A. baumannii* izoliatuose, yra lipopolisacharidų praradimas, esant lipido A biosintezės komponentų, tokių kaip *lpxA*, *lpxC* arba *lpxD*, mutacijoms (Moffatt et al., 2010). Šis mechanizmas yra pakankamai drastiškas patiems *A. baumannii* kamienams, nes veda prie fiziologinių išorinės membranos pakitimų, kurie padidina jautrumą kitų klasių antibiotikams bei priveda prie stambių membranos pažaidų (García-Quintanilla et al., 2015).

### 1.3.1.5. *A. baumannii* atsparumo mechanizmai tetraciklinams ir tigeciklinui

Atsparumas tetraciklinams *A. baumannii* izoliatuose atsiranda dėl eflukso pompų veikimo arba dėl ribosomų apsauginių baltymų (Huys et al., 2005). Yra nustatytos dvi transpozoniškai valdomos eflukso pompos. Pirmą iš jų, TetB reguliuoja tetraciklino ir minociklino išmetimą iš bakterinės ląstelės, tuo tarpu TetA eflukso pompa geba pašalinti iš ląstelės tik tetracikliną (Magnet et al., 2001). Ribosomų apsauginis baltymas, koduojamas *tet(M)* geno, apgaubia ribosomas ir taip apsaugo jas nuo tetraciklino, doksiciklino ir minociklino poveikio (Brown et al., 2019).

### 1.3.2.E. *E. coli* atsparumo antibiotikams mechanizmai

Antibiotikams atsparių ExPEC kamienų stebėseną ir pacientų gydymas tapo ypač sudėtingas nuo 1990-ųjų (Pitout ir Laupland, 2008). Nuo tada buvo nustatyta, kad prieš tai naudoti cefalosporinai, fluorochinolonai ir trimetoprimas-sulfametoksazolis efektyviam hospitalinių infekcijų gydymui tapo nebetinkami *E. coli* infekcijai gydyti, todėl padaugėjo pacientų sergamumas ir mirtingumas (Lautenbach et al., 2001; Tumbarello et al., 2007). Iki 1990-ųjų ExPEC kamienai buvo jautrūs pirmo pasirinkimo antibiotikams (I–II kartos cefalosporinai, fluorochinolonai ir trimetoprimas-sulfametoksazolis), tačiau jau 2000-aisiais metais Europoje, Šiaurės ir Pietų Amerikoje buvo nustatyti ExPEC pirmo pasirinkimo antibiotikų atsparumai, tarp 20–45 % visų hospitalinių ExPEC infekcijų (Foxman, 2010). Manoma, kad tai galėtų būti susiję su padidėjusių pirmo pasirinkimo antibiotikų naudojimu prieš ExPEC auginant mėsinis galvijus ir paukščius arba iš aplinkos atsirandančiais faktoriais (Dell'Orco et al., 2019; Pérez-Etayo et al., 2020).

#### 1.3.2.1. *E. coli* atsparumo mechanizmai

$\beta$ -Laktaminiai antibiotikai, ypač III kartos cefalosporinai, yra dažniausiai naudojami prieš visuomenėje įgautas bei hospitalines *E. coli* infekcijas (Livermore ir Woodford, 2006). *E. coli* prisitaikė gaminti skirtingas  $\beta$ -laktamazes, gebančias efektyviai hidrolizuoti šiuos antibiotikus (**1.2 lentelė**) (Paterson ir Bonomo, 2005).

**1.2 lentelė.**  $\beta$ -laktamazės, būdingos atspariems *E. coli* izoliatams (pagal Sora et al., 2021).

Fermentas	Ambler klasifikacija	Pavyzdžiai	Atsparumo antibiotikams spektras	Slopikliai
Plataus veikimo spektro $\beta$ -laktamazės, ESBL	Klasė A	CTX-M, TEM, SHV	Penicilinai Cefalosporinai Monobaktamai	Klavulaninė rūgštis, Avibaktamas, Vaborbaktamas, Relebaktamas, Tazobaktamas, Sulbaktamas
Plazmidžių reguliuojamos AmpC $\beta$ -laktamazės	Klasė C	CMY, FOX, ACT, MOX, ACC, DHA	Penicilinai Cefalosporinai Monobaktamai Cefamicinai	Kloksacilinas, Boro rūgštis
Metallo $\beta$ -laktamazės	Klasė B	IMP, VIM, NDM	Penicilinai Cefalosporinai Cefamicinai Karbapenemai	Metalų chelatoriai, pvz., EDTA ir dipikolino rūgštis
KPC karbapenemazės	Klasė A	KPC	Penicilinai Cefalosporinai Cefamicinai Karbapenemai	Klavulaninė rūgštis (silpnai), Avibaktamas, Vaborbaktamas, Relebaktamas, Tazobaktamas, Boro rūgštis
OXA $\beta$ -laktamazės	Klasė D	OXA-48, -181	Penicilinai Temocilinas Karbapenemai	Klavulaninė rūgštis, Avibaktamas, NaCl

Nuo 2000-ųjų metų visame pasaulyje paplito skirtingos plataus veikimo spektro (ang. *extended spectrum  $\beta$ -lactamase*, ESBL) CTX-M tipo  $\beta$ -laktamazės, be to jos buvo aptiktos skirtinguose *Enterobacteriaceae* šeimos atstovuose. Ypatinga įvairove pasižymėjo klinikiniai *E. coli* izoliatai (Pitout ir Laupland, 2008). CTX-M  $\beta$ -laktamazių atsiradimą hospitalinėse *E. coli* infekcijose paskatino šlapimo takų infekcijų pasikartojimai, inkstų patologijų buvimas, gydymui naudoti cefalosporinai ir fluorochinolonai, ankstesnės paciento hospitalizacijos, diabetas, netinkamai išgydytos kepenų patologijos bei pacientų kelionės į tokias šalis kaip Indija (Rodríguez-Baño ir Pascual, 2008).

CTX-M-15  $\beta$ -laktamazė yra dažniausiai aptinkama CTX-M  $\beta$ -laktamazė pasaulyje (Woodford et al., 2011). Pirmą kartą CTX-M-15  $\beta$ -laktamazę koduojantys genas buvo nustatyta Indijoje (Karim et al., 2001), vėliau genas



aptiktas Europoje (Poirel et al., 2002). Pirmą kartą CTX-M-15  $\beta$ -laktamazė Lietuvoje buvo nustatyta tige ciklino klinikinio tyrimo metu, tiriant klinikinius *E. coli* kamienus (Jones et al., 2009). Antra dažniausiai aptinkama CTX-M  $\beta$ -laktamazė pasaulyje – CTX-M-14  $\beta$ -laktamazė, kurią koduojantis genas buvo pirmą kartą nustatyta Korėjoje 1995 m. (Xu et al., 2011), geba efektyviai hidrolizuoti cefotaksimą, tačiau jos aktyvumas prieš ceftazidimą net 1000 kartų mažesnis (Chen et al., 2005). CTX-M-14  $\beta$ -laktamazė vyrauja Ispanijoje, Pietų Amerikoje ir Rytų Azijoje (Cantón ir Ruiz-Garbajosa, 2012), 2010 m. pirmą kartą CTX-M-14 fermentą koduojantys genas buvo aptiktas klinikiniuose *E. coli* kamienuose Lietuvoje (Šeputienė et al., 2010). CTX-M  $\beta$ -laktamazės įvairiose šalyse gali būti paplitę nevienodai, be to, vienas CTX-M fermento koduojantys genas gali keisti kitą CTX-M fermentą koduojantį geną toje pačioje šalyje (Chmielarczyk et al., 2013; Livermore et al., 2007). Įvairiose šalyse nustatytos skirtingos dominuojančios CTX-M  $\beta$ -laktamazės: Ispanijoje – CTX-M-14 ir CTX-M-9  $\beta$ -laktamazės, Kanadoje ir Kinijoje – CTX-M-14  $\beta$ -laktamazė, Italijoje – CTX-M-1  $\beta$ -laktamazė, Lenkijoje – CTX-M-3  $\beta$ -laktamazė, Anglijoje ir Lietuvoje – CTX-M-15  $\beta$ -laktamazė (Empel et al., 2008, Šeputienė et al., 2010), Japonijoje ir Izraelyje – CTX-M-2  $\beta$ -laktamazė (Bonnet, 2004; Vervoort et al., 2012).

*E. coli* kamienai gali įgauti chromosomoje (*campC*) arba plazmidėse (*pampC*) AmpC  $\beta$ -laktamazės koduojančius genus (Longhi et al., 2022). Šis fermentas dažniausiai yra produkuojamas bakterijose nedideliais kiekiais, nes AmpC genų raiška yra valdoma silpno promotoriaus (Sora et al., 2021). Tačiau AmpC  $\beta$ -laktamazė nėra inhibuojama tradiciniais  $\beta$ -laktaminių antibiotikų slopikliais, tokiais kaip klavulaninė rūgštis, sulbaktamas ir tazobaktamas, tik boro rūgštis ir kloksacilinas efektyviai inhibuoja šį fermentą (Doi ir Paterson, 2007). Be to buvo nustatyta, kad esant AmpC hiperekspresijai ir mutacijoms išorinės membranos porinuose, sumažėja *E. coli* jautrumas karbapenemams (Mammeri et al., 2010). Nors AmpC fermentas hospitalinėse *E. coli* infekcijose jau yra aptinkamas nuo 1980-ųjų, tačiau rizikos faktoriai, nuo kurių priklauso AmpC  $\beta$ -laktamazės ekspresija, iki šiol nėra nustatyti (Philippon et al., 2002). Yra nustatyta, kad pacientai, kuriuose yra aptiktas AmpC raišką koduojantys genai, turi panašius klinikinius požymius su pacientais, kuriuose buvo nustatytos TEM ir SHV plataus veikimo spektro  $\beta$ -laktamazės koduojantys genai (Pai et al., 2004).

Viena pirmųjų aptiktų metalo  $\beta$ -laktamazių (MBLs) *Klebsiella pneumoniae* ir *E. coli* klinikiniuose izoliatuose buvo NDM-1 (Yong et al., 2009). Šis fermentas geba hidrolizuoti skirtingus  $\beta$ -laktaminius antibiotikus, tokius kaip penicilinai, cefalosporinai ir karbapenemai, išskyrus monobaktamus (aztreonamą), bei yra inhibuojamas EDTA (Bush, 2015).

Buvo nustatyta, kad NDM  $\beta$ -laktamazės turinčios bakterijos pasižymėjo atsparumu ir kitoms antibiotikų grupėms, tokioms kaip aminoglikozidai ir fluorochinolonai (Nordmann et al., 2012). Be NDM klasės  $\beta$ -laktamazių, taip pat *E. coli* kamienuose yra sutinkami atsparumo fermentai VIM, IMP, SPM ir CcrA (Tooke et al., 2019), iš kurių IMP ir VIM gali būti pernešami horizontalios pernašos metu tarp skirtingų *Enterobacteriaceae* šeimos rūšių bakterijų (Nordmann et al., 2012).

*E. coli* taip pat išvystė atsparumo mechanizmus fluorochinolonams, kurie yra siejami su ESBL genais. Atsparumą fluorochinolonams gali koduoti tiek chromosomoje esantys, tiek plazmidėse esantys genai. Chromosomoje tai yra įvairios mutacijos, tokios kaip topoizomerazės IV ir DNR girazės mutacijos (Hopkins et al., 2005), bei išorinės membranos pralaidumo sumažėjimas ir eflukso pumpų hiperekspresija (Hooper, 1999). Tuo tarpu plazmidėse yra koduojami genai, kurie yra mobilūs, ir gali būti pernešti į kitas bakterijas. Tarp jų dažniausi koduojami fermentai yra Qnr, AAC(6')-Ib-cr, QepA ir OqxAB (Ruiz et al., 2012; Robicsek et al., 2006). Be to buvo nustatyta, kad fluorochinolonų atsparumą koduojančių genų *qnr* ir *aac(6')Ib-cr* ekspresija yra tiesiogiai susijusi su keliais  $\beta$ -laktamazės koduojančiais genais, tokiais kaip *bla<sub>CTX-M-14</sub>* ir *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (Schito et al., 2009; Walsh ir Rogers, 2012).

Apsisaugojimui nuo aminoglikozidų poveikio, *E. coli* išvystė keletą mechanizmų. Pirmasis mechanizmas yra antibiotikų inaktyvavimas, juos modifikuojant acetiltransferazių, nukleotidiltransferazių ir fosfotransferazių pagalba (Lindemann et al., 2012; Schultsz ir Geerlings, 2012). Kitas mechanizmas yra antibiotiko patekimo sumažinimas, pakeičiant išorinės bakterijos membranos pralaidumą bei vykdant eflukso pompos hiperekspresiją (Över et al., 2001). Galiausiai, atsparumas aminoglikozidams *E. coli* kamienuose išsivystė dėka 16S rRNR metilinimo, kurį reguliuoja ArmA/Rmt baltymų šeima (Zarubica et al., 2011). Yra nustatyta, kad 16S rRNR metilinimas yra svarbiausias šių laikų aminoglikozidų atsparumo mechanizmas, o ypač – metiltransferazės *armA* genas, kuris veikia skirtingus aminoglikozidus ir dažnai yra lydimas karbapenemazės koduojančių genų viename mobiliajame genetiniame elemente (Livermore et al., 2011; Galimand et al., 2005).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

#### 2.1.1. Reagentai

Darbe naudotos medžiagos, reagentai ir antibiotikai buvo gauti iš kompanijų:

- BioMaxima, Lenkija: Ampicilinas (10 µg), amoksicilinas/klavulaninėo rūgštis (20/10 µg), meropenemas (10 µg), cefuroksimas (30 µg), amikacinas (30 µg), ampicilinas/sulbaktamas (10/10 µg), cefotaksimas (5 µg), piperacilinas/tazobaktamas (30/6 µg), ceftazidimas (10 µg), ciprofloksacinas (5 µg), trimetoprimas/sulfametoksazolis (1.25/23.75 µg), gentamicinas (10 µg) ir imipenemas (10 µg).

- Lonza, Šveicarija: Agarozė.

- Merck KGaA, Vokietija: Absolutusis etanolis (100 %), 85 % Glicerolio tirpalas, Triptono sojos agaras milteliai.

- Metabion, Vokietija: BOX-PGR ir (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimo pradmenys, *Acinetobacter* spp. atsparumo ir MLVA-8 pradmenys; *E. coli* atsparumo, virulentiškumo, filogenetinių grupių ir MLVA pradmenys.

- OXOID, Anglija: Kraujo agaras bazė, Mueller–Hinton agaras.

- ROTH, Vokietija: Etidžio bromidas.

- Thermo Fisher Scientific, JAV: DNR fragmentų ilgio standartas GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, fragmentų ilgio standartas GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, fragmentų ilgio standartas GeneRuler Low Range DNA Ladder, 50× TAE buferis, GeneJET Genomic DNA Purification Kit, DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), AmpliTaq polimerazė, distiliuotas dejonizuotas vanduo.

#### 2.1.2. Bakterijų izoliatai

*Acinetobacter* spp. ir *E. coli* bakterijų izoliatai buvo fenotipiškai apibūdinti ir atrinkti pagal atsparumą antibiotikams Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL) Klinikinių tyrimų poskyryje. Bakterijų kultūros buvo atsiųstos iš 14 Lietuvos ligoninių laboratorijų epidemiologinei stebėsenai įtariant ESBL ar atsparumą karbapenemams, remiantis Sveikatos apsaugos ministro įsakymu „Klinikinių ir epidemiologiškai svarbių mikroorganizmų atsparumo antimikrobiniais vaistais stebėsenos ir duomenų apie mikroorganizmų atsparumą rinkimo, kaupimo, analizės ir informacijos pateikimo tvarkos aprašas“ (2013). Visi

klinikiniai mėginiai buvo išskirti iš pacientų, kuriems buvo diagnozuota sepsis bei bakterijų izoliatai surinkti iš kraujo ir/ar likvoro pasėlių.

Darbe naudoti 194 *Acinetobacter* spp. izoliatai, išskirti 2014, 2016 ir 2018 m. ir pasižymėję DAA. Iš šių izoliatų 59 buvo surinkti 2014 m., 40 izoliatų – 2016 m. ir 95 izoliatai – 2018 m.

Darbe naudoti 256 *E. coli* izoliatai, išskirti 2014 ir 2018 m. ir pasižymėję DAA. Iš šių izoliatų 91 izoliatas buvo atrinktas 2014 m. ir 165 izoliatai – 2018 m.

### 2.1.3. Oligonukleotidų pradmenys

Darbe naudoti oligonukleotidų pradmenys buvo pasirinkti remiantis literatūros šaltiniais. Informacija apie pradmenis pateikta **2.1** ir **2.2 lentelėse**.

#### 2.1 lentelė. *Acinetobacter* spp. izoliatų tyrime naudoti pradmenys.

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis	
<b>Atsparumo genai</b>					
Aminoglikozidus modifikuojančių baltymų (AMEs) genai	<i>aacC1 - F</i>	ATGGGCATCATTTCGCACATGT AGG	750	Hujer et al., 2006	
	<i>aacC1 - R</i>	TTAGGTGGCGGTACTTGGGTC			
	<i>aacC2 - F</i>	ATGCATACGCGGAAGGCAAT AAC	800		
	<i>aacC2 - R</i>	CTAACCGGAAGGCTCGCAAG			
	<i>aadB - F</i>	ATGGACACAACGCAGGTTCGC	495		
	<i>aadB - R</i>	TTAGGCCGCATATCGCGACC			
	<i>aadA1 - F</i>	ATGAGGGAAGCGGTGATCG	624		
	<i>aadA1 - R</i>	TTAGGCCGCATATCGCGACC			
	<i>aphA6 - F</i>	ATGGAATTGCCCAATATTATTC	736	Doi et al., 2007	
	<i>aphA6 - R</i>	TCAATTCAATTCATCAAGTTT TA			
	<i>armA - F</i>	ATTCTGCCTATCCTAATTGG	315		
	<i>armA - R</i>	ACCTATACTTTATCGTCGTC			
	<i>rmtB - F</i>	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA	173		
	<i>rmtB - R</i>	ATGCAATGCCGCGCTCGTAT			
<i>rmtC - F</i>	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	711			
<i>rmtC - R</i>	ATCCCAACATCTCTCCCACT				
Atsparumą chinolonams lemiančios sritys (QRDR)	<i>gyrA - F</i>	AAATCTGCCCGTGTCTGGTT	285		Hujer et a., 2006
	<i>gyrA - R</i>	GCCATACCTACGGCGATAACC			
	<i>parC - F</i>	AAACCTGTTTCAGCGCCGATT	276		
	<i>parC - R</i>	AAAGTTGTCTTGCCATTCACT			
	<i>qnrA - F</i>	GGGTATGGATATTATTGATAA AG	661		
	<i>qnrA - R</i>	CTAATCCGGCAGCACTATTA			

**Lentelės 2.1** tęsinys. *Acinetobacter* spp. izoliatų tyrime naudoti pradmenys.

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
Efliukso siurblio valdymo genai	<i>adeR - F</i>	ATGTTTGATCATTCTTTTCTT TTG	687	
	<i>adeR - R</i>	GTATAAAGTTTACAATTAATT		
	<i>adeE - F</i>	ATGTTGTCGAGTTTTTTTATTG CACG	550	
	<i>adeE - R</i>	CAATTTATGGTTTTTCCGTTTT ACT		
Atsparumo β-laktaminiams antibiotikams genai	<i>blacarO - F</i>	ATGAAAGTATTACGTGTTTTA GTG	294	Hujer et al., 2006
	<i>blacarO - R</i>	CCACATTTGAAGATGACCATT		
	<i>blaGES-11 - F</i>	ATGCGCTTCATTACGCAC	863	Moubareck et al., 2009
	<i>blaGES-11 - R</i>	CTATTTGTCCGTGCTCAGGA		
	<i>blaIMP-1 - F</i>	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG C	591	Gales et al., 2003
	<i>blaIMP-1 - R</i>	GAACAACCAGTTTTGCCTTAC C		
	<i>blaIMP-2 - F</i>	TGCCGCGGGAGCGGTTTTG	261	
	<i>blaIMP-2 - R</i>	GCCCTTTAACAGCCTGTTC		
	<i>blaNDM - F</i>	GAAGCTGAGCACCAGATTAG	761	Shokri et al., 2017
	<i>blaNDM - R</i>	TGCGGGCCGTATGAGTGATT		
	<i>blaOXA subgroup-1 - F</i> ( <i>blaOXA-23, blaOXA-27, blaOXA-49</i> )	TCGGATTGGAGAACCAGAAA A	513	
	<i>blaOXA subgroup-1 - R</i>	GTATAGATGCCGGCATTCTG A		
	<i>blaOXA subgroup-2 - F</i> ( <i>blaOXA-24, blaOXA-25, blaOXA-26, blaOXA-40, blaOXA-72</i> )	GATGAAGCTCAAACACAGGG	246	
	<i>blaOXA subgroup-2 - R</i>	ATGATTCCAAGATTTCTAGC G		
	<i>blaOXA subgroup-3 F</i> ( <i>blaOXA-51, blaOXA-64, blaOXA-65, blaOXA-66, blaOXA-68, blaOXA-69, blaOXA-70, blaOXA-71, blaOXA-75, blaOXA-76, blaOXA-77, blaOXA-78</i> )	CTCGTGCTTCGACCGAGTAT	686	Pasterán et al., 2006
<i>blaOXA subgroup-3 R</i>	GCTGAACAACCCATCCAGTT			
<i>blaOXA subgroup-4 F</i> ( <i>blaOXA-58</i> )	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	504		
<i>blaOXA subgroup-4 R</i>	TACGACGTGCCAATTCTTGA			

**Lentelės 2.1 tęsinys. *Acinetobacter* spp. izoliatų tyrime naudoti pradmenys.**

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
	<i>blaOXA-51 - F</i>	ATGAACATTAAGCACTC	1107	Turton et al., 2006
	<i>blaOXA-51 - R</i>	CTATAAAAATACCTAATTGTT C		
	<i>blaPER-1 - F</i>	ATGAATGTCATTATAAAAGC	715	Poirel et al., 2005
	<i>blaPER-1 - R</i>	AATTTGGGCTTAGGGCAGA A		
	<i>blaRTG-4 - F</i>	CTCACGCTATCATTAAATGC	450	Potron et al., 2009
	<i>blaRTG-4 - R</i>	TCAAACGAGGGCGTCTGTCT CTG		
	<i>blaTEM-92 - F</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGA A	310	Endimiani et al., 2007
	<i>blaTEM-92 - R</i>	ATATGAGTAAGCTTGGTCTG ACAG		
	<i>blaVEB-1 - F</i>	GGAACAACCTTGGACGATTG A	542	Pasterán et al., 2006
	<i>blaVEB-1 - R</i>	CCCTGTTTTATGAGCAACA A		
	<i>blaVIM-1 - F</i>	AGTGGTGAGTATCCGACAG	261	Tsakris et al., 2000
	<i>blaVIM-1 - R</i>	ATGAAAGTGCGTGGAGAC		
<b>MLVA- 8 genai</b>				
MLVA genotipavimo genai	<i>Abaum_3530-L</i>	TGCAACCGGTATTCTAGGA AC	162-642	Pourcel et al., 2011
	<i>Abaum_3530-R</i>	CCTTGAACAACATCGATTA C TGG A		
	<i>Abaum_3002-L</i>	GACTGAAGCAAGACTAAA ACGT	428-596	
	<i>Abaum_3002-R</i>	TCTGGGCAGCTTCTTCTTG AGC		
	<i>Abaum_2240-L</i>	CCCGCAGTACATCATGGTTC	204-538	
	<i>Abaum_2240-R</i>	AGAACATGTATACGCAACT G		
	<i>Abaum_1988-L</i>	GGCAAGGCATGCTCAAGGG CC	136-447	
	<i>Abaum_1988-R</i>	CAGTAGACTGCTGGTTAAT GAG		
	<i>Abaum_0826-L</i>	TGACTACTGAAACAGTTTT TG	415-649	
	<i>Abaum_0826-R</i>	ATGATTGTACCGAGTAAAA GA		
	<i>Abaum_0845-L</i>	AATTTTAATTCCAAATTGCT CC	129-346	
	<i>Abaum_0845-R</i>	ACTTAAAATCGCATTTTTAT CA		
	<i>Abaum_2396-L</i>	CAAGTCCAATCAACTCATG ATG	147-315	
	<i>Abaum_2396-R</i>	CTCCTGTAAGTGCTGTTC A GCC		

**Lentelės 2.1 tęsinys. *Acinetobacter* spp. izoliatų tyrime naudoti pradmenys.**

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
	<i>Abaum_3468-L</i>	CAGAAGTCACTGCATCTGC AAC	350-429	
	<i>Abaum_3468-R</i>	CGGTTGAAATTTTTATAAT GAAG		

**2.2 lentelė. *E. coli* izoliatų tyrime naudoti pradmenys.**

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis	
<b>Atsparumo genai</b>					
Atsparumo β-laktaminiams antibiotikams genai	<i>blaCMY-2 - F</i>	CAATGTGTGAGAAGCAGTC	1432	Li et al., 2008	
	<i>blaCMY-2 - R</i>	CGCATGGGATTTTCCTTGCT G			
	<i>Multiplex II CTX-M group 1 - F</i>	TTAGGAARTGTGCCGCTGY A	688	Alyamani et al., 2017	
	<i>Multiplex II CTX-M group 1 - R</i>	CGATATCGTTGGTGGTRCCA T			
	<i>Multiplex II CTX-M group 2 - F</i>	CGTTAACGGCAGCATGAC	404		
	<i>Multiplex II CTX-M group 2 - R</i>	CGATATCGTTGGTGGTRCCA			
	<i>Multiplex II CTX-M group 9 - F</i>	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561		
	<i>Multiplex II CTX-M group 9 - R</i>	TGATTCTCGCCGCTGAAG			
	<i>Multiplex III CTX-M group 8/25 - F</i>	AACRCRCAGACGCTCTAC	326		
	<i>Multiplex III CTX-M group 8/25 - R</i>	TCGAGCCGGAASGTGYAT			
	<i>Multiplex SHV - F</i>	GCCGCTTGAGCAAATTAAC	713		
	<i>Multiplex SHV - R</i>	ATCCCGCAGATAATCACCAC			
	<i>Multiplex I TEM - F</i>	CATTCCGTGTCGCCCTTATT C	800		
	<i>Multiplex I TEM - R</i>	CGTTCATCCATAGTTGCCTGA C			
	<i>blaAIM - F</i>	CTGAAGGTGTACGGAAACAC	322		Poirel et al., 2011
	<i>blaAIM - R</i>	GTTCCGGCCACCTCGAATTG			
	<i>blaIMP - F</i>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCT C	232		
	<i>blaIMP - R</i>	GGTTAAYAAAACAACCACC			
<i>blaDIM - F</i>	GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG	699			
<i>blaDIM - R</i>	CGTTCGGCTGGATTGATTG				
<i>blaGIM - F</i>	TCGACACACCTTGGTCTGAA	477			
<i>blaGIM - R</i>	AACTTCCAACCTTGCCATGC				
<i>blaSIM - F</i>	TACAAGGGATTCGGCATCG	570			
<i>blaSIM - R</i>	TAATGGCCTGTCCCATGTG				

**Lentelės 2.2 tęsinys. *E. coli* izoliatų tyrime naudoti pradmenys.**

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
	<i>blaSPM - F</i>	AAAATCTGGGTACGCAAAC G	271	
	<i>blaSPM - R</i>	ACATTATCCGCTGGAACAG G		
	<i>blaVIM - F</i>	GATGGTGTGGTTCGCATA	390	
	<i>blaVIM - R</i>	CGAATGCCGAGCACCAG		
	<i>blaKPC - F</i>	TGTCACTGTATCGCCGTC	1011	
	<i>blaKPC - R</i>	CTCAGTGTCTACAGAAAA CC		
	<i>blaNDM - F</i>	GTCTGGCAGCACACTTCT A	465	
<i>blaNDM - R</i>	AGTGCTCAGTGTCCGCATC			
Atsparumo fosfomicinui genas (glutatioono S-transferazė)	<i>fosA - F</i>	ATCTGTGGGTCTGCCTGTC GT	271	Benzerera et al., 2017
	<i>fosA - R</i>	ATGCCCGCATAGGGCTTCT		
Atsparumo aminoglikozidams genai	<i>aac(3)IV - F</i>	TGCTGGTCCACAGCTCCTT C	653	
	<i>aac(3)IV - R</i>	CGGATGCAGGAAGATCAA		
	<i>aadA - F</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGC C	525	
	<i>aadA - R</i>	AATGCCCAGTCGGCAGCG		
	<i>strA - F</i>	CCTGGTGATAACGGCAATT C	546	
	<i>strA - R</i>	CCAATCGCAGATAGAAGGC		
	<i>strB - F</i>	ATCGTCAAGGGATTGAAAC C	509	
<i>strB - R</i>	GGATCGTAGAACATATTGGC			
Atsparumo tetraciklinams genai	<i>tetA - F</i>	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	502	Boerlin et al., 2005
	<i>tetA - R</i>	CGGCAGGCAGAGCAAGTA GA		
	<i>tetB - F</i>	CATTAATAGGCGCATCGCTG	930	
	<i>tetB - R</i>	TGAAGGTCATCGATAGCAG G		
	<i>tetC - F</i>	GCTGTAGGCATAGGCTTGG T	888	
	<i>tetC - R</i>	GCCGGAAGCGAGAAGAAT CA		
Atsparumo sulfonamidams genai	<i>sul1 - F</i>	GTGACGGTGTTCGGCATT T	779	
	<i>sul1 - R</i>	TCCGAGAAGGTGATTGCGC T		
	<i>sul2 - F</i>	CGGCATCGTCAACATAACC T	721	
	<i>sul2 - R</i>	TGTGCGGATGAAGTCAGCT C		
	<i>sul3 - F</i>	GAGCAAGATTTTGAATC G		



**Lentelės 2.2 tęsinys. *E. coli* izoliatų tyrime naudoti pradmenys.**

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
	<i>sul3 - R</i>	CATCTGCAGCTAACCTAGG GCTTTGGA		
Atsparumo kolistinui genas	<i>mcr-1 - F</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	Liu et al., 2016
	<i>mcr-1 - R</i>	CTTGGTCGGTCTGTA GGG		
<b>Virulentiškumo genai</b>				
Adhezinas: Dr prisijungimo adhezinas	<i>afaB/C - F</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATA ACTCTC	750	Daigle et al., 1994
	<i>afaB/C - R</i>	CATCAAGCTGTTTGTTCGTC CGCCG		
Adhezinas: P fimbrija	<i>papC - F</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGT GTGGCG	328	
	<i>papC - R</i>	ATATCCTTTCTGCAGGGATG CAATA		
Adhezinas: S fimbrija	<i>sfaD/E - F</i>	CGGAGGAGTAATTACAAAC CTGGCA	410	
	<i>sfaD/E - R</i>	CTCCGGAGAACTGGGTGCA TCTTAC		
Toksinas: nekrozės I tipo citotoksinis faktorius	<i>cnf1 - F</i>	AAGATGGAGTTTCCTATGC AGGAG	498	Yamamoto et al., 1995
	<i>cnf1 - R</i>	CATTCAGAGTCTGCCCTC ATATT		
Toksinas: α hemolizinas	<i>hlyA - F</i>	AACAAGGATAAGCACTGTT CTGGCT	1177	
	<i>hlyA - R</i>	ACCATATAAGCGGTCATCCC GTCA		
Toksinas: kolicinas V	<i>evaC - F</i>	CACACACAAACGGGAGCT GTT	680	
	<i>evaC - R</i>	CTTCCCGCAGCATAGTTCC AT		
Toksinas: IbeA ląstelės invazinas	<i>ibeA - F</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGT AC	170	Johnson ir Stell, 2000
	<i>ibeA - R</i>	TGGTGCTCCGGCAAACCAT GC		
Adhezinas: I tipo fimbrija	<i>fimH - F</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGT GG	508	
	<i>fimH - R</i>	GCAGTCACCTGCCCTCCGG TA		
Sideroforas: jersinijabaktinas	<i>fyuA - F</i>	TGATTAACCCCGCGACGGG AA	880	
	<i>fyuA - R</i>	CGCAGTAGGCACGATGTTG TA		
Sideroforas: salmocherinas	<i>iroN - F</i>	AAGTCAAAGCAGGGTTGC CCG	665	
	<i>iroN - R</i>	GACGCCGACATTAAGACGC AG		

**Lentelės 2.2 tęsinys. *E. coli* izoliatų tyrime naudoti pradmenys.**

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
Atsparumas serumui: kapsulės K1 ir K5	<i>kpsMTHI - F</i>	GCGCATTGCTGATACTGTG TTG	272	
	<i>kpsMTHI - R</i>	CATCCAGACGATGAGCAC G		
Toksinas: autotransporterio toksinas	<i>sat - F</i>	GTTGTCTCTGGCTGTTGCG	501	Ananias ir Yano, 2008
	<i>sat - s</i>	AATGATGTTCCCTCCAGAGC		
Atsparumas serumui: atsparumo komplementui baltymas	<i>traT - F</i>	GGTGTGGTGCGATGAGCAC AG	290	Johnson ir Stell, 2000
	<i>traT - R</i>	CACGGTTCAGCCATCCCTG AG		
<b>Filogenetinės grupės</b>				
Filogenetinių grupių nustatymo genai	<i>arpA - F</i>	ACGCTATTGCCAGCTTGC	400	Clermont et al., 2013
	<i>arpA - R</i>	TCTCCCCATACCGTACGCTA		
	<i>arpA - F</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATA TGCC	301	
	<i>arpA - R</i>	GAAAAGAAAAAGAATTCCC AAGAG		
	<i>chuA - F</i>	ATGGTACCGGACGAACCAA C	288	
	<i>chuA - R</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGAC A		
	<i>trpA - F</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGA G	219	
	<i>trpA - R</i>	CTGCGCCGGTCACGCC		
	<i>TspE4.C2 - F</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
	<i>TspE4.C2 - R</i>	AGTTTATCGCTGCGGGTCG C		
<i>yjaA - F</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGA G	211		
<i>yjaA - R</i>	AATGCGTTCCTCAACCTGT G			
<b>MLVA genai</b>				
MLVA genotipavimo genai	<i>VR1 - F</i>	ATTATTGGCGGAGCTTCTG	~120	Kawamori et al., 2008
	<i>VR1 - R</i>	TCTGGCTGCAATAAAAAGA CG		
	<i>VR2 - F</i>	TGATCCCAAGTTACGCCATT	~285	
	<i>VR2 - R</i>	GACGATGACAATCACCACC A		
	<i>VR3 - F</i>	AGCATCATCACCACGATCA C	~108	
	<i>VR3 - R</i>	ACTCTTCGTTGTGCGCATGT		
	<i>VR4 - F</i>	AATCGAAATACATGAACTA AAGAAAAA	~129	
	<i>VR4 - R</i>	CCAATTGAATCTACAGTGG TCTG		

**Lentelės 2.2 tęsinys. *E. coli* izoliatų tyrime naudoti pradmenys.**

Taikinys	Pradmuo	Seka (5'-3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
	<i>VR5 - F</i>	CTGCCGGAGTATCAGCTTG	~122	
	<i>VR5 - R</i>	GGAAAACTGATGCAGACT CG		
	<i>VR6 - F</i>	ACGCGAAGCTAACAAGGA AA	~258	
	<i>VR6 - R</i>	CCTTTACAACTCACCTGCG AAT		
	<i>VR7 - F</i>	AACCCGGAATGGAAAATCT C	~278	
	<i>VR7 - R</i>	CAATGTCAGAGCGAAAAAT GTC		
	<i>VR8 - F</i>	GCTGCAGTTGCTCGGTTTT A	~145	
	<i>VR8 - R</i>	GAGTTTGACGATGGCGATC TA		

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Izoliatų kultivavimas ir identifikavimas

Iš skirtingų Lietuvos ligoninių pacientų išskirti ir atsiųsti izoliatai buvo papildomai kultivuojami kraujo agare ( $35 \pm 1^\circ \text{C}$  temperatūroje, 17–24 h) bei buvo atliktas diskų difuzijos metodas.

Diskų difuzijos metodui ant sustingusios standžios mitybinės terpės (Mueller–Hinton agaro) buvo tolygiai pasėjamos tam tikra tiriamųjų mikroorganizmų koncentracija suspensijoje ištirpinta  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ir  $\text{BaCl}_2$  tirpalo (nustatoma atitinkamai McFarlando drumstumo standarto rodmeniui - 0,5) tūryje. Popieriniai diskiniai filtrai, impregnuoti tam tikra konkrečia antimikrobine medžiaga, buvo dedami ant agaro paviršiaus, kuris buvo inokuliuotas tiriamaisiais mikroorganizmais. *Acinetobacter* spp. izoliatams diskų difuzijos metode buvo naudojami nurodytų koncentracijų antibiotikų diskai: meropenemas – 10  $\mu\text{g}$ , ciprofloksacinas – 5  $\mu\text{g}$ , trimethoprimas/sulfametoksazolis – 1,25/23,75  $\mu\text{g}$ , gentamicinas – 10  $\mu\text{g}$ , amikacinas – 30  $\mu\text{g}$  ir imipenemas – 10  $\mu\text{g}$ . *E. coli* izoliatams buvo naudojami šie antibiotikai su nurodytomis koncentracijomis: ampicilinas – 10  $\mu\text{g}$ , amoksicilinas/klavulano rūgštis – 20/10  $\mu\text{g}$ , meropenemas – 10  $\mu\text{g}$ , cefuroksimas – 30  $\mu\text{g}$ , amikacinas – 30  $\mu\text{g}$ , ampicilinas/sulbaktamas – 10/10  $\mu\text{g}$ , cefotaksimas – 5  $\mu\text{g}$ , piperacilinas/tazobaktamas – 30/6  $\mu\text{g}$ , ceftazidimas – 10  $\mu\text{g}$ , ciprofloksacinas – 5  $\mu\text{g}$ , trimetoprimas/sulfametoksazolis – 1,25/23,75  $\mu\text{g}$ , gentamicinas – 10  $\mu\text{g}$  ir imipenemas – 10  $\mu\text{g}$ . Petri lektelės su

inokuliuotai mikroorganizmais buvo kultivuojami  $35 \pm 1^\circ \text{C}$  temperatūroje, 16–20 h (Watts et al., 2008).

Taip pat buvo naudojamas kolistino E-testas. *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* izoliatams, kuriems buvo nustatytas fenotipinis atsparumas karbapenemams (imipenemui ir/ar karbapenemui). Šis metodas yra diskų difuzijos metodo atitikmuo, turintys esminis skirtumą – tyrimas atliekamas ne naudojant antibiotkų diskus, turinčius tam tikrą antibiotiko kiekį, bet naudojant E testus, t.y. juosteles, kuriose yra antibiotiko kiekio gradientas – nuo didžiausio iki mažiausio. Po tiriamųjų mikroorganizmų pasėlių inkubacijos  $35 \pm 1^\circ \text{C}$  temperatūroje, 16–20 h matoma elipsoidinės išvaizdos jų dauginimosi slopinamoji sritis. Atsižvelgiant į tą vietą, kurioje nėra mikroorganizmų matomų kolonijų, nustatoma tiriamųjų mikroorganizmų atitinkamo antibiotiko minimali slopinamoji koncentracija.

Diskų difuzijos metodo ir E-testo vertinimas buvo atliktas remiantis EUCAST reikalavimais (2014, 2016 ir 2018 metų reikalavimais).

Fenotipinis izoliatų atsparumas taip pat buvo tikrinamas naudojant/taikant automatinę VITEK ®2 sistemą (bioMérieux, Prancūzija). Izoliatų kultivavimas ant kraujo agaro ir diskų difuzijos metodas buvo atlikti NVSPL laboratorijos darbuotojų. Diskų difuzijos metodo vertinimas taip pat buvo atliktas NVSPL specialistų.

Ant kraujo agaro terpės išauginus gryną izoliatų kultūrą, buvo atliktas papildomas rūšies identifikavimas naudojant MALDI-TOF bioanalizatorių (Brucker, JAV). Visų izoliatų rūšys buvo patvirtintos NVSPL laboratorijoje esančia įranga.

### 2.2.2. Izoliatų genominės DNR išskyrimas

Genominės DNR išskyrimui fenotipiškai patikrinti izoliatai buvo išauginti ant triptono sojos agaro, naudojant šias sąlygas:  $30^\circ \text{C}$ , 12 val. Genominė DNR buvo išskirta naudojant GeneJET genominės DNR gryninimo rinkinį, darbas atliktas pagal gamintojo rekomendacijas. Genominės DNR iškirimas buvo patikrinamas elektroforezės 1 % agarozės gelyje būdu. Konkreti kiekvieno izoliato genominės DNR koncentracija matuota nebuvo, nes ji neturėjo tiesioginės reikšmės tolimesniai tyrimų eigai ir rezultatams.

### 2.2.3. Atsparumo genų charakterizavimas

Tiriamieji *Acinetobacter* spp. izoliatus buvo analizuojami 28 atsparumo genai, o *E. coli* izoliatuose – 29 genai. Pradmenys buvo parinkti remiantis skirtingais literatūros šaltiniais (2.1 ir 2.2 lentelės).

Atsparumo genų aptikimui buvo taikoma PGR (polimerazės grandininė reakcija). 50 µL PGR reakcijos mišinio sudarė: DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), dejonizuotas vanduo, 0,25 µM kiekvieno pradmens ir 1 µL izoliato genomines DNR. PGR reakcijų sąlygos buvo parinktos remiantis atitinkamais literatūros šaltiniais.

PGR produktų aptikimas ir vizualizavimas atliktas horizontalios elektroforezės 1 % agarozės gelyje būdu. Elektroforezė vykdoma naudojant 120 V srovę elektroforezės aparate „Sub-Cell GT“ (BIO-RAD, JAV). DNR stebima apšviečiant gelį 302 nm bangos ilgio ultravioletiniais spinduliais transiliumatoriuje „Gel DocDNr (Minibis Pro)“ (DNR Bio Imaging System, Izraelis). Elektroforezės rezultatai buvo vertinami rankiniu būdu vertinant vizualizuotus PGR produktus pagal literatūros šaltiniuose nurodytus genų dydžius.

### 2.2.4. Virulentiškumo genų nustatymas

Virulentiškumo genų paieška atlikta tik *E. coli* kamienuose. Iš viso analizuota 13 genų (2.1 lentelė ir 2.2 lentelė). Šie genai koduoja keturis patogeninių bakterijų virulentiškumo faktorius: toksinų gamybą, atsparumą šeimininko serumo sistemai, geležies pasisavinimo mechanizmus bei adhezinių grupę. Pradmenys buvo parinkti remiantis skirtingais literatūros šaltiniais (2.1 lentelė ir 2.2 lentelė).

Virulentiškumo genų aptikimui buvo taikoma PGR. 50 µL PGR reakcijos mišinio sudarė: DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), dejonizuotas vanduo, 0,25 µM kiekvieno pradmens ir 1 µL izoliato genomines DNR. PGR reakcijų sąlygos buvo parinktos remiantis atitinkamais literatūros šaltiniais.

PGR produktų aptikimas ir vizualizavimas atliktas horizontalios elektroforezės 1 % agarozės gelyje būdu. Elektroforezė vykdoma naudojant 120 V srovę elektroforezės aparate „Sub-Cell GT“. DNR stebima apšviečiant gelį 302 nm bangos ilgio ultravioletiniais spinduliais transiliumatoriuje „Gel DocDNr (Minibis Pro)“. Elektroforezės rezultatai buvo vertinami rankiniu būdu vertinant vizualizuotus PGR produktus pagal literatūros šaltiniuose nurodytus genų dydžius.

### 2.2.5. Izoliatų genotipavimas

Atsparių antibiotikams *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* kamienų plitimui tarp Lietuvos ligoninių nustatyti buvo naudojami keli genotipavimo metodai. Pirminiam izoliatų suskirstymui buvo naudojamas BOX-PGR metodas (Dombek et al., 2000). Izoliatų suskirsčius į grupes, identiškus elektroforetinius profilius turėję izoliatai buvo papildomai genotipuoti naudojant (GTG)<sub>5</sub>-PGR metodą (Versalovic et al., 1994). Tiek BOX-PGR, tiek (GTG)<sub>5</sub>-PGR 50 µL reakcijos mišinio buvo sudaryti iš DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), dejonizuoto vandens, 0,5 µM pradmens ir 1 µL izoliato genomines DNR. BOX-PGR naudotas pradmuo BOXA1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG-3'), o (GTG)<sub>5</sub>-PGR – pradmuo (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTG GTG GTG GTG GTG -3'). PGR produktai vizualizuoti elektroforezės pagalba 1 % agarozės gelyje bei vėliau apdoroti grafinėmis skaičiavimo programomis.

Po BOX-PGR ir (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimų, atliktas MLVA genotipavimas pagal Pourcel et al. (2011) pateiktas rekomendacijas *Acinetobacter* spp. izoliatams ir Kawamori et al. (2008) rekomendacijas *E. coli* izoliatams. 50 µL reakcijos mišinio sudarė DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), dejonizuoto vandens, 0,5 µM MLVA pradmens bei 1 µL genomines izoliato DNR. Gauti MLVA produktai buvo analizuojami elektroforezės pagalba, naudojant 3 % agarozės gelį S pasikartojimų analizei ir 2 % agarozės gelį L pasikartojimų analizei (Pourcel et al., 2011; Kawamori et al., 2008). Elektroforezė vykdoma naudojant 60 V srovę elektroforezės aparate „Sub-Cell GT“, 2-3 valandas. Tandeminių pasikartojimų skaičius visuose MLVA lokusuose buvo analizuojamas rankiniu būdu, atsižvelgiant į PGR produkto dydį. PGR produkto dydį sudarė: pradmenų dydžių suma, tandeminių pasikartojimų skaičius ir atstumas tarp pradmens ir tandeminio pasikartojimo. Tandeminių pasikartojimų dydis buvo sugretinamas su *A. baumannii* ATCC 17978 kamieniu genotipuojant *Acinetobacter* spp. izoliatų ir su *E. coli* O157:H7 EDL933 kamieniu genotipuojant *E. coli* izoliatų.

### 2.2.6. Filogenetinių grupių nustatymas

*E. coli* izoliatams atlikta filogenetinių grupių analizė (A, B1, B2, C, D, E ir F), remiantis Clermont et al. (2013) rekomendacijomis, naudojant *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2*, *arpA* ir *trpA* genus. Genai buvo nustatyti taikant PGR, kurias sudarė: DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), dejonizuoto vandens, 0,25 µM kiekvieno pradmens ir 1 µL genomines izoliato DNR. Po PGR reakcijos, produktai buvo analizuojami elektroforezės būdu naudojant 1 % agarozės gelį.

### 2.2.7. Duomenų analizė ir vizualizavimas

Izoliatų BOX-PGR ir (GTG)<sub>5</sub>-PGR elektroforetiniai profiliai buvo analizuojami naudojant BioNumerics 7.0 ir 8.0 programinę įrangą (Applied Maths, Belgija) bei programą filogenetiniams medžiams vizualizuoti Tree Of Life (iTOL), versiją 6 (Letunic et al., 2021). Aptikus izoliatų genotipinius profilius buvo sukonstruotos dendrogramos naudojant nesvertos poros grupės metodą su aritmetiniu vidurkiu UPGMA (angl. *unweighted-pair group method with the arithmetic mean*). Taip pat remiantys (GTG)<sub>5</sub>-PGR dendrogramų duomenimis buvo nustatomas genetinis atstumas tarp tiramų izoliatų, kurio reikšmei esant mažesnei nei 0,5 (arba 50 %) izoliatai buvo laikomi genetiškai labai artimais, tačiau reikšmei esant daugiau nei 0,5 (daugiau nei 50 %) izoliatai buvo laikomi genetiškai nutolusiais.

Filogenetinių grupių nustatymas buvo atliekamas naudojantis Clermont et al. (2000; 2013) rekomendacijomis. Remiantis nustatyty genų kombinacijomis buvo paruoštos dendrogramos naudojant UPGMA.

MLVA elektroforetiniai profiliai buvo analizuojami rankiniu būdu, o kintantis tandeminių pasikartojimų skaičius (VNTR) buvo apskaičiuotas naudojantis Pourcel et al. (2011) bei Kawamori et al. (2008) rekomendacijomis. Dendrogramos buvo paruoštos naudojant UPGMA. Minimaliai apimantis medis (ang. *minimum spanning tree, MST*) buvo paruoštas remiantis VNTR alelių profiliais, naudojant PHYLOViZ Online programą (Ribeiro-Gonçalves et al., 2016).

Norint įvertinti MLVA VNTR alelių genetinę įvairovę priklausomai nuo skirtingų izoliatų išskyrimo metų bei skirtingų lignoninių, buvo apskaičiuotas Nei įvairovės indeksas ( $D$ ) (Nei, 1973), kurio reikšmė buvo nustatyta remiantis Harris ir DeGiorgio (2017) supaprastinta formule didelėms populiacijoms tirti:  $D = 1 - \Sigma(\text{alelio pasikartojimo dažnis})^2$ .

Nustatant atsparumo determinančių kaitą skirtingais metais bei jų priklausomybę nuo lignoninių, buvo naudojami  $\chi^2$  arba Fisher testai.  $p$  reikšmei esant  $\leq 0,05$  buvo laikoma, kad skirtumas yra statistiškai reikšmingas. Statistinė analizė atlikta kompiuterinėmis programomis SPSS (versija 10.0; SPSS Inc., JAV) bei MS Excel (Microsoft, JAV).

### 3. REZULTATAI

#### 3.1. *Acinetobacter* spp. antibiotikams atsparių izoliatų analizė

Pirmoje šio darbo dalyje buvo norima atskleisti *Acinetobacter* spp. klinikinių izoliatų atsparumo antibiotikams determinantes, įvertinti atsparių antibiotikams kamienų kaitą skirtingais tyrimo metais bei jų genetinį pasiskirstymą, taip pat įvertinti antibiotikų atsparumų priklausomybę nuo ligoninių, iš kurių izoliatai buvo išskirti. Tam buvo atrinkti 194 *Acinetobacter* spp. izoliatai, priklausantys *A. baumannii* grupei, išskirti 2014, 2016 ir 2018 metais iš 14 Lietuvos ligoninių. Izoliatų pasiskirstymas skirtingais metais ir skirtingose ligoninėse yra pateiktas **3.1 lentelėje**.

#### 3.1 lentelė. Tyrime naudoti *Acinetobacter* spp. izoliatai.

	Izoliatų skaičius metais			
	2014	2016	2018	Iš viso
Ligoninė I	34	16	35	85
Ligoninė II	3	0	0	3
Ligoninė III	0	0	5	5
Ligoninė IV	0	3	6	9
Ligoninė V	0	1	3	4
Ligoninė VI	3	2	1	6
Ligoninė VII	1	0	5	6
Ligoninė VIII	13	8	24	45
Ligoninė IX	0	0	1	1
Ligoninė X	1	1	4	6
Ligoninė XI	2	2	3	7
Ligoninė XII	0	0	1	1
Ligoninė XIII	2	6	6	14
Ligoninė XIV	0	1	1	2

Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL) visiems izoliatams buvo patikrintas fenotipinis atsparumas antibiotikams,



remiantis EUCAST reikalavimais (2014, 2016 ir 2018 metų reikalavimai). Visi tyrime naudoti *Acinetobacter* spp. izoliatai turėjo atsparumą trečios kartos cefalosporinams (vienam ar keliems) ir / arba turėjo fenotipinį atsparumą vienam arba keliems karbapenemams. Tik po to izoliatai buvo naudoti tyrime.

### 3.1.1. *Acinetobacter* spp. izoliatų atsparumo genų charakterizavimas

Visiems atrinktiems *Acinetobacter* spp. izoliatams buvo atlikta atsparumo determinančių paieška, remiantis skirtingais galimais atsparumo mechanizmais. Šiems rezultatams gauti, tirti atsparumo genai buvo suskirstyti į keturias grupes: atsakingus už atsparumą aminoglikozidams (8 genai), atsakingus už atsparumą chinolonams (3 genai), už atsparumą  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams (17 genų) ir už efliukso pompų reguliavimą (2 genai). Iš viso buvo tirti 28 atsparumo genai, iš kurių du, *adeE* ir *aacC1*, atsakingi už atsparumą aminoglikozidams ir už efliukso pompos reguliavimą atitinkamai, nebuvo aptikti nei viename iš tirtų izoliatų.

Atrinktų atsparumo genų rezultatai parodė, kad dažniausi atsparumo genai tarp visų tirtų *Acinetobacter* spp. izoliatų buvo *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-3* (aptikti 100 % visų tirtų izoliatų), *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-1* (99,5 %), *bla<sub>OXA-51</sub>* (98,9 %), *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-2* (97 %), *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-4* (86 %), *bla<sub>VIM-1</sub>* (76,2 %), *bla<sub>TEM-92</sub>* (69,9 %), *bla<sub>GES-11</sub>* (66 %), *parC* (63 %), *aacC2* (61,3 %) ir *aphA6* (52,1 %). Aštuoni šios grupės genai (*bla<sub>OXA</sub> subgrupė-3*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-1*, *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-2*, *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-4*, *bla<sub>VIM-1</sub>*, *bla<sub>TEM-92</sub>* ir *bla<sub>GES-11</sub>*) kodavo atsparumą  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams, du genai (*aacC2* ir *aphA6*) atsparumą aminoglikozidams ir vienas genas *parC* kodavo atsparumą chinolonams. Atsparumo genų pasiskirstymas tarp visų izoliatų yra pateiktas **3.2 lentelėje**.

**3.2 lentelė.** Atsparumo antibiotikams genų pasiskirstymas *Acinetobacter* spp. izoliatuose.

Atsparumo genų grupė	Atsparumo genas	Izoliatų skaičius (n = 194), n	Izoliatų skaičius, %
$\beta$ -laktaminių antibiotikų atsparumo genai	<i>bla<sub>OXA</sub>subgrupė-3</i>	194	100
	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	192	98,97
	<i>bla<sub>OXA</sub>subgrupė-2</i>	188	96,91
	<i>bla<sub>OXA</sub>subgrupė-1</i>	170	87,63
	<i>bla<sub>OXA</sub>subgrupė-4</i>	168	86,60
	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i>	148	76,29
	<i>bla<sub>TEM-92</sub></i>	135	69,59
	<i>bla<sub>GES-11</sub></i>	128	65,98

**Lentelės 3.2** tęsinys. Atsparumo antibiotikams genų pasiskirstymas *Acinetobacter* spp. izoliatuose.

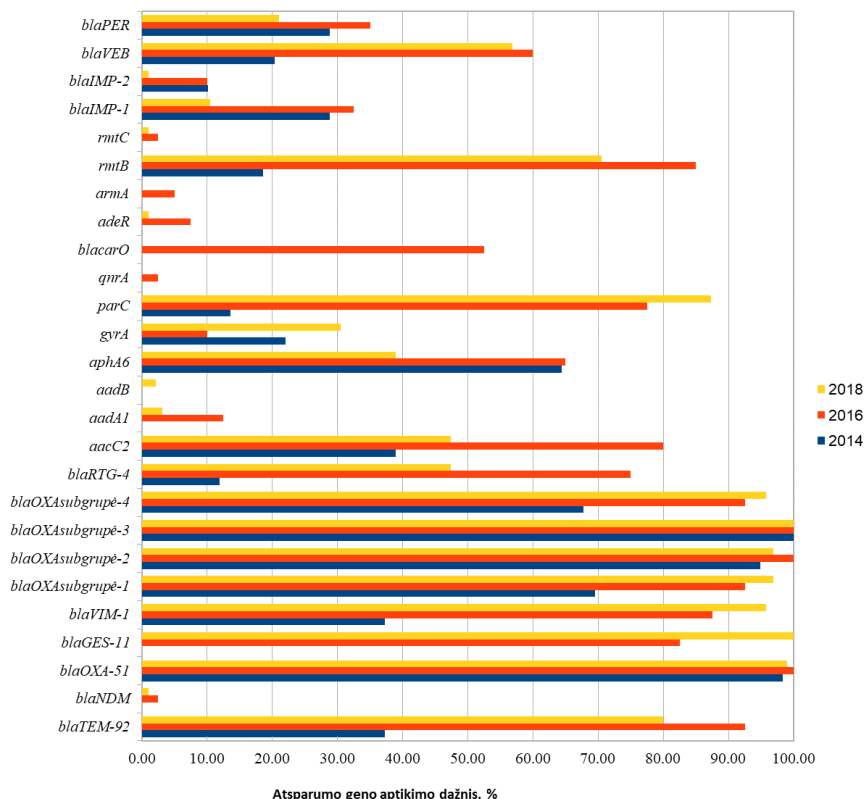
Atsparumo genų grupė	Atsparumo genas	Izoliatų skaičius (n = 194), n	Izoliatų skaičius, %
	<i>bla<sub>VEB</sub></i>	90	46,39
	<i>bla<sub>RTG-4</sub></i>	82	42,27
	<i>bla<sub>PER</sub></i>	50	25,77
	<i>bla<sub>IMP-1</sub></i>	40	20,62
	<i>bla<sub>carO</sub></i>	21	10,82
	<i>bla<sub>IMP-2</sub></i>	11	5,67
	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	2	1,03
Chinolonų atsparumo genai	<i>parC</i>	122	62,89
	<i>gyrA</i>	46	23,71
	<i>qnrA</i>	1	0,52
Aminoglikozidų atsparumo genai	<i>aacC2</i>	119	61,34
	<i>rmtB</i>	112	57,73
	<i>aphA6</i>	101	52,06
	<i>aadA1</i>	8	4,12
	<i>aadB</i>	2	1,03
	<i>armA</i>	2	1,03
	<i>rmtC</i>	2	1,03
Efliukso pompos reguliavimo genas	<i>adeR</i>	4	2,06

Darbe taip pat buvo įvertintas dažniausias atsparumo genų derinys, būdingas visiems arba didesniai daliai visų tirtų izoliatų. Atsparumo genų analizės rezultatai parodė, kad dažniausias atsparumo genų derinys buvo *bla<sub>OXAsubgrupė-3</sub>-bla<sub>OXAsubgrupė-1</sub>-bla<sub>OXA51</sub>-bla<sub>OXAsubgrupė-2</sub>-bla<sub>OXA-subgrupė-4</sub>-bla<sub>VIM-1</sub>-bla<sub>TEM-92</sub>*, kuris buvo nustatytas 45,9 % visų tirtų *Acinetobacter* spp. izoliatų bei buvo atsakingas už atsparumą β-laktaminiais antibiotikams.

Detalesnė izoliatų atsparumo genų analizė parodė, kad skirtingi izoliatai pasižymėjo skirtingu atsparumo genų skaičiumi. Buvo nustatyta, kad daugiausiai atsparumo genų derinių (17 skirtingų atsparumo genų) turėjo izoliatai 2016240, 2016177 ir 2016246, kurie buvo išskirti 2016 metais. Tačiau buvo nustatyta keletas izoliatų, kuriuose buvo aptikta mažiau nei 10 atsparumo genų (mažiausias atsparumo genų skaičius tarp visų izoliatų). Tarp šių izoliatų mažiausiai skirtingų atsparumo genų buvo nustatyta izoliatuose 201483 (atsparumo genų skaičius = 4), 2014162 (n = 5) ir 2014238 (n = 4), kurie buvo išskirti skirtingose ligoninėse 2014 metais.

Norint įvertinti atsparumo genų izoliatuose atsiradimą, buvo atsižvelgta į metus, kada izoliatai buvo išskirti. Buvo nustatyta, kad priklausomai nuo

metų keitėsi atsparumo genų įvairumas, ir 2018 metais išskirtuose izoliatuose genetinė įvairovė buvo didesnė nei izoliatuose, išskirtuose 2014 metais. Be to, keleto atsparumo genų aptikimas tiesiogiai priklausė nuo izoliatų išskyrimo metų, kur keli atsparumo genai, aptikti 2016 metais, nebuvo aptikti nei viename izoliate iš 2018 metų (3.1 pav.).



3.1 pav. *Acinetobacter* spp. izoliatų atsparumo genų pasiskirstymas skirtingais izoliavimo metais

Tolimesnė izoliatų, išskirtų skirtingais tyrimo metais, analizė parodė, kad atsparumo genų pasiskirstymas ir kombinacijos *Acinetobacter* spp. izoliatuose skyrėsi skirtingų izoliatų išskyrimo metų perioduose tarp 2014 ir 2016, 2016 ir 2018 bei 2014 ir 2018 metų. Atlikus atsparumo genų pasiskirstymo skirtingais metais statistinę analizę, buvo nustatyta, kad šešiolikos atsparumo genų buvimas priklausė nuo to, ar izoliatai buvo išskirti 2014, ar 2016 metais ( $p < 0,05$ ) (3.3 lentelė). Trylikos iš šių atsparumo genų aptikimo dažnumas 2014 - 2016 metų laikotarpiu išaugo (atsparumo genuose *blaOXA-51*, *blaGES-11*, *blaOXA* subgroup-2, *blaRTG-4*, *blacarO*, *blaIMP-1*, *blaPER*, *parC*, *aadA1*, *aphA6*, *armA*,

*rmtB* ir *adeR*), dviejų sumažėjo (*gyrA* ir *bla<sub>IMP-2</sub>*), o vieno liko nepakitęs (*bla<sub>OXA</sub>* subgrupė-3).

Vertinant 2016 ir 2018 metų atsparumo genų duomenis, buvo nustatyta, kad statistiškai patikimas atsparumo genų kitimas šiame metų periode buvo nustatytas vienuolikoje atsparumo genų ( $p < 0,05$ ) (**3.3 lentelė**). Tik trijų iš šių atsparumo genų dažnumas tam tikruose *Acinetobacter* spp. izoliatuose padidėjo (atsparumo genuose *bla<sub>GES-11</sub>*, *gyrA* ir *parC*), likusių aštuonių aptikimo dažnumas sumažėjo (genuose *bla<sub>RTG-4</sub>*, *bla<sub>carO</sub>*, *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>IMP-2</sub>*, *aadA1*, *aphA6*, *armA* ir *adeR*). Toliau vertinant bendrą atsparumo genų kitimo tendenciją periode nuo 2014 iki 2018 metų, statistiškai patikimas atsparumo genų kitimas (mažėjimas arba didėjimas) buvo nustatytas penkiolikai atsparumo genų ( $p < 0,05$ ). Šią atsparumo genų grupę sudarė: *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>GES-11</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* subgrupė-2, *bla<sub>RTG-4</sub>*, *gyrA*, *parC*, *aadA1* ir *rmtB*, kurių atsparumo aptikimo dažnis padidėjo, *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>IMP-2</sub>*, *bla<sub>PER</sub>*, ir *aphA6* kurių atsparumo genų aptikimo dažnis sumažėjo, bei *bla<sub>OXA</sub>* subgrupė-3, *bla<sub>carO</sub>* ir *armA*, kurių atsparumo genų kitimo nustatyta nebuvo. Atsparumo genų kitimo vertinimas yra pateiktas **3.3 lentelėje**.

3.3 lentelė. *Acinetobacter* spp. atsparumo genų kaita penkerių metų periode nuo 2014 iki 2018 metų\*.

Atsparumo genas	Izoliatų skaičius 2014 metais ( $n = 59$ ), $n$ (%)	Izoliatų skaičius 2016 metais ( $n = 40$ ), $n$ (%)	Izoliatų skaičius 2018 metais ( $n = 95$ ), $n$ (%)	Tarp 2014–2016 metų		Tarp 2016–2018 metų		Tarp 2014–2018 metų	
				Procentinė prieaugio (+%)/ arba kritimo išraiška (-%)	$p$ reikšmė	Procentinė prieaugio (+%)/ arba kritimo išraiška (-%)	$p$ reikšmė	Procentinė prieaugio (+%)/ arba kritimo išraiška (-%)	$p$ reikšmė
<i>bla</i> <sub>OXAsubgrupė-3</sub>	59/100	40/100	95/100	0	<b>0,002</b>	0	0,111	0	<b>0,005</b>
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	58/98,31	40/100	94/98,95	+ 1,69	<b>0,002</b>	- 1,05	0,124	+ 0,64	<b>0,007</b>
<i>bla</i> <sub>OXAsubgrupė-2</sub>	56/94,92	40/100	92/96,84	+ 5,08	<b>0,004</b>	- 3,16	0,154	+ 1,92	<b>0,012</b>
<i>bla</i> <sub>OXAsubgrupė-1</sub>	41/64,49	37/92,5	92/96,84	+ 28,01	0,194	+ 4,34	0,334	+ 32,35	0,427
<i>bla</i> <sub>OXAsubgrupė-4</sub>	40/67,8	37/92,5	91/95,79	+ 24,7	0,237	+ 3,29	0,371	+ 27,99	0,493
<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>	22/37,29	35/87,5	91/95,79	+ 50,21	0,090	+ 8,29	0,161	+ 63,5	0,098
<i>bla</i> <sub>TEM-92</sub>	22/37,29	37/92,5	76/80	+ 55,21	0,200	- 12,5	0,529	+ 47,71	0,399
<i>bla</i> <sub>GES-11</sub>	0	33/82,5	95/100	+ 8 2,5	<b>&lt; 0,00001</b>	+ 17,5	<b>0,001</b>	+ 100	<b>&lt; 0,00001</b>
<i>parC</i>	8/13,56	31/77,5	83/87,37	+ 63,94	<b>0,0005</b>	+ 9,87	<b>0,028</b>	+ 73,81	<b>0,0002</b>
<i>aacC2</i>	23/38,98%	32/80	45/47,37	+ 41,02	0,611	- 32,63	0,758	+ 8,39	0,878
<i>rmtB</i>	11/18,64%	34/85	67/70,53	+ 66,36	<b>0,005</b>	- 14,47	0,170	+ 51,89	<b>0,014</b>
<i>aphA6</i>	38/64,41%	26/65	37/38,95	+ 0,59	<b>0,0003</b>	- 26,05	<b>0,021</b>	- 25,51	<b>0,0001</b>
<i>bla</i> <sub>VEB</sub>	12/20,34	24/60	54/56,84	+ 39,66	0,108	- 3,16	0,382	+ 36,5	0,192
<i>bla</i> <sub>RTG-4</sub>	7/11,86	30/75	45/47,37	+ 63,14	<b>0,002</b>	- 27,63	<b>0,046</b>	+ 35,51	<b>0,006</b>
<i>bla</i> <sub>PER</sub>	17/28,81	14/35	20/21,05	+ 6,19	<b>0,049</b>	- 13,95	0,155	- 7,76	<b>0,048</b>
<i>gyrA</i>	13/22,03	4/10	29/30,53	- 12,03	<b>0,013</b>	+ 20,53	<b>0,015</b>	+ 8,5	<b>0,030</b>
<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	17/28,81	13/32,5	10/10,53	+ 3,69	<b>0,002</b>	- 21,97	<b>0,009</b>	- 18,28	<b>0,0004</b>
<i>bla</i> <sub>carO</sub>	0	21/52,5	0	+ 52,5	<b>&lt; 0,00001</b>	- 52,5	<b>&lt; 0,00001</b>	0	<b>&lt; 0,00001</b>
<i>bla</i> <sub>IMP-2</sub>	6/10,17	4/10	1/1,05	- 0,17	<b>0,012</b>	- 8,95	<b>0,033</b>	- 9,12	<b>0,005</b>
<i>aadA1</i>	0	5/12,5	3/3,16	+ 12,5	<b>0,014</b>	- 9,34	<b>0,030</b>	+ 3,16	<b>0,041</b>
<i>adeR</i>	0	3/7,5	1/1,05	+ 7,5	<b>0,030</b>	- 6,45	<b>0,035</b>	+ 1,05	0,071

\* Statistiškai patikima  $p$  reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

**Lentelės 3.3 tęsinys.** *Acinetobacter* spp. atsparumo genų kaita penkerių metų periode nuo 2014 iki 2018 metų.

Atsparumo genas	Izoliatų skaičius 2014 metais ( <i>n</i> = 59), <i>n</i> (%)	Izoliatų skaičius 2016 metais ( <i>n</i> = 40), <i>n</i> (%)	Izoliatų skaičius 2018 metais ( <i>n</i> = 95), <i>n</i> (%)	Tarp 2014–2016 metų		Tarp 2016–2018 metų		Tarp 2014–2018 metų	
				Procentinė prieaugio (+%)/ arba kritimo išraiška (-%)	<i>p</i> reikšmė	Procentinė prieaugio (+%)/ arba kritimo išraiška (-%)	<i>p</i> reikšmė	Procentinė prieaugio (+%)/ arba kritimo išraiška (-%)	<i>p</i> reikšmė
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	0	1/2,5	1/1,05	+ 2,5	0,345	- 1,45	0,490	+ 1,05	0,639
<i>aadB</i>	0	0	2/2,11	0	0,335	+ 2,11	0,251	+ 2,11	0,419
<i>armA</i>	0	2/5	0	+ 5	<b>0,029</b>	- 5	<b>0,020</b>	0	<b>0,049</b>
<i>rmtC</i>	0	1/2,5	1/1,05	+ 2,5	0,345	- 1,45	0,490	+ 1,05	0,639
<i>qnrA</i>	0	1/2,5	0	+ 2,5	0,122	- 2,5	0,099	0	0,232

Analizuojant atsparumo genų pasiskirstymą taip pat buvo atsižvelgta į lignonines, iš kurių buvo išskirti tiriami *Acinetobacter* spp. izoliatai. Buvo bandoma įvertinti tiesioginę tam tikrų genų priklausomybę nuo tam tikros lignoninės, kurioje jie būdingi. Įvertinant visų keturiolikos lignoninių duomenis, statistiškai patikima priklausomybė nuo lignoninės buvo nustatyta tik genui *rmtC* (aminoglikozidų atsparumo grupė), kurio buvimas buvo būdingas tik lignoninėms I, VI ir VIII ( $p=0,02$ ). Kitų atsparumo genų priklausomybės nuo tam tikros lignoninės nustatyta nebuvo ( $p > 0,05$ ).

Toliau vertinant atsparumo genų dažnį lignoninėse buvo atsižvelgiama į metus, kuriais atsparumo genai tam tikroje lignoninėje buvo aptikti. Rezultatai parodė, kad tik lignoninėse I, VIII ir X buvo nustatyta statistiškai patikima ( $p < 0,05$ ) tam tikrų genų priklausomybė nuo metų, kuriais buvo išskirti tiriamieji izoliatai. Lignoninėje I tai buvo atsparumo genai *bla<sub>GES-11</sub>*, *parC* ir *rmtB*, kurie labiausiai buvo būdingi 2016 ir 2018 metais išskirtiems izoliatams, *bla<sub>RTG-4</sub>*, *bla<sub>carO</sub>*, *parC* ir *aadA1*, kurie buvo labiausiai susiję su 2016 metais išskirtais izoliatais, ir genai *bla<sub>IMP-1</sub>* ir *aphA6*, būdingiausi 2014 metais išskirtiems izoliatams. Lignoninėje VIII buvo nustatytas atsparumo genas *bla<sub>GES-11</sub>*, kuris buvo būdingas 2016 ir 2018 metais išskirtiems izoliatams, taip pat genas *bla<sub>carO</sub>*, būdingas 2016 metų izoliatams, ir *bla<sub>IMP-2</sub>*, kuris buvo aptinkamas tik 2014 ir 2016 metų izoliatuose. Lignoninėje X tik vienas atsparumo genas *bla<sub>PER</sub>* parodė statistiškai patikimą priklausomybę 2014 ir 2016 metais išskirtiems izoliatams. Visų atsparumo genų priklausomybės vertinimas lignoninėse (jei lignoninės izoliatai buvo išskirti daugiau nei per vienerius metus) yra pateiktas **3.4 lentelėje**.

3.4 lentelė. *Acinetobacter* spp. atsparumo genų pasiskirstymas lignoninėse priklausomai nuo metų\*.

Atsparumo genas	Lignoninė I	Lignoninė IV	Lignoninė V	Lignoninė VI	Lignoninė VII	Lignoninė VIII	Lignoninė X	Lignoninė XI	Lignoninė XIII	Lignoninė XIV
	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> subgrupė-3	0,066	0,969	0,770	0,783	0,687	0,307	0,822	0,905	0,561	0,955
<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub>	0,066	0,969	0,770	0,914	0,687	0,410	0,822	0,905	0,561	0,955
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> subgrupė-2	0,137	0,969	0,770	0,783	0,687	0,307	0,822	0,905	0,490	0,955
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> subgrupė-1	0,276	0,593	0,956	0,889	0,687	0,594	0,822	0,928	0,985	0,955
<i>bla</i> <sub>OXA</sub> subgrupė-4	0,431	0,832	0,956	0,889	0,422	0,689	0,822	0,928	0,985	0,955
<i>blav</i> <sub>IM-1</sub>	0,239	0,969	0,770	0,981	0,687	0,837	0,747	0,928	0,502	0,955
<i>bla</i> <sub>TEM-92</sub>	0,289	0,619	0,581	0,981	0,547	0,933	0,399	0,968	0,985	0,337
<i>bla</i> <sub>GES-11</sub>	<b>0,00003</b>	0,969	0,770	0,428	0,422	<b>0,017</b>	0,399	0,381	0,596	0,955
<i>parC</i>	<b>0,012</b>	0,593	0,956	0,826	0,422	0,086	0,731	0,381	0,696	0,955
<i>aacC2</i>	0,929	0,619	0,956	0,981	0,233	0,615	0,808	0,968	0,753	0,955
<i>rmtB</i>	<b>0,015</b>	0,832	0,956	0,421	0,547	0,829	0,808	0,790	0,680	0,955
<i>aphA6</i>	<b>0,001</b>	0,632		0,783	0,611	0,701	0,603	0,742	0,436	0,337
<i>blav</i> <sub>EB</sub>	0,317	0,214	-	0,305	0,534	0,424	0,747	0,547	0,844	0,955
<i>bla</i> <sub>RTG-4</sub>	<b>0,016</b>	0,510	0,956	0,282	0,473	0,829	0,603	0,742	0,225	-
<i>bla</i> <sub>PER</sub>	0,317	0,473	-	0,783	-	0,689	<b>0,050</b>	-	0,587	0,298
<i>gyrA</i>	0,327	0,311	0,956	0,127	0,611	0,550	0,631	0,152	0,289	-
<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	<b>0,040</b>	0,632	0,143	0,602	0,719	0,070	0,603	0,174	0,537	-
<i>bla</i> <sub>carO</sub>	<b>&lt;0,00001</b>	0,163	-	0,531	-	<b>0,004</b>	0,168	-	-	-
<i>bla</i> <sub>IMP-2</sub>	0,286	-	-	0,531	-	<b>0,014</b>	0,168	-	-	-
<i>aadA1</i>	<b>0,048</b>	-	-	0,531	-	0,502	-	-	0,587	-

\* Statistiškai patikima *p* reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.



**Lentelės 3.4 tęsinys.** *Acinetobacter* spp. atsparumo genų pasiskirstymas ligininėse priklausomai nuo metų.

Atsparumo genas	Ligoninė I	Ligoninė IV	Ligoninė V	Ligoninė VI	Ligoninė VII	Ligoninė VIII	Ligoninė X	Ligoninė XI	Ligoninė XIII	Ligoninė XIV
	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė
<i>adeR</i>	0,565	0,163	0,581	0,981	0,547	0,153	0,399	0,388	0,985	0,337
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	-	0,163	-	-	-	0,708	-	-	-	-
<i>aadB</i>	0,319	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>armA</i>	-	-	-	-	-	0,153	-	0,388	-	-
<i>rmtC</i>	0,216	-	-	0,282	-	0,708	-	-	-	-
<i>qnrA</i>	0,216	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.1.2. *Acinetobacter* spp. rep-PGR genotipavimo analizė

#### 3.1.2.1. BOX-PGR genotipavimas

Visiems *Acinetobacter* spp. izoliatams buvo atliktas BOX-PGR genotipavimas, kurio metu buvo nustatyta, kad visus 194 izoliatų galima suskirstyti į 191 BOX-PGR genetinius profilius (**Priedas 1**). Šiais rezultatais remiantis buvo paruošta dendrograma, kuri parodė, kad BOX-PGR profiliai pasiskirstė į šešis genotipinius klasterius, pasižyminčius skirtinga genetinė įvairove ir skirtingais atsparumo genų deriniais. Buvo nustatytas genotipavimo klasteris, pasižymintis didžiausių izoliatų skaičiumi, klasteris 6 (izoliatų skaičius – 47), mažiausią izoliatų skaičių turėjo klasteris 3 (20 izoliatų).

Vertinant atskirų genotipavimo klasterių duomenis buvo atsižvelgta į kiekvieno klasterio izoliatų bei jų genotipinių profilių pasiskirstymo įvairumą, remiantis atsparumo genų pasiskirstymu skirtinguose klasteriuose (**Priedas 1**). Rezultatai parodė, kad visi klasterio 1 izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *bla<sub>OXA-51</sub>-bla<sub>OXA subgrupė-3</sub>*, tačiau nei vienas šio klasterio izoliatas neturėjo atsparumo genų *qnrA* ir *bla<sub>carO</sub>*. Klasterio 2 izoliatai turėjo tik vieną bendrą visiems atsparumo geną *bla<sub>OXA subgrupė-3</sub>*, tačiau nei vienas iš jų neturėjo atsparumo genų *aadA1*, *aadB*, *qnrA*, *armA* ir *rmtC*. Klasteris 3 pasižymėjo didžiausių atsparumo genų deriniu, būdingu visiems šio klasterio izoliatams: *bla<sub>OXA-51</sub>-bla<sub>GES-11</sub>-bla<sub>OXA subgrupė-2</sub>-bla<sub>OXA subgrupė-3</sub>-parC*, tačiau nei vienas iš izoliatų nepasižymėjo atsparumo genais *bla<sub>NDM</sub>*, *aadA1*, *qnrA*, *bla<sub>carO</sub>*, *adeR*, *armA*, *rmtC* ir *bla<sub>IMP-2</sub>*. Visi klasterio 4 izoliatai turėjo už atsparumą β-laktaminiais antibiotikams atsakingus genus *bla<sub>OXA-51</sub>-bla<sub>OXA subgrupė-2</sub>-bla<sub>OXA subgrupė-3</sub>*, tačiau neturėjo atsparumo genų *bla<sub>NDM</sub>*, *aadB*, *adeR* ir *rmtC*. Klasterio 5 visi izoliatai turėjo dažniausius tyrimo metu nustatytus genus *bla<sub>OXA subgrupė-2</sub>* ir *bla<sub>OXA subgrupė-3</sub>*, tačiau šio klasterio izoliatams nebuvo būdingi atsparumo genai *bla<sub>NDM</sub>*, *aadB*, *qnrA* ir *armA*. Didžiausiam BOX-PGR genotipavimo klasteriui, klasteriui 6, buvo būdingas tik vienas atsparumo genas *bla<sub>OXA subgrupė-3</sub>*, bei nei viename izoliate nesutikti genai *aadA1* ir *qnrA*.

Atsižvelgiant į dendrogramos duomenis, buvo įvertintas izoliatų pasiskirstymas klasteriuose priklausomai nuo jų izoliavimo metų (**3.5 lentelė**). Klasterių palyginimas parodė, kad dominantinio klasterio 6 izoliatai buvo daugiausiai išskirti 2014 ir 2018 metais (20 ir 21 izoliatas atitinkamai). Klasteryje 1 dominavo izoliatai iš 2014 metų (14 izoliatų iš 26), klasteryje 2 – 2018 metų izoliatai (28 izoliatų iš 35), o klasteryje 4 – 2016 metų izoliatai (23 izoliatų iš 36). Tačiau tik viename klasteriui, klasteriui 3, buvo aptikti tik

vienais metais (2018 metais) išskirti izoliatai. Įvertinus *Acinetobacter* spp. izoliatų bei susidariusių genetinių profilių pasiskirstymą klasteriuose pagal izoliavimo metus, statistiškai patikimi rezultatai buvo nustatyti klasteriams 1, 2, 3 ir 4 ( $p$  reikšmės nuo  $<0,00001$  iki  $0,014$ ), klasteriuose 5 ir 6 statistiškai patikimos genetinių profilių priklausomybės nuo izoliatų išskyrimo metų aptikta nebuvo ( $p > 0,05$ ).

**3.5 lentelė.** *Acinetobacter* spp. BOX-PGR klasterių analizė\*.

Klasteris	Izoliatų skaičius 2014 metais	Izoliatų skaičius 2016 metais	Izoliatų skaičius 2018 metais	Priklausomybė nuo išskyrimo metų, $p$	Izoliatų skaičius iš skirtingų ligoninių, (n)	Priklausomybė nuo ligoninės, $p$
Klasteris 1	14	1	11	<b>0,014</b>	I (11), IV (1), V (1), VI (1), VII (1), VIII (8), XI (1), XIII (1), XIV (1)	0,955
Klasteris 2	6	1	28	<b>0,001</b>	I (14), III (2), IV (3), VI (1), VII (3), VIII (9), X (1), XI (2)	0,605
Klasteris 3	-	-	20	<b>0,00003</b>	I (9), III (2), IV (1), V (1), VI (1), VIII (4), X (2)	0,525
Klasteris 4	11	23	2	<b>&lt; 0,00001</b>	I (16), II (1), IV (1), V (2), VI (1), VIII (7), X (3), XI (1), XIII (2), XIV (1)	0,428
Klasteris 5	8	9	13	0,446	I (15), IV (2), VI (1), VIII (5), XI (3), XII (1), XIII (3)	0,403
Klasteris 6	20	6	21	0,145	I (20), II (1), III (1), IV (1), VI (1), VII (2), VIII (12), IX (1), XIII (8)	0,325

Toliau buvo įvertinta klasterių priklausomybė nuo izoliatų kilmės, tai yra nuo ligoninės, kurioje jie buvo aptikti (**3.5 lentelė**). Rezultatai parodė, kad didžiausiu skirtingų ligoninių skaičiumi klasteryje pasižymėjo klasteris 4, kurio profiliai buvo išskirti iš dešimties skirtingų ligoninių. Mažiausią skirtingų ligoninių skaičių turėjo izoliatai iš klasterio 3 (septynios ligoninės). Atlikus izoliatų, išskirtų skirtingose ligoninėse, pasiskirstymo klasteriuose statistinę analizę, buvo nustatyta, kad statistiškai patikimos priklausomybės tarp nei vieno iš klasterių ir izoliatų kilmės nėra ( $p > 0,05$ ).

\* Statistiškai patikima  $p$  reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

### 3.1.2.2. (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimas

Trys BOX-PGR genotipiniai profiliai turėjo po du skirtingus izoliatų kiekvieniame: du genetiniai profiliai klasteryje 2 ir vienas klasteryje 6. Du iš šių izoliatų buvo išskirti 2014 metais (vieno genetinio profilio izoliatai) ir keturi 2018 metais (du skirtingi genetiniai profiliai). Taip pat visi šie izoliatai buvo išskirti iš skirtingų lignoninių (lignoninės I, III, VII ir VIII). Šiems šešioms izoliatams buvo papildomai atliktas (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimas ir paruošta dendrograma (3.2 pav.).



**3.2 pav.** *Acinetobacter* spp. atrinktų izoliatų (GTG)<sub>5</sub>-PGR dendrograma

Paruoštos dendrogramos analizė parodė, kad visi šiai analizei atrinkti izoliatai genetiškai yra labai panašūs (genetinis atstumas tarp izoliatų mažesnis arba lygus 0,5), išskyrus vieną izoliatą – 2018/444 (lignoninė VIII), kurio genetinis atstumas nuo kitų izoliatų viršijo 0,5 (3.2 pav.).

Buvo įvertinti atsparumo genų deriniai izoliatuose, sudarančiuose tą patį genotipinį profilį (pagal BOX-PGR) (3.6 lentelė).

**3.6 lentelė.** (GTG)<sub>5</sub>-PGR analizėje naudotų *Acinetobacter* spp. izoliatų palyginimas.

Genetinio profilio numeris	Izoliatas	Lignoninė	Atsparumo genų skaičius izoliate, n	Atsparumo genai abejuose izoliatuose	Tik izoliatui būdingi genai
1	201429	I	7	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA subgroup-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA subgroup-3</sub>	<i>bla</i> <sub>aacC2</sub> , <i>bla</i> <sub>aphA6</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>
	2014212	VI	8		<i>bla</i> <sub>TEM-92</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA subgroup-1</sub> , <i>bla</i> <sub>aacC1</sub> , <i>bla</i> <sub>armA</sub>
2	2018364	I	12	<i>bla</i> <sub>GES-11</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA subgroups 1-4</sub> , <i>bla</i> <sub>parC</sub> , <i>bla</i> <sub>VEB</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-92</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>gyrA</sub> , <i>bla</i> <sub>PER</sub>
	2018444	VIII	11		<i>bla</i> <sub>aacC2</sub>
3	2018391	III	12	<i>bla</i> <sub>GES-11</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA subgroups 1-4</sub> , <i>bla</i> <sub>RTG-4</sub> , <i>bla</i> <sub>aacC2</sub> , <i>bla</i> <sub>parC</sub> , <i>bla</i> <sub>rmlB</sub>	-
	2018419	I	14		<i>bla</i> <sub>aphA6</sub> , <i>bla</i> <sub>PER</sub>

Rezultatai parodė, kad visi trys genetiniai profiliai pasižymi skirtingais jiems būdingais genų deriniais bei skirtingais atsparumo genų skaičiais

atskiruose izoliatuose (**3.6 lentelė**). Mažiausią atsparumo genų skaičių turėjo pirmo genetinio profilio izoliatai 201429 ir 2014212 (7 ir 8 genai atitinkamai), kiti genetiniai profiliai pasižymėjo didesniais atsparumo genų skaičiais (nuo 11 iki 14 genų). Vertinant atsparumo genų derinius kiekviename iš išskirtų genetinių profilių buvo nustatyta, kad pirmasis genetinis profilis (izoliatai 201429 ir 2014212) turėjo atsparumo genus *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>OXA subgrupė-2</sub> ir *bla*<sub>OXA subgrupė-3</sub>, antrasis genetinis profilis (izoliatai 2018364 ir 2018444) pasižymėjo atsparumo genais *bla*<sub>TEM-92</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>GES-11</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>OXA subgrupės 1-4</sub>, *parC* ir *bla*<sub>VEB</sub>, bei trečiasis profilis (izoliatai 201831 ir 2018419) turėjo atsparumo genus *bla*<sub>TEM-92</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>GES-11</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>OXA subgrupės 1-4</sub>, *bla*<sub>RTG-4</sub>, *aacC2*, *parC* ir *rmtB*.

### 3.1.3. *Acinetobacter* spp. MLVA genotipavimo analizė

Visiems 194 *Acinetobacter* spp. izoliatams buvo atliktas MLVA genotipavimas. Iš viso buvo nustatyti 126 MLVA tipai, remiantis susidariusiais skirtingais VNTR profiliais. Remiantis dendrogramos duomenimis, visi MLVA tipai buvo suskirstyti į šešis klasterius, atsižvelgiant į MLVA tipų genetinį atstumą (**Priedas 2**). Daugiausiai MLVA tipus sudarė vienas tikslinis izoliatas (97 MLVA tipai), tačiau MLVA tipai A49 ir A53 apjungė po 10 skirtingų izoliatų.

Keturiuose MLVA tipuose, kurie apjungė daugiau nei keturis izoliatas kiekvienas (nuo 6 iki 10), papildomai buvo įvertinti atsparumo genų deriniai, būdingi kiekvienai iš šių grupių (**Priedas 2**). Visi MLVA tipo A44 izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *bla*<sub>OXA-51</sub>-*bla*<sub>OXA subgrupės 1-4</sub>, tačiau šio tipo nei viename iš izoliatų nebuvo aptikti atsparumo genai *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *aadA1*, *gyrA*, *qnrA*, *bla*<sub>carO</sub>, *adeR*, *armA*, *rmtC* ir *bla*<sub>IMP-1-2</sub>. MLVA tipo A49 izoliatuose buvo aptiktas už β-laktamazių atsparumą atsakingas genų derinys *bla*<sub>TEM-92</sub>-*bla*<sub>OXA-51</sub>-*bla*<sub>VIM-1</sub>-*bla*<sub>OXA subgrupės 1-3</sub>, tačiau nebuvo aptikta atsparumo genų *bla*<sub>NDM</sub>, *aadB*, *qnrA*, *adeR*, *armA* ir *rmtC*. Visi MLVA tipo A53 izoliatai taip pat turėjo β-laktamazės koduojantį genų derinį (*bla*<sub>TEM-92</sub>-*bla*<sub>OXA-51</sub>-*bla*<sub>OXA subgrupės 1-4</sub>), tačiau didesnės genų grupės (*aadA1*, *aadB*, *qnrA*, *bla*<sub>carO</sub>, *adeR*, *armA*, *rmtC* ir *bla*<sub>IMP-1-2</sub>) nustatyta šio tipo izoliatuose nebuvo. Paskutiniame šios atrinktos grupės MLVA tipe A85 visuose izoliatuose buvo nustatytas atsparumo genų derinys *bla*<sub>TEM-92</sub>-*bla*<sub>OXA-51</sub>-*bla*<sub>GES-11</sub>-*bla*<sub>OXA subgrupės 1-4</sub>-*parC*, bet nei viename iš šio tipo izoliatų nebuvo aptiktos atsparumo determinantės *bla*<sub>NDM</sub>, *aadA1*, *aadB*, *adeR*, *rmtC* ir *bla*<sub>IMP-1-2</sub>.

Vertinant izoliatų išskyrimo skirtingais metais priklausomybę nuo MLVA tipų buvo nustatyta ir statistiškai įrodyta, kad MLVA tipai A34, A44 ir A121 buvo būdingi tik 2014 metais išskirtiems izoliatams ( $p = 0,032$ ,  $p =$

0,002 ir  $p = 0,032$  atitinkamai). Taip pat rezultatai parodė, kad MLVA tipas A49 dažniausiai pasitaikė 2018 metais išskirtiems izoliatams ( $p = 0,030$ ), tuo tarpu tipas A51 statistiškai patikimai buvo būdingas tik 2016 metais išskirtiems izoliatams ( $p = 0,0005$ ). Kiti MLVA tipai statistiškai patikimos priklausomybės nuo izoliatų išskyrimo metų neparodė ( $p > 0,05$ ) (**3.7 lentelė**).

**3.7 lentelė.** *Acinetobacter* spp. MLVA profilių pasiskirstymas skirtingais metais\*.

Izoliavimo metai	Izoliatų skaičius MLVA tipe	MLVA tipai	$p$ reikšmė
2014 metai	1	A1, A3, A8, A19, A20, A21, A22, A23, A24, A26, A27, A29, A30, A31, A32, A33, A35, A36, A37, A38, A39, A41, A43, A54, A76, A88, A103, A105, A107, A111, A22, A24	0,319
	2	A28, A42, A77, A108, A110	0,101
	3	A34, A121	<b>0,032</b>
2016 metai	1	A2, A5, A6, A7, A11, A12, A13, A45, A52, A58, A62, A69, A71, A73, A93, A94, A96, A97, A109, A112, A120, A125	0,146
	4	A51	<b>0,0005</b>
2018 metai	1	A4, A9, A10, A14, A15, A17, A25, A40, A47, A48, A55, A56, A57, A61, A63, A64, A65, A66, A68, A72, A74, A75, A78, A80, A86, A87, A89, A90, A91, A95, A98, A100, A104, A106, A113, A114, A115, A116, A117, A118, A119, A123	0,594
	2	A18, A46, A67, A79, A81, A99, A101, A102	0,353
	3	A83, A92	0,209
2014 ir 2016 metai	2 (po vieną iš abiejų metų)	A59	0,355
	4 (3 iš 2014 metų, 1 iš 2016 metų)	A126	0,100
2014 ir 2018 metai	8 (7 iš 2014 metų, 1 iš 2018 metų)	A44	<b>0,002</b>
2016 ir 2018 metai	2 (po vieną iš abiejų metų)	A60	0,485
2014 ir 2016 metai	2 (po vieną iš abiejų metų)	A59	0,355

Buvo įvertinta kintamo skaičiaus tandeminių pasikartojimų (VNTR) alelių pasiskirstymo genetinė įvairovė, remiantis *Acinetobacter* spp. izoliatų išskyrimo metais bei kilme (ligonine, kurioje izoliatai buvo išskirti). Genetinei įvairovei įvertinti buvo panaudotas supaprastintas Nei įvairovės indeksas ( $D$ ), kuris įvertina potencialų tam tikros rūšies genetinį kitimą. Lokusų vertinimas parodė, kad du VNTR markeriai *Abaum\_3530* ir *Abaum\_3002* turėjo tik

\* Statistiškai patikima  $p$  reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

vieno dydžio lokusą ir jokių polimorfizmu nepasižymėjo. Likę šeši VNTR markeriai (Abaum\_1988, Abaum\_2240, Abaum\_2396, Abaum\_3468, Abaum\_0826 ir Abaum\_0845) pasižymėjo skirtingo lygio polimorfizmu, o didžiausią polimorfizmą turėjo markeriai Abaum\_2396 ir Abaum\_0845, abiejų markerių įvairovės indeksas siekė 0,78 ir 0,77 atitinkamai. Mažiausiu lokusų polimorfizmu pasižymėjo Abaum\_1988 markeris, kurio įvairovės indekso reikšmė siekė tik 0,39 (**3.8 lentelė**).

Analizuojant alelių įvairovės indekso reikšmių pasiskirstymą skirtingais izoliavimo metais, Nei indekso reikšmė pasiskirstė markeriuose taip: 2014 metais išskirtuose izoliatuose – nuo 0 (nėra jokios įvairovės) iki 0,81, mediana 0,50–0,51; 2016 metų izoliatuose – nuo 0 iki 0,80, mediana 0,29–0,40; ir 2018 metais išskirtuose izoliatuose – nuo 0 iki 0,76, mediana 0,39–0,51. Didžiausių polimorfizmu 2014 metais pasižymėjo VNTR markeris Abaum\_0826 ( $D = 0,81$ ), 2016 metais taip pat markeris Abaum\_0826 ( $D = 0,80$ ) bei 2018 metais – markeris Abaum\_2396 ( $D = 0,76$ ). Tačiau vertinant statistinę polimorfinių alelių priklausomybę nuo izoliatų išskyrimo metų, statistškai patikimų rezultatų nustatyta nebuvo ( $p > 0,05$ ,  $p$  reikšmė variavo nuo 0,211 iki 0,470) (**3.8 lentelė**).

**3.8 lentelė.** Alelių pasiskirstymas VNTR markeriuose skirtingais *Acinetobacter* spp. izoliatų išskyrimo metais.

VNTR markeris	Alelis	2014 metai (n=59)		2016 metai (n=40)		2018 metai (n=85)		$p$ reikšmė	Iš viso izoliatų (n=194)	
		n/%	$D$	n/%	$D$	n/%	$D$		n/%	$D$
Abaum_3530	6	59/ 100	0	40/ 100	0	95/ 100	0	-	194/ 100	0
Abaum_3002	7	59/ 100	0	40/ 100	0	95/ 100	0	-	194/ 100	0
Abaum_1988	5	30/ 50,8	0,50	0	0	2/ 2,1	0,30	0,470	32/ 16,5	0,39
	7	0		0		8/ 8,4			8/ 4,1	
	8	0		0		6/ 6,3			6/ 3,1	
	9	29/ 49,2		40/ 100		79/ 83,2			148/ 76,3	
Abaum_2240	1	4/ 6,8	0,48	7/ 17,5	0,29	22/ 23,2	0,39	0,437	33/ 17	0,54
	2	39/ 66,1		0		2/ 2,1			41/ 21,1	
	3	16/ 27,1		33/ 82,5		71/ 74,7			120/ 61,9	
Abaum_2396	8	3/ 5,1	0,58	4/ 10	0,77	1/ 1,1	0,76	0,218	8/ 4,1	0,78
	16	1/ 1,7		13/ 32,5		28/ 29,5			42/ 21,6	

**Lentelės 3.8 tęsinys.** Alelių pasiskirstymas VNTR markeriuose skirtingais *Acinetobacter* spp. izoliatų išskyrimo metais.

VNTR markeris	Alelis	2014 metai (n=59)		2016 metai (n=40)		2018 metai (n=85)		P reikšmė	Iš viso izoliatų (n=194)	
		n/%	D	n/%	D	n/%	D		n/%	D
Abaum_2396	19	0		4/ 10		21/ 22,1			25/ 12,9	
	21	0		2/ 5		17/ 17,9			19/ 9,8	
	23	22/ 37,3		5/ 12,5		0			27/ 13,9	
	24	31/ 52,5		12/ 30		26/ 27,4			69/ 35,6	
	26	2/ 3,4		0		2/ 2,1			4/ 2,1	
Abaum_3468	9	1/ 1,7		0		1/ 1,1			2/ 1	
	12	5/ 8,5	0,51	0	0,40	12/ 12,6	0,56	0,352	17/ 8,8	0,52
	14	15/ 25,4		11/ 27,5		26/ 27,4			52/ 26,8	
	17	38/ 64,4		29/ 72,5		56/ 58,9			123/ 63,4	
Abaum_0826	10	5/ 8,5		13/ 32,5		15/ 15,8			33/ 17	
	12	1/ 1,7		15/ 37,5		64/ 67,4			80/ 41,2	
	14	16/ 27,1		9/ 22,5		10/ 10,5			35/ 18	
	16	5/ 8,5		3/ 7,5		4/ 4,2			12/ 6,2	
	20	6/ 10,2	0,81	0	0,80	0	0,51	0,220	6/ 3,1	0,75
	21	18/ 30,5		0		2/ 2,1			20/ 10,3	
	22	3/ 5,1		0		0			3/ 1,5	
	24	4/ 6,8		0		0			4/ 2,1	
25	1/ 1,7		0		0			1/ 0,5		
Abaum_0845	6	0		3/ 7,5		3/ 3,2			6/ 3,1	
	8	0		0		3/ 3,2			3/ 1,5	
	9	0		1/ 2,5		0			1/ 0,5	
	11	0		0		1/ 1,1			1/ 0,5	
	12	1/ 1,7	0,77	7/ 17,5	0,74	25/ 26,3	0,68	0,211	33/ 17	0,77
	14	11/ 18,6		17/ 42,5		46/ 48,4			74/ 38,1	
	16	13/ 22		7/ 17,5		10/ 10,5			30/ 15,5	
	18	13/ 22		2/ 5		1/ 1,1			16/ 8,2	



**Lentelės 3.8 tęsinys.** Alelių pasiskirstymas VNTR markeriuose skirtingais *Acinetobacter* spp. izoliatų išskyrimo metais.

VNTR markeris	Alelis	2014 metai (n=59)		2016 metai (n=40)		2018 metai (n=85)		<i>p</i> reikšmė	Iš viso izoliatų (n=194)	
		n/%	<i>D</i>	n/%	<i>D</i>	n/%	<i>D</i>		n/%	<i>D</i>
	21	18/ 30,5		3/ 7,5		6/ 6,3			27/ 13,9	
	22	3/ 5,1		0		0			3/ 1,5	

Genetinė įvairovė skirtinguose markeriuose buvo palyginta remiantis liginėmis, iš kurių *Acinetobacter* spp. izoliatai buvo išskirti. Rezultatai parodė, kad didžiausiu alelių polimorfizmu skirtingose ligininėse pasižymėjo VNTR markeriai Abaum\_2396 (ligoninėse IV, VII, VIII ir XIII), Abaum\_3468 (ligoninėje V), Abaum\_0826 (ligoninėse I, II ir VI) bei markeris Abaum\_0845 (ligoninėse I, III, V, VI, VIII, X ir XI). Ligoninėse IX ir XII genetinės alelių įvairovės nustatyta nebuvo, nes iš šių ligininių buvo izoliuota tik po vieną tiriamąjį izoliatą. Ligoninėje XIV visų VNTR markerių įvairovė siekė vienodą reikšmę ( $D = 0,5$ ), išskyrus VNTR markerius Abaum\_3530, Abaum\_3002 ir Abaum\_1988, kurių aleliuose jokios genetinės įvairovės nustatyta nebuvo ( $D = 0$ ). Įvertinus statistinę alelių polimorfizmo priklausomybę nuo izoliatų kilmės, tiesioginės priklausomybės nei vienai ligininei nustatyta nebuvo ( $p > 0,05$ ,  $p$  reikšmė buvo virš 0,99) (3.9 lentelė).

**3.9 lentelė.** Alelių pasiskirstymas skirtinguose VNTR markeriuose priklausomai nuo *Acinetobacter* spp. izoliatų išskyrimo vietos.

VNTR markeris	Alelis	Ligoninė I (n=85)		Ligoninė II (n=3)		Ligoninė III (n=5)		Ligoninė IV (n=9)		Ligoninė V (n=4)		Ligoninė VI (n=6)		Ligoninė VII (n=6)		Ligoninė VIII (n=45)		Ligoninė X (n=6)		Ligoninė XI (n=7)		Ligoninė XIII (n=14)		Ligoninė XIV (n=2)	
		n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D
Abaum_3530	6	85	0	3	0	5	0	9	0	4	0	6	0	6	0	45	0	6	0	7	0	14	0	2	0
Abaum_3002	7	85	0	3	0	5	0	9	0	4	0	6	0	6	0	45	0	6	0	7	0	14	0	2	0
Abaum_1988	5	22	0,43	1	0,44	0	0	0	0,49	0	0,38	1	0,28	0	0,50	7	0,37	0	0	0	0	1	0,26	0	0
	7	1		0		2		0		0		2		0		0		1		0		0			
	8	2		0		1		0		1		0		1		0		0		0		0			
	9	60		2		6		3		5		4		35		6		7		12		2			
Abaum_2240	1	3	0,46	0	0,44	5	0	5	0,49	4	0	2	0,44	1	0,28	13	0,62	1	0,5	2	0,41	1	0,36	1	0,5
	2	25		2		0		0		0		0		9		1		0		2		0			
	3	57		1		4		0		4		5		23		4		5		11		1			
Abaum_2396	8	1	0,78	0	0,44	0	0,32	1	0,72	0	0,50	0	0,61	1	0,81	3	0,75	0	0,28	1	0,71	0	0,80	1	0,5
	16	23		0		4		0		1		0		6		1		1		5		0			
	19	10		0		0		2		2		0		2		0		2		3		0			
	21	10		0		1		1		0		0		1		4		0		1		0			

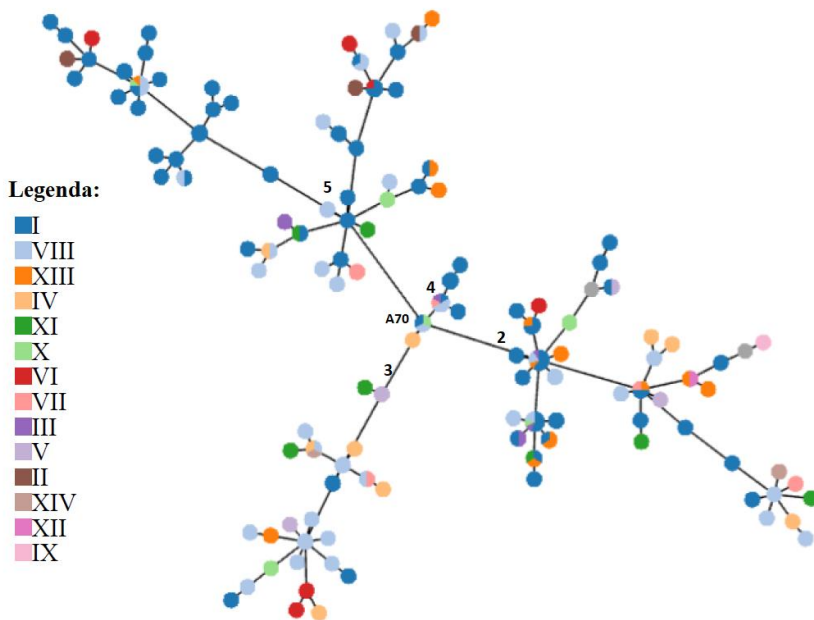
**Lentelės 3.9 tęsinys.** Alelių pasiskirstymas skirtinguose VNTR markeriuose priklausomai nuo *Acinetobacter* spp. izoliatų išskyrimo vietos.

VNTR markeris	Alelis		Ligoninė I (n=85)		Ligoninė II (n=3)		Ligoninė III (n=5)		Ligoninė IV (n=9)		Ligoninė V (n=4)		Ligoninė VI (n=6)		Ligoninė VII (n=6)		Ligoninė VIII (n=45)		Ligoninė X (n=6)		Ligoninė XI (n=7)		Ligoninė XIII (n=14)		Ligoninė XIV (n=2)		
	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	
	23	10		2		0		1		0		2		0		9		0		2		1		0			
	24	28		1		0		4		2		3		1		19		5		2		2		0			
	26	3		0		0		0		0		0		0		1		0		0		0		1			
Abaum_3468	9	1	0,39	0	0,44	0	0,32	0	0,64	0	0,63	0	0,44	0	0,61	0	0,59	0	0,28	1	0,45	0	0,36	0	0,5	0	
	12	2		0		0		2		1		0		2		6		0		1		1		1			
	14	18		2		1		4		2		4		1		16		1		0		2		1			
	17	64		1		4		3		1		2		3		23		5		5		11		0			
Abaum_0826	10	12	0,79	1	0,67	0	0,48	2	0,52	0	0,38	2	0,78	0	0,44	3	0,40	3	0,61	1	0,69	5	0,61	1	0,5	1	
	12	28		0		3		5		3		1		4		33		2		2		7		1			
	14	19		1		2		1		0		1		0		7		0		3		0		0			
	16	3		0		0		3		0		0		7		0		0		0		1		0			
	20	5		0		0		0		0		1		0		0		0		0		0		0			
	21	13		0		0		0		0		0		0		4		1		1		1		0			

**Lentelės 3.9 tęsinys.** Alelių pasiskirstymas skirtinguose VNTR markeriuose priklausomai nuo *Acinetobacter* spp. izoliatų išskyrimo vietos.

VNTR markeris	Alelis		Ligoninė I (n=85)		Ligoninė II (n=3)		Ligoninė III (n=5)		Ligoninė IV (n=9)		Ligoninė V (n=4)		Ligoninė VI (n=6)		Ligoninė VII (n=6)		Ligoninė VIII (n=45)		Ligoninė X (n=6)		Ligoninė XI (n=7)		Ligoninė XIII (n=14)		Ligoninė XIV (n=2)			
	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D	n	D		
	22	3	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
	24	2	1		0		0		0		0		0		1		0		0		0		0		0		0	
	25	0	0		0		0		1		1		0		0		0		0		0		0		0		0	
Abaum_0845	6	2	0		0		1		1		2		0		0		0		0		0		0		0		0	
	8	3	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
	9	1	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
	11	1	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	
	12	15	0	0,79	3	0,44	0	0,56	0	0,62	0	0,63	0	0,78	2	0,44	5	0,75	2	0,72	1	0,78	4	0,68	1	0,5	1	0,5
	14	31	0		1		5		2		1		4		18		2		2		2		6		1		1	
	16	8	2		0		0		1		1		0		12		1		1		1		3		0		0	
	18	9	0		0		1		0		1		0		4		0		1		1		0		0		0	
	21	12	1		1		2		0		1		0		6		1		2		2		1		0		0	
	22	3	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	

Siekiant įvertinti *Acinetobacter* spp. MLVA tipų epidemiologinę kilmę ir plėtrą pasirinktais tyrimų metais, buvo nubraižytas minimaliai apimantis medis MST (3.3 pav.).



**3.3 pav.** *Acinetobacter* spp. MLVA tipų minimaliai apimantis medis (MST), remiantis izoliatų kilme. Apskritimais pažymėti skirtingi MLVA tipai. Spalvos atitinka skirtingas ligonines (pagal legendą).

Remiantis MST analize buvo nustatyta, kad visi MLVA tipai pagal giminingumą atsišakojo nuo vieno MLVA tipo (A70, VNTR alelių profilis: 6-7-9-3-24-17-12-14) ir galimai yra kilę iš jo. Šio tipo izoliatai priklausė ligoninėms I, VIII ir X (paveiksle pažymėta „A70“). Vėliau tipai atsišakojo į keturias giminingas šakas (paveiksle pažymėti „2“, „3“, „4“ ir „5“), kurios pasižymėjo skirtinga izoliatų kilme. Giminingumo šaka „2“ turėjo didžiausią MLVA tipų, išskirtų iš skirtingų ligoninių, skaičių ir, galimai, turėjo didžiausią VNTR alelių perdavimą tarp skirtingų ligoninių. Tačiau giminingumo šaka „4“ turėjo mažiausią MLVA tipų variabilumą ligoninėms, kur dauguma tipų priklausė ligoninei I.

### 3.2. *E. coli* antibiotikams atsparių izoliatų analizė

Antroje šio darbo dalyje buvo skirtas dėmesis klinikiniais *E. coli* izoliatams, išskirtiems iš skirtingų Lietuvos ligoninių (12 skirtingų ligoninių) 2014 ir 2018 metais. Izoliatų pasiskirstymas tarp ligoninių skirtingais metais yra pateiktas **3.10 lentelėje**.

**3.10 lentelė.** *E. coli* izoliatai naudoti tyrime.

	Izoliatų skaičius metais		
	2014	2018	Iš viso
Ligoninė I	12	26	38
Ligoninė II	33	13	46
Ligoninė III	0	7	7
Ligoninė IV	8	10	18
Ligoninė V	7	15	22
Ligoninė VI	5	14	19
Ligoninė VII	6	3	9
Ligoninė VIII	9	36	45
Ligoninė IX	1	9	10
Ligoninė X	5	17	22
Ligoninė XI	5	9	14
Ligoninė XII	0	6	6

Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL) visiems izoliatams buvo patikrintas fenotipinis atsparumas antibiotikams, remiantis EUCAST reikalavimais (2014 ir 2018 metų reikalavimai). Visi tyrime naudoti *E. coli* izoliatai turėjo atsparumą trečios kartos cefalosporinams (vienam ar keliems) ir/ arba turėjo fenotipinį atsparumą vienam arba keliems karbapenemams. Tik po fenotipinio atsparumo patvirtinimo izoliatai buvo naudoti šiame tyrime.

### 3.2.1. *E. coli* atsparumo genų identifikavimas ir charakterizavimas

Pirmiausia visiems atrinktiems *E. coli* izoliatams buvo nustatytos atsparumo genetinės determinantės, lėmusios atsiradusį fenotipinį atsparumą. Tam genetinės atsparumo determinantės buvo suskirstytos į šešias grupes pagal dažnumą klinikiniuose *E. coli* atsparumo atvejuose: atsparumo β-laktaminiams antibiotikams genai (17 genų), atsparumo sulfonamidams (3 genai), atsparumo aminoglikozidams (4 genai), atsparumo tetraciklinams (3 genai), atsparumo fosfomicinui (1 genas) ir atsparumo kolistinui genas (1 genas).

Atsparumo genų analizė parodė (3.11 lentelė), kad dažniausi atsparumo genai tarp visų išskirtų izoliatų buvo: *tetA* (100 % visų izoliatų), *strB* (99,2 %), *sul2* (99,2 %), *bla<sub>TEM</sub>* (98,8 %), *bla<sub>NDM</sub>* (98,4 %), *strA* (98,4 %), *fosA* (97,3 %), *bla<sub>AIM</sub>* (97,3 %), *sul3* (92,6 %), *aadA* (92,6 %) ir *bla<sub>CTX-M-9</sub>* grupė (90,6 %). Keturi iš šių genų (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-9</sub>* grupė, *bla<sub>AIM</sub>* ir *bla<sub>NDM</sub>*) buvo atsakingi už atsparumą β-laktaminiams antibiotikams, trys genai (*aadA*, *strA* ir *strB*) lėmė atsparumą aminoglikozidams, du genai (*sul2* ir *sul3*) sulfonamidams, vienas genas (*fosA*) buvo atsakingas už atsparumą fosfomicinui bei vienas genas (*tetA*) lėmė atsparumą tetraciklinui.

**3.11 lentelė.** *E. coli* atsparumo genų pasiskirstymas penkerių metų periode nuo 2014 iki 2018 m.\*

Atsparumo genų grupė	Atsparumo genas	Izoliatų skaičius 2014 metais ( <i>n</i> = 91), <i>n</i> (%)	Izoliatų skaičius 2018 metais ( <i>n</i> = 165), <i>n</i> (%)	Procentinė prieaugio (+%)/ arba kritimo išraiška (-%)	χ <sup>2</sup> reikšmė	<i>p</i> reikšmė
Atsparumo β-laktaminiams antibiotikams genai	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	88 (96,7)	164 (99,4)	+2,7	0,002	> 0,05
	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	37 (40,7)	149 (90,3)	+49,6	18,165	<b>0,00002</b>
	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	90 (98,9)	163 (98,8)	+0,1	0,071	> 0,05
	<i>bla<sub>AIM</sub></i>	89 (97,8)	160 (96,7)	-1,1	0,103	> 0,05
	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	45 (49,5)	42 (25,5)	-24	11,017	<b>0,009</b>
	<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	11 (12,1)	24 (14,5)	+2,4	0,173	> 0,05
	<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	90 (98,9)	142 (86,1)	-12,8	1,651	> 0,05
	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	77 (84,6)	150 (90,9)	+6,3	0,073	> 0,05
	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	36 (39,5)	98 (59,4)	+19,9	3,697	<b>0,050</b>
	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	54 (59,3)	129 (78,2)	+18,9	2,239	> 0,05
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	0	2 (1,2)	+1,2	1,066	> 0,05	
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	0	2 (1,2)	+1,2	1,066	> 0,05	

\* Statistiškai patikima *p* reikšmė (*p* ≤ 0,05) yra paryškinta.

**Lentelės 3.11 tęsinys.** *E. coli* atsparumo genų pasiskirstymas penkerių metų periode nuo 2014 iki 2018 m.

Atsparumo genų grupė	Atsparumo genas	Izoliatų skaičius 2014 metais (n = 91), n (%)	Izoliatų skaičius 2018 metais (n = 165), n (%)	Procentinė prieaugio (+%) / arba kritimo išraiška (-%)	$\chi^2$ reikšmė	p reikšmė
Atsparumo sulfonamidams genai	<i>sul3</i>	91 (100)	146 (88,5)	-11,5	1,370	> 0,05
Atsparumo aminoglikozidams genai	<i>strA</i>	90 (98,9)	162 (98,2)	-0,7	0,098	> 0,05
	<i>strB</i>	91 (100)	163 (98,8)	-1,2	0,124	> 0,05
	<i>aac3 (IV)</i>	9 (9,9)	36 (21,8)	+11,9	4,331	<b>0,037</b>
	<i>aadA</i>	82 (90,1%)	155 (93,8)	+3,7	0,003	> 0,05
Atsparumo tetraciklinui genai	<i>tetA</i>	91 (100)	165 (100)	0	0,067	> 0,05
	<i>tetB</i>	23 (25,3)	30 (18,2)	-7,1	1,736	> 0,05
	<i>tetC</i>	23 (25,3)	15 (9,1)	-16,2	11,109	<b>0,0009</b>
Atsparumo fosfomicinui genas	<i>fosA</i>	88 (96,7)	161 (97,6)	+0,9	0,035	> 0,05
Atsparumo kolistinui genas	<i>mcr-1</i>	8 (8,8)	5 (3,03)	-5,77	4,105	<b>0,043</b>

Buvo vertinamos atsparumo genų galimos kombinacijos ir jų pasiskirstymas tarp izoliatų. Rezultatai parodė, kad dažniausia atsparumo genų kombinacija buvo *tetA-strB-sul2-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>AIM</sub>-sul3-aadA-bla<sub>CTX-M-9</sub>*, kuri buvo būdinga 67,2 % visų tirtų izoliatų, bei kodavo atsparumą teraciklinams (genas *tetA*), aminoglikozidams (genai *strB*, *strA* ir *aadA*), fosfomicinui (genas *fosA*), sulfonamidams (*sul2* ir *sul3*) ir  $\beta$ -laktaminiam antibiotikams (genai *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>AIM</sub>* ir *bla<sub>CTX-M-9</sub>*).

Buvo nustatyta, kad keli tirti atsparumo genai (*bla<sub>CTX-M-8</sub>*, *bla<sub>CTX-M-25</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*, *bla<sub>DIM</sub>* ir *bla<sub>GIM</sub>*) nebuvo būdingi tirtiems izoliatams ir, dėl to, tyrimo metu nebuvo aptikti. Taip pat genai *bla<sub>SHV</sub>* ir *bla<sub>SPM</sub>* buvo aptikti tik dviejuose skirtinguose izoliatuose, išskirtuose 2018 metais.

Atskirų izoliatų analizė parodė, kad daugiausiai atsparumo determinančių (19 atsparumo genų) turėjo vienas izoliatas, išskirtas 2014 metais (izoliatas 1598), ir šeši izoliatai išskirti 2018 metais (izoliatai 2125, 2142, 2149, 2173, 2202 ir 2220). Izoliatai buvo išskirti iš skirtingų ligoninių (ligoninės I, V, VI, VIII, X ir XI). Visi šios grupės izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>AIM</sub>-sul3-aadA-bla<sub>CTX-M-9</sub>-bla<sub>IMP</sub>-sul1-bla<sub>KPC</sub>-bla<sub>CMY-2</sub>-bla<sub>VIM</sub>-bla<sub>CTX-M-1</sub>*, likę trys genai kiekviename iš izoliatų skyrėsi individualiai. Taip pat buvo aptikta dvylika izoliatų, kurie turėjo mažiausią atsparumo determinančių skaičių (12 atsparumo genų), iš kurių septyni buvo izoliuoti 2014 metais bei penki izoliatai – 2018 metais.



Keturi iš šios grupės izoliatų buvo išskirti iš ligoninės VIII (1646, 2140, 2147 ir 2205), trys izoliatai iš ligoninės II (1617, 1629 ir 2109) ir po vieną izoliatą iš ligoninių I, IV, V, VI ir XI (izoliatai 1627, 2097, 1614, 1616 ir 1662 atitinkamai). Genų derinių analizė parodė, kad visiems šiems izoliatams buvo būdingas atsparumo genų derinys *tetA-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-sul3-aadA*, likusių penkių genų deriniai kiekviename iš izoliatų skyrėsi individualiai.

Tolimesnė izoliatų, išskirtų skirtingais tyrimo metais, analizė parodė, kad atsparumo genų pasiskirstymas ir kombinacijos skiriasi penkerių metų periode tarp 2014 ir 2018 metų. Rezultatai ir statistinis duomenų palyginimas parodė, kad trys genai (*bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *tetC* ir *mcr-1*) buvo dažnesni 2014 metais, nei 2018 metais ( $p < 0,05$ ), tačiau atsparumo genai *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* ir *aac3(IV)* buvo daugiau būdingi izoliatams, išskirtiems 2018, nei 2014 metais ( $p < 0,05$ ). Tačiau kelių genų dažnumas (*bla<sub>TEM</sub>*, *strA* ir *tetA*) liko beveik nepakitęs penkerių metų laikotarpyje.

Buvo nustatyta atsparumo genų priklausomybė nuo ligoninių, kuriose buvo išskirti tiriamieji izoliatai. Rezultatai parodė, kad atsparumo genų *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *tetC* ir *bla<sub>SPM</sub>* buvimas tiesiogiai priklausė nuo ligoninės, kurioje izoliatai buvo išskirti ( $p < 0,05$ ) (**3.12 lentelė**). Taip atsparumo genas *bla<sub>CTX-M-1</sub>* buvo labiausiai būdingas ligoninei II ir VII, *tetC* genas – ligoninei II ir *bla<sub>SPM</sub>* genas – X ir XII. Kiti atsparumo genai tiesioginės priklausomybės nuo ligoninės neparodė.

**3.12 lentelė. *E. coli* atsparumo genų pasiskirstymas skirtingose Lietuvos ligoninėse\*.**

Atsparumo genai	Ligoninė I (n=38), n	Ligoninė II (n=46), n	Ligoninė III (n=7), n	Ligoninė IV (n=18), n	Ligoninė V (n=22), n	Ligoninė VI (n=19), n	Ligoninė VII (n=9), n	Ligoninė VIII (n=45), n	Ligoninė IX (n=10), n	Ligoninė X (n=22), n	Ligoninė XI (n=14), n	Ligoninė XII (n=6), n	$\chi^2$ reikšmė	$p$ reikšmė
<i>tetA</i>	38	46	7	18	22	19	9	45	10	22	14	6	0,054	> 0,05
<i>sul2</i>	38	46	7	18	22	19	8	44	10	22	14	6	0,177	> 0,05
<i>strB</i>	37	46	7	18	22	19	9	43	10	22	14	6	0,109	> 0,05
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	37	46	7	18	22	17	9	45	10	22	14	6	0,242	> 0,05
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	36	46	7	18	22	18	9	44	10	22	14	6	0,168	> 0,05
<i>strA</i>	38	46	6	17	22	19	9	43	10	22	14	6	0,190	> 0,05
<i>fosA</i>	36	44	7	18	22	19	9	42	10	22	14	6	0,208	> 0,05
<i>bla<sub>AIM</sub></i>	37	45	7	18	21	18	9	44	9	21	14	6	0,203	> 0,05
<i>sul3</i>	32	44	7	18	20	19	9	42	9	21	10	6	1,601	> 0,05
<i>aadA</i>	37	40	7	16	21	18	8	43	8	21	12	6	0,601	> 0,05
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	34	43	7	15	19	19	7	40	9	19	14	6	0,947	> 0,05
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	34	38	7	14	22	17	9	38	9	21	12	6	0,937	> 0,05
<i>sul1</i>	34	29	6	15	18	13	8	33	9	15	13	5	3,420	> 0,05

\* Statistiškai patikima  $p$  reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

**Lentelės 3.12 tęsinys. *E. coli* atsparumo genų pasiskirstymas skirtingose Lietuvos ligoninėse.**

Atsparumo genai	Ligoninė I (n=38), n	Ligoninė II (n=46), n	Ligoninė III (n=7), n	Ligoninė IV (n=18), n	Ligoninė V (n=22), n	Ligoninė VI (n=19), n	Ligoninė VII (n=9), n	Ligoninė VIII (n=45), n	Ligoninė IX (n=10), n	Ligoninė X (n=22), n	Ligoninė XI (n=14), n	Ligoninė XII (n=6), n	$\chi^2$ reikšmė	<i>p</i> reikšmė
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	28	26	6	11	16	12	5	39	8	17	13	5	4,897	> 0,05
<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	27	31	5	13	16	13	5	33	9	16	10	5	1,184	> 0,05
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	22	16	3	8	18	11	4	25	4	11	8	4	7,404	> 0,05
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	13	26	1	4	5	7	7	7	3	9	4	1	19,636	<b>0,049</b>
<i>tetB</i>	6	14	3	2	3	4	4	9	1	5	2	0	10,032	> 0,05
<i>aac3(IV)</i>	8	6	1	2	3	4	0	9	2	8	2	0	8,631	> 0,05
<i>tetC</i>	4	18	0	3	2	1	0	4	1	4	1	0	25,917	<b>0,007</b>
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	11	3	0	2	4	3	2	6	0	1	3	0	14,046	> 0,05
<i>mcr-1</i>	1	3	0	1	1	0	1	4	0	2	0	0	6,123	> 0,05
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	7,609	> 0,05
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	24,795	<b>0,01</b>

Atskirų ligoninių atsparumo genų duomenų analizė parodė, kad ligoninės II atsparumo genų *bla<sub>VIM</sub>* ir *aac3(IV)* buvimas priklausė nuo izoliatų išskyrimo metų ( $p < 0,05$ ). Tokia pat priklausomybė tarp atsparumo genų aptikimo ir izoliatų išskyrimo metų buvo nustatyta ligoninėje IV tiriant atsparumo geną *tetC*, ligoninėje VI tiriant geną *bla<sub>KPC</sub>* ir ligoninėje X tiriant atsparumo geną *bla<sub>CTX-M-1</sub>*. Kitose ligoninėse atsparumo genų priklausomybės nuo išskyrimo metų nustatyta nebuvo ( $p > 0,05$ ) (3.13 lentelė).

**3.13 lentelė.** *E. coli* atsparumo genų pasiskirstymas ligoninėse skirtingais izoliatų išskyrimo metais\*.

Atsparumo genai	Ligoninė									
	I	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė	<i>p</i> reikšmė
<i>tetA</i>	0,861	0,839	0,927	0,848	0,803	0,917	0,934	0,876	0,958	0,947
<i>sul2</i>	0,861	0,839	0,927	0,848	0,803	0,882	0,934	0,876	0,958	0,947
<i>strB</i>	0,775	0,839	0,927	0,848	0,803	0,917	0,944	0,876	0,958	0,947
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	0,775	0,839	0,927	0,848	0,974	0,917	0,934	0,876	0,958	0,947
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	0,689	0,839	0,927	0,848	0,869	0,917	0,704	0,876	0,958	0,947
<i>strA</i>	0,861	0,839	0,719	0,848	0,803	0,917	0,944	0,876	0,958	0,947
<i>fosA</i>	0,689	0,992	0,927	0,848	0,803	0,917	0,881	0,876	0,958	0,947
<i>bla<sub>AIM</sub></i>	0,943	0,913	0,927	0,891	0,698	0,917	0,934	0,789	0,864	0,947
<i>sul3</i>	0,374	0,501	0,927	0,621	0,803	0,917	0,881	0,789	0,864	0,378
<i>aadA</i>	0,775	0,691	0,887	0,891	0,698	0,553	0,944	0,385	0,864	0,714
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	0,524	0,360	0,544	0,511	0,803	0,721	0,754	0,789	0,670	0,947
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	0,392	0,927	0,841	0,848	0,592	0,917	0,933	0,789	0,864	0,816
<i>sul1</i>	0,913	0,328	0,929	0,841	0,473	0,882	0,594	0,789	0,406	0,888
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	0,066	0,157	0,542	0,128	<b>0,049</b>	0,241	0,235	0,385	0,105	0,664
<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	0,729	0,749	0,609	0,328	0,947	0,241	0,742	0,789	0,348	0,277
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	0,534	<b>0,020</b>	0,244	0,754	0,658	0,529	0,951	0,539	0,294	0,957
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	0,520	0,246	0,236	0,144	0,771	0,721	0,597	0,595	<b>0,016</b>	0,577
<i>tetB</i>	0,468	0,209	0,122	0,898	0,263	0,675	0,485	0,759	0,904	0,063
<i>aac3(IV)</i>	0,062	<b>0,047</b>	0,899	0,898	0,263	-	0,340	0,664	0,852	0,283
<i>tetC</i>	0,819	0,228	<b>0,049</b>	0,536	0,575	-	0,824	0,759	0,895	0,188
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	0,126	0,160	0,122	0,829	0,082	0,657	0,816	-	0,062	0,908
<i>mcr-1</i>	0,129	0,160	0,274	0,126	-	0,463	0,144	-	0,346	-
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	-	-	0,361	0,513	-	-	0,612	-	-	-
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,593	-

### 3.2.2. *E. coli* virulentiškumo genų identifikavimas

Visiems tirtiems *E. coli* izoliatams buvo nustatytos virulentiškumo determinantės, kurios yra labiausiai būdingos hospitalines kraujo arba šlapimo

\* Statistiškai patikima *p* reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

takų infekcijas sukeliantiems kamienams. Virulentiškumo genai buvo suskirstyti į keturias grupes: sideroforus (geležies pasisavinimo faktorius) (2 genai), adhezinus (4 genai), toksinus (5 genai) ir atsparumą serumui (2 genai) koduojančius genus.

Rezultatai parodė, kad dažniausi nustatyti virulentiškumo genai buvo: *fimH* (98,4 % visų tirtų izoliatų), *fyuA* (91,8 %) ir *traT* (81,3 %), atsakingi už I tipo fimbrijos aktyvavimą (*fimH*), sideroforo jersinijabaktino aktyvaciją (*fyuA*) ir bakterinį atsparumą organizmo šeimininko serumo poveikiui (*traT*). Rečiausiai (6,6 % visų izoliatų) buvo nustatytas virulentiškumo genas, atsakingas už Ibe A adhezino sintezę – *ibeA*, kuris buvo daugiausiai buvo aptiktas ligoninėje II, o septyni iš septyniolikos izoliatų buvo išskirti 2014 metais. Buvo nustatyta, kad dažniausias virulentiškumo genų derinys buvo *fuyA-fimH-iroN*, kuris buvo nustatytas 58,6 % visų tirtų *E. coli* izoliatų.

Penkerių metų izoliatų analizė parodė, kad virulentiškumo determinantės kito tarp izoliatų, priklausomai nuo išskyrimo metų (**3.14 lentelė**). Abiejų metų rezultatų palyginimas parodė, kad trijų virulentiškumo genų dažnumas nuo 2014 metų padidėjo (*hlyA*, *cnf1* ir *sfaD/E*,  $p < 0,05$ ), o keturių genų dažnumas sumažėjo (*cvaC*, *ibeA*, *papC* ir *afaB/C*,  $p < 0,05$ ).

**3.14 lentelė.** *E. coli* virulentiškumo genų pasiskirstymas 2014 ir 2018 metais\*.

Genų grupė	Genai	Izoliatų skaičius 2014 metais (n = 91), n (%)	Izoliatų skaičius 2018 metais (n = 165), n (%)	Procentinė prieaugio (+%) / arba kritimo išraiška (-%)	$\chi^2$ reikšmė	p reikšmė
Toksinais	<i>sat</i>	40 (44)	98 (59,4)	+15,4	1,264	> 0,05
	<i>hlyA</i>	21 (23,1)	83 (50,3)	+27,2	8,270	<b>0,004</b>
	<i>cnf1</i>	16 (17,6)	70 (42,2)	+24,6	8,568	<b>0,003</b>
	<i>cvaC</i>	23 (25,3)	23 (13,9)	-11,4	5,620	<b>0,018</b>
	<i>ibeA</i>	10 (11)	7 (4,2)	-6,8	4,892	<b>0,027</b>
Adhezinai	<i>fimH</i>	89 (97,8)	163 (98,8)	+1	0,373	> 0,05
	<i>staD/E</i>	31 (34,1)	91 (55,2)	+21,1	3,586	<b>0,05</b>
	<i>papC</i>	28 (30,8)	19 (11,5)	-19,3	14,340	<b>0,0002</b>
	<i>afaB/C</i>	19 (20,9)	15 (9,1)	-11,8	7,644	<b>0,006</b>
Sideroforai	<i>fyuA</i>	81 (89)	154 (93,3)	+4,3	0,098	> 0,05
	<i>iroN</i>	54 (59,3)	107 (64,8)	+5,5	0,000	> 0,05
Atsparumo serumui grupė	<i>traT</i>	69 (75,8)	139 (84,2)	+8,4	0,010	> 0,05
	<i>kpsMTII</i>	47 (51,6)	79 (47,9)	-3,7	0,816	> 0,05

Buvo įvertinta virulentiškumo genų aptikimo priklausomybė nuo ligoninės, iš kurios izoliatai buvo išskirti. Rezultatai parodė, kad nei viena virulentiškumo determinantė tiesiogiai nepriklauso nuo ligoninės ( $p > 0,05$ ) vertinant pilną imtį (**3.15 lentelė**).

\* Statistiškai patikima p reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

**3.15 lentelė.** *E. coli* virulentiškumo genų priklausomybės nuo lignoninių ir izoliatų išskyrimo metų\*.

Genai	Ligininė										Virulentiškumo genų priklausomybė nuo lignoninės $p$ reikšmė
	I	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
	$p$ reikšmė										
<i>fimH</i>	0,765	0,982	0,883	0,706	0,491	0,969	0,734	0,636	0,882	0,632	1,000
<i>fyuA</i>	0,679	0,945	0,883	0,378	0,901	0,619	0,623	0,558	0,790	0,782	0,999
<i>traT</i>	0,801	0,672	0,941	0,606	0,261	0,969	0,717	0,389	0,833	0,909	0,975
<i>iroN</i>	0,476	0,928	0,582	0,847	0,312	0,776	0,502	0,524	0,728	0,283	0,716
<i>sat</i>	0,630	0,133	0,449	0,505	0,880	0,776	0,979	0,560	0,728	0,771	0,498
<i>kpsMTH</i>	0,714	0,270	0,383	0,157	0,505	0,705	0,646	0,211	0,315	0,185	0,779
<i>sfaD/E</i>	0,652	0,884	0,214	0,273	0,157	0,705	0,113	0,524	0,319	0,751	1,000
<i>hlyA</i>	0,212	0,195	0,441	0,157	0,838	0,632	0,192	0,524	0,954	<b>0,038</b>	0,856
<i>cnfI</i>	0,172	0,892	0,742	0,197	0,706	0,632	0,091	0,560	0,645	0,068	0,727
<i>papC</i>	<b>0,005</b>	0,793	0,192	0,083	0,289	0,473	0,910	0,713	0,615	0,147	0,077
<i>cvaC</i>	0,866	0,364	0,742	0,564	0,564	0,705	<b>0,015</b>	0,795	0,460	0,329	0,152
<i>afaB/C</i>	0,146	0,870	0,192	0,248	0,134	-	< <b>0,00001</b>	0,795	0,366	0,592	0,805
<i>ibeA</i>	0,128	0,090	0,835	-	0,480	0,473	0,507	-	0,602	-	0,389

Tačiau buvo nustatyta tam tikrų virulentiškumo genų priklausomybė nuo lignoninių atsižvelgiant į izoliatų išskyrimo metus. Ligininėje I *papC* genas buvo daugiausiai būdingas 2014 metų izoliatams ( $p = 0,005$ ), ligininėje VIII virulentiškumo genai *cvaC* ir *afaB/C* taip pat buvo daugiau būdingi 2014 metų izoliatams ( $p = 0,015$  ir  $p < 0,00001$  atitinkamai). Ligininėje XI virulentiškumo genas *hlyA* buvo daugiausiai būdingas izoliatams išskirtiems 2018 metais ( $p = 0,038$ ).

### 3.2.3. *E. coli* izoliatų filogenetinių grupių nustatymas

Tiriamieji *E. coli* izoliatai buvo suskirstyti į filogenetines grupes pagal Clermont (2013) keturių genų pasiskirstymo metoda. Buvo nustatyta, kad visus tirtus izoliatus buvo galima suskirstyti į keturias filogenetines grupes: A, B1, B2 ir F. Daugiausiai izoliatų (79,3 % visų izoliatų) buvo priskirti grupei A, mažiausias izoliatų skaičius – grupei B1 (0,8 %).

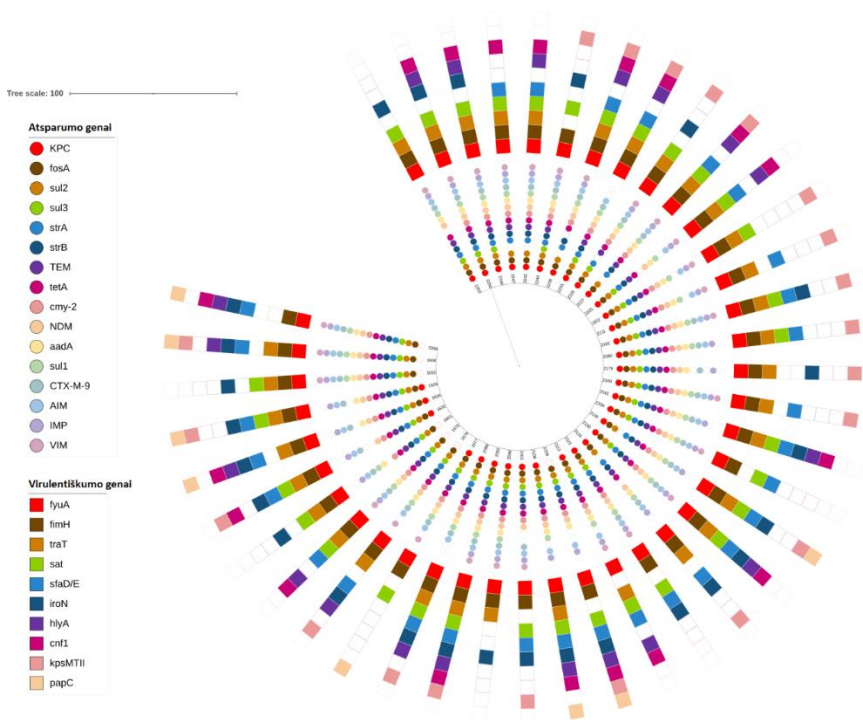
Izoliatai iš filogenetinės grupės A buvo suskirstyti į tris grupes, remiantis keturių genų pasiskirstymo metodo rezultatais (**Priedas 3**). Pirmajai grupei buvo priskirti izoliatai, kuriuose buvo aptiktas genas *yjaA*, antrai grupei – turintys geną *arpA*, o trečiai grupei buvo priskirti izoliatai, kuriuose nei vienas iš keturių genų nebuvo aptiktas. Daugiausiai izoliatų buvo aptikta pirmoje ir trečioje grupėse (93 ir 108 izoliatai), mažiausiai – antroje grupėje, kur buvo

\* Statistiškai patikima  $p$  reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

aptikti tik du izoliatai, po vieną iš abiejų tyrimo metų. Filogenetinės grupės A analizė parodė, kad šioje grupėje labiausiai dominavo du virulentiškumo genai: *fimH* (98,5 % visų grupės izoliatų) ir *fyuA* (89 % izoliatų). Buvo nustatyta, kad dažniausias virulentiškumo genų derinys buvo *fimH-fyuA-traT*, nustatytas 73,4 % grupės A izoliatų. Taip pat buvo įvertintas atsparumo genų pasiskirstymas filogenetinėje grupėje A ir rezultatai parodė, kad dažniausi genai buvo: *tetA* (100 % filogenetinės grupės A izoliatų), *strB* (99,5 %), *sul2* (99,5 %), *bla<sub>TEM</sub>* (99 %) ir *bla<sub>NDM</sub>* (98,5 %), o dažniausias atsparumo genų derinys, kuris buvo aptiktas 62,1 % filogenetinės grupės izoliatų, buvo *tetA-strB-sul2-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-bla<sub>AIM</sub>-fosA-sul3-bla<sub>CTX-M-9</sub>-aadA-bla<sub>IMP</sub>*.

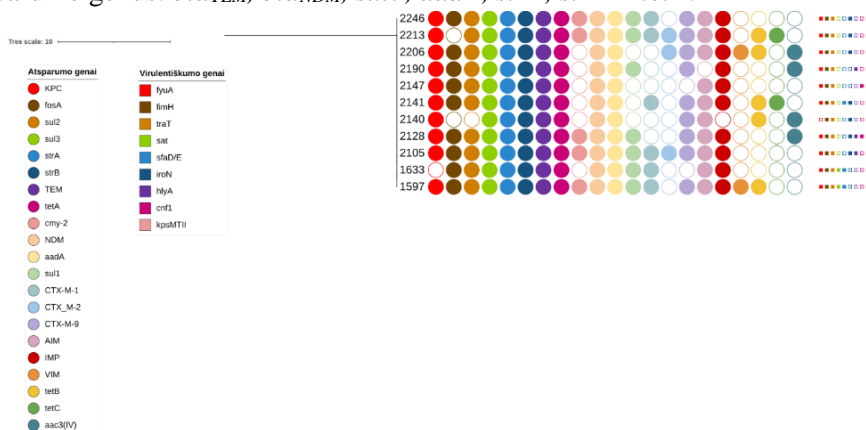
Du izoliatai, priskirti filogenetinei grupei B1, remiantis keturių genų pasiskirstymo metodu (aptikus tik *TspE4, C2* geną), buvo išskirti 2014 metais iš skirtingų ligoninių – ligoninių I ir II. Abu šie izoliatai turėjo virulentiškumo geną *fimH*. Abu filogenetinės grupės kamienai turėjo atsparumo β-laktaminiams antibiotikams genus: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-9</sub>* grupė, *bla<sub>AIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* ir *bla<sub>NDM</sub>*; taip pat fosfomicino atsparumo geną *fosA*, sulfonamidų atsparumo genus *sul1*, *sul2* ir *sul3*; aminoglikozidų atsparumo genus *strA*, *strB* ir *aadA* bei tetraciklino atsparumo geną *tetA*.

Antrai pagal izoliatų gausumą filogenetinei grupei B2 (**3.4 pav.**) analizės metu buvo priskirti 15,6 % visų tirtų *E. coli* izoliatų, kurie, remiantis keturių genų pasiskirstymo metodo rezultatais, turėjo genus *chuA* ir *yjaA*. Šios filogenetinės grupės analizės metu buvo nustatyta, kad visi šios grupės izoliatai (100 %) turėjo sideroforą jersinijabaktiną, koduojamą geno *fyuA*, o 97,5 % šios grupės izoliatų turėjo I tipo fimbriją koduojantį geną *fimH*. Dažniausias virulentiškumo genų derinys buvo *fyuA-fimH-traT-sat* (60 % filogenetinės grupės B2 izoliatų). Buvo nustatyti šios filogenetinės grupės atsparumo genai ir rezultatai parodė, kad visi šios grupės izoliatai turėjo skirtingų atsparumo grupių genus: *fosA*, *sul2*, *strA* ir *tetA*, o dažniausias atsparumo genų derinys buvo *fosA-sul2-strA-tetA-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>AIM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strB-aadA*, kuris buvo nustatytas 85 % filogenetinės grupės B2 izoliatų.



3.4 pav. *E. coli* filogenetinės grupės B2 dendrograma.

Filogenetinė grupė F (3.5 pav.), kuri buvo aptikta 4,3 % visų tirtų *E. coli* izoliatų (11 izoliatų), filogenetinio nustatymo metu turėjo tik vieną iš keturių genų *chuA*. Tik du izoliatai buvo išskirti 2014 metais (iš skirtingų ligoninių, VII ir XI), kiti buvo izoliuoti 2018 metais (daugiausiai iš ligoninės VIII). Buvo nustatyta, kad visi filogenetinės grupės F izoliatai turėjo virulentiškumo genus *fimH* ir *traT*. Taip pat visi šios filogenetinės grupės izoliatai turėjo šiuos atsparumo genus: *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *sul3*, *aadA*, *strA*, *strB* ir *tetA*.



3.5 pav. *E. coli* filogenetinės grupės F dendrograma.



Buvo įvertinta filogenetinių grupių priklausomybė nuo ligininės, iš kurios izoliatai buvo išskirti. Statistinis duomenų įvertinimas parodė, kad nėra tiesioginės konkrečių filogenetinių grupių priklausomybės nuo ligininės ( $p > 0,05$ ) (3.16 lentelė) ir tai parodo, kad izoliatų filogenetinių grupių pasiskirstymas nepriklauso nuo ligininės aplinkos.

**3.16 lentelė.** *E. coli* izoliatų iš skirtingų ligininių filogenetinis pasiskirstymas ir statistinė filogenetinių grupių priklausomybė nuo ligininės.

	<b>Filogenetinė grupė A</b>	<b>Filogenetinė grupė B1</b>	<b>Filogenetinė grupė B2</b>	<b>Filogenetinė grupė F</b>
Ligininė I (n=38), n/%	27/71,1	1/2,6	7/18,4	2/5,3
Ligininė II (n=46), n/%	38/82,6	1/2,2	7/15,2	0
Ligininė III (n=7), n/%	6/85,7	0	1/14,2	0
Ligininė IV (n=18), n/%	16/88,9	0	2/11,1	0
Ligininė V (n=22), n/%	17/77,3	0	4/18,2	1/4,5
Ligininė VI (n=19), n/%	15/78,9	0	4/21,1	0
Ligininė VII (n=9), n/%	8/88,9	0	0	1/11,1
Ligininė VIII (n=45), n/%	37/82,2	0	4/8,9	4/8,9
Ligininė IX (n=10), n/%	7/70	0	2/20	1/10
Ligininė X (n=22), n/%	17/77,3	0	5/22,7	0
Ligininė XI (n=14), n/%	11/78,6	0	2/14,3	1/7,1
Ligininė XII (n=6), n/%	4/66,7	0	2/33,3	0
<b>Filogenetinės grupės priklausomybė nuo ligininės (<math>p</math> reikšmė)</b>	1,000	0,963	0,833	0,264

Buvo palygintas filogenetinių grupių pasiskirstymas priklausomai nuo izoliatų išskyrimo metų (3.17 lentelė).

**3.17 lentelė.** *E. coli* filogenetinių grupių pasiskirstymas skirtingais izoliatų išskyrimo metais\*.

	<b>Filogenetinė grupė A</b>	<b>Filogenetinė grupė B1</b>	<b>Filogenetinė grupė B2</b>	<b>Filogenetinė grupė F</b>
Bendras izoliatų skaičius ( $n = 256$ ), n/%	203/79,3	2/0,8	40/15,6	11/4,3
Izoliatų skaičius 2014 metais ( $n = 91$ ), n/%	77/84,6	2/2,2	10/11	2/2,2

\* Statistiškai patikima  $p$  reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

**Lentelės 3.17 tęsinys.** *E. coli* filogenetinių grupių pasiskirstymas skirtingais izoliatų išskyrimo metais.

	Filogenetinė grupė A	Filogenetinė grupė B1	Filogenetinė grupė B2	Filogenetinė grupė F
Izoliatų skaičius 2018 metais ( $n = 165$ ), $n/\%$	126/76,4	-	30/18,2	9/5,5
Statistinis filogenetinių grupių kitimo reikšmingumas ( $p$ reikšmė)	$> 0,05$	<b>0,049</b>	$> 0,05$	$> 0,05$

Buvo nustatyta, kad filogenetinės grupės B2 ir F buvo labiausiai būdingos izoliatams, išskirtiems 2018 metais. Filogenetinė grupė B1 buvo nustatyta tik 2014 metų izoliatuose. Atlikus šių duomenų statistinę analizę paaiškėjo, kad tik vienintelės filogenetinės grupės B1 kitimas nuo 2014 iki 2018 buvo statistiškai patikimas ( $p = 0,049$ ), kitų filogenetinių grupių kitimas buvo statistiškai nereikšmingas ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.4. *E. coli* rep-PGR genotipavimo rezultatai

#### 3.2.4.1. BOX-PGR genotipavimas

Visiems 256 *E. coli* izoliatams atliktas genotipavimas, norint nustatyti genetinį izoliatų panašumą bei genotipų įvairovę. Pirmiausia buvo naudotas BOX-PGR metodas, kuris suskirstė visus izoliatus į 235 genotipinius profilius. Šiais rezultatais remiantis buvo paruošta genotipavimo dendrograma, naudojantis UPGMA išdėstymo metodika (**Priedas 4**). Dendrograma parodė, kad visus gautus genotipinius profilius galima suskirstyti į keturioliką grupių (klasterių), pasižyminčių skirtingu genetiniu įvairumu, bei turinčių savitas atsparumo ir virulentiškumo genų kombinacijas (**Priedas 4**).

Klasterių analizė parodė, kad Klasteris 9 turėjo daugiausiai tirtų *E. coli* izoliatų ( $n = 56$ , 21,9 % visų izoliatų), o mažiausiai izoliatų priklausė Klasteriui 5 ( $n = 1$ , 0,4 %). Buvo nustatyta, kad dauguma klasterių (išskyrus Klasterius 3, 4 ir 5) apėmė izoliatus, išskirtus tiek 2014, tiek 2018 metais, tuo tarpu Klasteriai 3 ir 5 priklausė izoliatai, išskirti tik 2018 metais, o Klasteris 4 – izoliatų išskirtų tik 2014 metais.

Toliau analizuojant susidariusius genotipavimo klasterius buvo nustatyta, kad Klasteriui 1 priklausė daugiausia izoliatų, išskirtų 2018 metais (21 iš 27 klasterio izoliatų). Buvo nustatyta, kad visi šio klasterio izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>* bei vieną virulentiškumo geną

*fimH*. Tačiau Klasterio 1 izoliatai neturėjo *afaB/C* ir *ibeA* virulentiškumo genų, kurie yra atsakingi už patogeninių *E. coli* kamienų adheziją ir invaziją į šeimininko ląsteles.

Kaip ir Klasteris 1, Klasteris 2 turėjo daugiausiai izoliatų, išskirtų 2018 metais (9 izoliatai iš 12), tačiau pasižymėjo didesne atsparumo ir virulentiškumo determinančių įvairove. Visi Klasterio 2 izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>* bei turėjo virulentiškumo genų derinį *fimH-fyuA*.

Klasteris 3 turėjo izoliatų, išskirtų tik 2018 metais, o visi izoliatai pasižymėjo dideliu atsparumo genų įvairumu. Nustatyta, kad visi šio klasterio izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>AIM</sub>-aadA-bla<sub>CTX-M-9</sub>-bla<sub>IMP</sub>-sul1-bla<sub>KPC</sub>-bla<sub>VIM</sub>*, tačiau nei vienas iš šio klasterio izoliatų neturėjo atsparumo genų *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *tetB*, *aac3(IV)*, *tetC* ir *mcr-1*. Virulentiškumo determinančių analizė parodė, kad visi Klasterio 3 izoliatai turėjo virulentiškumo genų derinį *fimH-fyuA-traT*, tačiau tarp šio klasterio izoliatų nebuvo nustatyti genai *kpsMTII*, *papC*, *cvaC*, *afaB/C* ir *ibeA*.

Klasteriui 4 priklausė tik tris izoliatus, kurie buvo išskirti 2014 metais. Visi šie izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>AIM</sub>-sul3-aadA-bla<sub>CTX-M-9</sub>* bei ne viename iš izoliatų nebuvo aptikti genai: *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CMY-2</sub>*, *tetB*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* ir *mcr-1*. Taip pat visiems šio klasterio izoliatams buvo nustatyti virulentiškumo genai *fimH* ir *fyuA*, tačiau izoliatai neturėjo virulentiškumo genų *sat*, *sfaD/E* ir *afaB/C*, atsakingų už patogeninių *E. coli* kamienų adheziją prie šeimininko ląstelių.

Klasteriui 5 priklausė tik viena izoliata, išskirtą 2018 metais iš ligoninės VIII. Šio klasterio izoliatas pasižymėjo dideliu atsparumo genų įvairumu, nes turėjo genus iš skirtingų atsparumo genų grupių bei turėjo genų derinį: *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-bla<sub>AIM</sub>-sul3-aadA-bla<sub>CTX-M-9</sub>-sul1-bla<sub>CMY-2</sub>-bla<sub>CTX-M-1</sub>-tetB-bla<sub>CTX-M-2</sub>-mrc1*. Taip pat šio klasterio izoliatai buvo nustatyti virulentiškumo genai *fimH*, *fyuA*, *traT* ir *iroN*, atsakingi už patogeno adheziją bei *E. coli* geležies pasisavinimą.

Buvo išskirta klasterių grupė, kurios izoliatų skaičius siekė iki 16. Taip pat šios grupės klasteriai pasižymėjo didelių atsparumo ir virulentiškumo genų įvairumu. Klasterio 6 visi izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-sul3-aadA-bla<sub>IMP</sub>*, tačiau nei viename iš izoliatų nebuvo aptikti *bla<sub>CTX-M-2</sub>* ir *mcr-1* atsparumo genai. Vertinant Klasterio 6 virulentiškumo genus buvo nustatyta, kad visiems izoliatams yra būdingi genai *fimH*, *fyuA* ir *traT*. Visuose Klasterio 7 izoliatuose buvo aptiktas *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-sul3-bla<sub>CTX-M-9</sub>* atsparumo genų derinys bei *fimH-fyuA* virulentiškumo genų derinys, tačiau šio klasterio izoliatams nebuvo būdingi virulentiškumo genai *papC* ir *afaB/C*, atsakingi už patogeno adheziją.

Klasterio 10 izoliatuose nebuvo būdingas nei vienas bendras virulentiškumo genas, tačiau visi šio klasterio izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>AIM</sub>* ir nei vienas izoliatas neturėjo atsparumo geno *bla<sub>CTX-M-2</sub>*. Vertinant Klasterio 11 dendrogramos duomenis nustatyta, kad visi šio klasterio izoliatai turėjo virulentiškumo geną *fimH* bei atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-bla<sub>AIM</sub>*. Klasteris 13 skyrėsi nuo šios grupės klasterių tuo, kad jame dominavo izoliatai, išskirti 2018 metais. Be to, visi Klasterio 13 izoliatai turėjo atsparumo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>CTX-M-9</sub>-aadA* bei virulentiškumo genų derinį *fimH-fyuA*.

Kita klasterių grupė, kurios izoliatų skaičius buvo  $\leq 31$ , bei buvo nustatytas panašus izoliatų santykis iš abiejų izoliatų išskyrimo metų, pasižymėjo tam tikru atsparumo ir virulentiškumo determinančių variabilumu. Antras pagal izoliatų skaičių, Klasteris 8, aprėpė 31 *E. coli* izoliatą. Šio klasterio izoliatai pasižymėjo tuo, kad neturėjo nei vieno jiems bendrai būdingo virulentiškumo geno, tačiau turėjo visuose klasterio izoliatuose sutinkamą atsparumo genų derinį *tetA-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>AIM</sub>*. Dar vienas klasteris, Klasteris 12, taip pat neturėjo vyraujančio virulentiškumo geno arba jų derinio, tačiau jam buvo būdingas atsparumo genų derinys *tetA-sul2-strA-bla<sub>AIM</sub>* bei *mcr-1* geno nebuvimas. Klasteris 14, kaip ir prieš tai apibūdintas klasteris, neturėjo atsparumo geno *mcr-1*, tačiau turėjo genų derinį *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-fosA-bla<sub>AIM</sub>* bei virulentiškumo genų derinį *fimH-fyuA*.

BOX-PGR dendrogramoje dominuojantis Klasteris 9 pasižymėjo didesniu izoliatų, išskirtų 2018 metais, skaičiumi (39 izoliatai iš 56). Visiems šio klasterio izoliatams būdingas didelis atsparumo ir virulentiškumo genų įvairumas, tačiau vienas atsparumo genas – *tetA*, atsakingas už atsparumą tetraciklinams, ir vienas virulentiškumo genas *fimH*, atsakingas už patogeno adheziją, buvo nustatyti visuose šio klasterio izoliatuose.

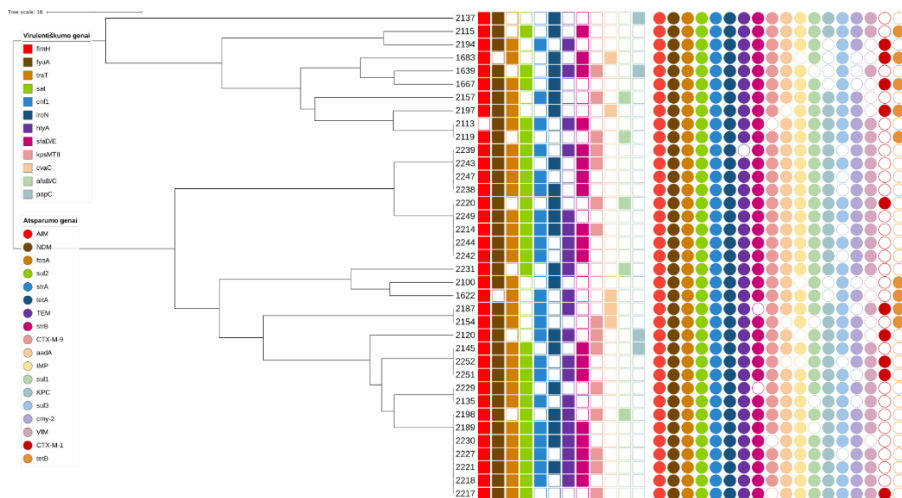
Analizuojant BOX-PGR genotipinius profilius, buvo nustatyta, kad septyniolika genotipinių profilių turėjo po du ar tris izoliatas. Šie genotipiniai profiliai priklausė Klasteriams 1, 9, 10, 12, 13 ir 14. Nei vieno profilio su daugiau nei vienu izoliatų nebuvo aptikta Klasteriuose 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ir 11. Buvo nustatyta, kad visi šių profilių izoliatai buvo išskirti skirtingose ligoninėse (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI ir XII). Šių *E. coli* izoliatų tolimesniam ištyrimui buvo pasitelktas (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimas.

#### 3.2.4.2. (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimas

Septyniolika unikalių BOX-PGR išskirtų genotipavimo profilių, priklausančių klasteriams 1, 9, 10, 12, 13 ir 14, buvo toliau analizuojami

naudojantis kitu rep-PGR metodu, (GTG)<sub>5</sub>-PGR. Iš viso buvo tiriami 37 *E. coli* izoliatai. Atlikus duomenų analizę buvo sukonstruota genotipavimo dendrograma, naudojant UPGMA metodą (**3.6 paveikslas**). Rezultatai parodė, kad beveik visi šiame metode tirti izoliatai buvo genetiškai labai panašūs, išskyrus vieną izoliatą – 2137, iš ligoninės XII, išskirtą 2018 metais.

Tolimesnė duomenų analizė parodė, kad visus izolatus galima suskirstyti į dvi filogenetines grupes: A (29 izoliatai) ir B2 (8 izoliatai). Vertinant atsparumo genų pasiskirstymą tarp išskirtų izoliatų buvo nustatyta, kad visiems šiame genotipavimo metode naudotiems izoliatams yra būdingas atsparumo genų derinys *bla*<sub>AIM</sub>-*bla*<sub>NDM</sub>-*fosA*-*sul2*-*strA*-*tetA*, bet nei viename izoliate nesutinkami atsparumo genai *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *tetC*, *aac3(IV)* ir *mcr-1*. Taip pat analizuojant šios izoliatų grupės virulentiškumo genus buvo nustatyta, kad nei vienas iš šių izoliatų neturėjo virulentiškumo geno *ibeA* (patogeno invazijos faktoriaus), o *fimH* ir *fyuA* genai buvo sutinkami visuose izoliatuose, išskyrus 1683 (išskirtas 2014 m. ligoninėje II) ir 2113 (išskirtas 2018 m. ligoninėje I).

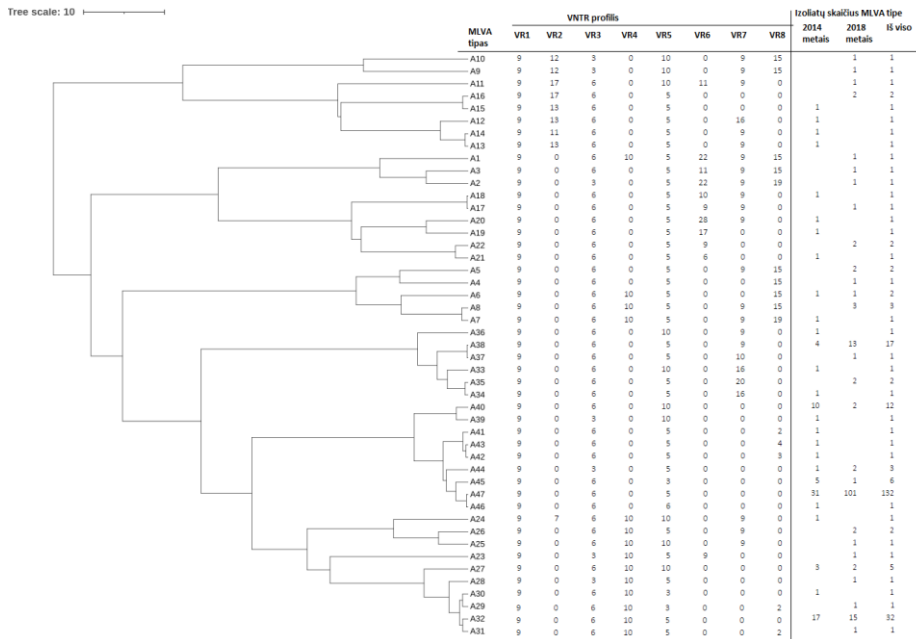


**3.6 paveikslas.** *E. coli* atrinktų izoliatų (GTG)<sub>5</sub>-PGR dendrograma.

### 3.2.5. *E. coli* MLVA genotipavimo rezultatai

Visiems tirtiems 256 *E. coli* izoliatams, išskirtiems iš skirtingų Lietuvos ligoninių bei izoliuotiems 2014 ir 2018 m., buvo atliktas MLVA genotipavimas bei paruošta genotipavimo dendrograma, naudojantis UPGMA išdėstymo metodika (**3.7 pav.**). Po MLVA profilių analizės visi tirti *E. coli* izoliatai buvo suskirstyti į keturiasdešimt septynis MLVA tipus, remiantis

susidariusiais skirtingais VNTR profiliais. Dažniausias MLVA tipas tarp izoliatų buvo A47, kuriam buvo priskirti 131 *E. coli* izoliatai (51,2 % visų tirtų izoliatų). Taip pat, A47 tipe 30 izoliatų (33 % visų išskirtų izoliatų) buvo išskirta 2014 metais, o 101 izoliatas (61,2 % visų išskirtų izoliatų) – 2018 metais. Antram pagal dažnumą MLVA tipui, A32, priklausė 32 izoliatai (12,5 % visų *E. coli* izoliatų), iš kurių 17 buvo išskirta 2014 metais ir 15 izoliatų – 2018 metais.



**3.7 pav.** *E. coli* MLVA dendrograma.

MLVA tipams, kurie turėjo daugiau nei tris izoliatų, buvo papildomai įvertintos atsparumo ir virulentiškumo determinantės bei įvertintos dominuojančios filogenetinės grupės. Iš viso šeši MLVA tipai turėjo daugiau nei tris izoliatų. MLVA tipo A27 visi izoliatai turėjo virulentiškumo geną *fyuA*, taip pat atsparumo genų derinį *bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>CTX-M-9</sub>-bla<sub>AIM</sub>-bla<sub>IMP</sub>-fosA-sul2-sull1-aadA-strA-strB-tetA*, o beveik visi izoliatai (išskyrus vieną, priklausančią F grupei) priklausė filogenetinei grupei A. A32 tipo izoliatai neturėjo nei vieno būdingo šiam tipui virulentiškumo geno, tačiau pasižymėjo atsparumo genų deriniu *bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>CTX-M-9</sub>-bla<sub>AIM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-fosA-strB-tetA*, o 27 šio tipo izoliatai priklausė filogenetinei grupei A, likę 5 – filogenetinei grupei B2. A38 tipo izoliatai pasižymėjo virulentiškumo geno *fimH* buvimu, atsparumo genų deriniu *bla<sub>AIM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-fosA-sul2-strA-strB-tetA* bei priklausymu

filogenetinėms grupėms A (13 iš 17 izoliatų) ir B2 (4 iš 17 izoliatų). Visuose MLVA tipo A40 izoliatuose buvo nustatytas virulentiškumo genas *fimH* bei atsparumo genų derinys *bla<sub>TEM</sub>-fosA-sul2-sul3-strA-strB-tetA*, taip pat filogenetinės grupės A (9 iš 12 izoliatų) ir F (3 iš 12 izoliatų). Visuose A45 tipo izoliatuose buvo aptiktas virulentiškumo genas *fimH*, atsparumo genų derinys *bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>CTX-M-9</sub>-bla<sub>AIM</sub>-bla<sub>IMP</sub>-bla<sub>NDM</sub>-fosA-sul2-sul3-strA-strB-tetA* bei dominuojanti filogenetinė grupė A (išskyrus vieną F grupės izoliatą). Dominuojančiame tipe A47 nebuvo aptikta nei vieno virulentiškumo geno, kuris būtų būdingas visiems šio tipo izoliatams, tačiau visuose šio tipo izoliatuose buvo aptiktas atsparumo genų derinys *bla<sub>TEM</sub>-sul2-tetA*, o visi izoliatai buvo suskirstyti į keturias filogenetines grupes: grupę A (103 izoliatai iš 132), grupę B1 (2 izoliatai), grupę B2 (24 izoliatai) ir grupę F (3 izoliatai).

Buvo nustatyta kelių MLVA tipų priklausomybė nuo izoliavimo metų. Rezultatai parodė, kad MLVA tipas A32 buvo labiausiai būdingas 2014 metais išskirtiems izoliatams ( $p = 0,038$ ), kaip ir tipai A40 ir A45 ( $p = 0,001$  ir  $p = 0,014$  atitinkamai). Buvo nustatyta, kad tipas A47 buvo labiausiai būdingas izoliatams, išskirtiems 2018 metais ( $p = 0,004$ ). Kiti MLVA tipai statistiškai patikimos priklausomybės nuo izoliavimo metų neturėjo (**3.18 lentelė**).

**3.18 lentelė.** *E. coli* MLVA tipų pasiskirstymas skirtingais metais\*.

MLVA tipas	Izoliatų skaičius 2014 metais, <i>n</i>	Izoliatų skaičius 2018 metais, <i>n</i>	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė	MLVA tipas	Izoliatų skaičius 2014 metais, <i>n</i>	Izoliatų skaičius 2018 metais, <i>n</i>	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė
A1	0	1	0,552	0,458	A25	0	2	1,103	0,294
A2	0	1	0,552	0,458	A26	0	2	1,103	0,294
A3	0	1	0,552	0,458	A27	3	2	1,305	0,253
A4	0	1	0,552	0,458	A28	0	1	0,552	0,458
A5	0	2	1,103	0,294	A29	0	1	0,552	0,458
A6	1	1	0,182	0,669	A30	1	0	1,813	0,178
A7	1	0	1,813	0,178	A31	0	1	0,552	0,458
A8	0	3	1,655	0,198	A32	17	15	4,316	<b>0,038</b>
A9	0	1	0,552	0,458	A33	1	0	1,813	0,178
A10	0	1	0,552	0,458	A34	1	0	1,813	0,178
A11	0	1	0,552	0,458	A35	0	2	1,103	0,294
A12	1	0	1,813	0,178	A36	1	0	1,813	0,178
A13	1	0	1,813	0,178	A37	0	1	0,552	0,458
A14	1	0	1,813	0,178	A38	4	13	1,072	0,301
A15	1	0	1,813	0,178	A39	1	0	1,813	0,178
A16	0	2	1,103	0,294	A40	10	2	11,960	<b>0,001</b>
A17	0	1	0,552	0,458	A41	1	0	1,813	0,178
A18	1	0	1,813	0,178	A42	1	0	1,813	0,178
A19	1	0	1,813	0,178	A43	1	0	1,813	0,178

\* Statistiškai patikima *p* reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.

**Lentelės 3.18 tęsinys. *E. coli* MLVA tipų pasiskirstymas skirtingais metais.**

MLVA tipas	Izoliatų skaičius 2014 metais, <i>n</i>	Izoliatų skaičius 2018 metais, <i>n</i>	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė	MLVA tipas	Izoliatų skaičius 2014 metais, <i>n</i>	Izoliatų skaičius 2018 metais, <i>n</i>	$\chi^2$	<i>p</i> reikšmė
A20	1	0	1,813	0,178	A44	1	2	0,006	0,936
A21	1	0	1,813	0,178	A45	5	1	5,980	<b>0,014</b>
A22	0	2	1,103	0,294	A46	1	0	1,813	0,178
A23	0	1	0,552	0,458	A47	31	101	8,382	<b>0,004</b>
A24	1	0	1,813	0,178					

Buvo nustatytas MLVA tipų pasiskirstymas tarp skirtingų ligoninių bei įvertinta tipų priklausomybė nuo konkrečios ligoninės. Statistiškai patikimi rezultatai buvo aptikti penkiuose MLVA tipuose vertinant jų priklausomybę tam tikrai ligoninei ( $p < 0,05$ ). Šiuos tipus apėmė tipas A23, kuris statistiškai patikimai buvo labiausiai būdingas ligoninei III, tipai A25 ir A26, kurie buvo labiausiai būdingi ligoninei XII ( $p = 0,00002$  ir  $p = 0,023$  atitinkamai), taip pat tipas A35, statistiškai patikimai būdingas ligoninei III ( $p = 0,049$ ), bei tipas A45, kuris buvo patikimai būdingas ligoninei VII ( $p = 0,025$ ). Kiti MLVA tipai tiesioginės priklausomybės nuo konkrečių ligoninių neturėjo (**3.19 lentelė**).

**3.19 lentelė. *E. coli* MLVA tipų pasiskirstymas ir priklausomybė nuo skirtingų ligoninių\*.**

MLVA tipas	Izoliatų skaičius ligoninėse, <i>n</i>											MLVA tipo priklausomybė nuo ligoninės, <i>p</i> reikšmė	
	Ligoninės numeris												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
A1				1									0,279
A2								1					0,945
A3								1					0,945
A4								1					0,945
A5	1					1							0,704
A6	1									1			0,784
A7											1		0,100
A8		1		1						1			0,759
A9								1					0,945
A10								1					0,945
A11	1												0,890
A12		1											0,950
A13								1					0,945
A14		1											0,950
A15		1											0,950
A16									1	1			0,120

\* Statistiškai patikima *p* reikšmė ( $p \leq 0,05$ ) yra paryškinta.



**Lentelės 3.19 tęsinys. *E. coli* MLVA tipų pasiskirstymas ir priklausomybė nuo skirtingų lignoninių.**

MLVA tipas	Izoliatų skaičius ligininėse, n											MLVA tipo priklausomybė nuo ligininės, <i>p</i> reikšmė	
	Lignoninės numeris												
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI		XII
A17							1						0,945
A18	1												0,890
A19										1			0,100
A20				1									0,279
A21		1											0,950
A22							1		1				0,826
A23			1										<b>0,0002</b>
A24								1					0,945
A25											1		<b>0,00002</b>
A26								1			1		<b>0,023</b>
A27	1	1		1					1		1		0,614
A28		1											0,950
A29	1												0,890
A30						1							0,329
A31										1			0,474
A32	5	8	1	3	3	2	3	2		2	2	1	0,688
A33		1											0,950
A34										1			0,474
A35		1	1										<b>0,049</b>
A36		1											0,950
A37								1					0,945
A38	2	1		3	3	1		4	1	2			0,623
A39		1											0,950
A40	4	4					1	2		1			0,563
A41								1					0,945
A42		1											0,950
A43		1											0,950
A44		1				1		1					0,919
A45		2				1	2				1		<b>0,025</b>
A46		1											0,950
A47	21	16	4	8	16	12	3	24	7	11	8	3	0,835

Papildomai buvo įvertinta VNTR alelių genetinė įvairovė, priklausomai nuo *E. coli* izoliatų išskyrimo metų bei skirtingų lignoninių. Genetinei įvairovei nustatyti buvo panaudotas Nei įvairovės indeksas (*D*). Rezultatai parodė, kad didžiausia genetinė įvairovė bei didžiausiu lokusų polimorfizmu pasižymėjo VNTR lokusai VR4 ir VR7 (įvairovės indekso reikšmės 0,33 ir 0,3 atitinkamai), mažiausiu lokusų polimorfizmu pasižymėjo VNTR lokusai VR1, VR2, VR3 ir VR6, kurių polimorfizmas nesiekė 0,1 (**3.20 lentelė**).

**3.20 lentelė.** Alelių pasiskirstymas skirtinguose VNTR lokusuose, remiantis skirtingais *E. coli* izoliatų išskyrimo metais.

VNTR lokusas	Alelis	2014 metai (n=91)		2018 metai (n=165)		<i>p</i> reikšmė	Iš viso izoliatų (n=256)	
		n/%	<i>D</i>	n/%	<i>D</i>		n/%	<i>D</i>
<b>VR1</b>	9	91/100	0	165/100	0	-	256/100	0
<b>VR2</b>	0	86/94,5	0,11	160/97	0,06	0,951	245/95,7	0,08
	7	1/1,1					1/0,4	
	11	1/1,1					1/0,4	
	12			1/0,6			1/0,4	
	13	3/3,3		1/0,6			4/1,6	
	17			3/1,8			3/1,2	
<b>VR3</b>	3	2/2,2	0,04	5/3	0,06	0,926	8/3,1	0,06
	6	89/97,2		160/97			248/96,9	
<b>VR4</b>	0	66/72,5	0,40	141/85,5	0,25	0,937	53/20,7	0,33
	10	25/27,5		24/14,5			203/79,3	
<b>VR5</b>	3	6/6,6	0,43	2/1,2	0,10	0,725	2/0,8	0,20
	5	66/72,5		156/94,5			228/89,1	
	6	1/1,1					1/0,4	
	10	18/19,8		7/4,3			25/9,8	
<b>VR6</b>	0	87/95,6	0,09	156/94,5	0,11	0,917	243/94,9	0,10
	6	1/1,1					1,0,4	
	9			4/2,4			4/1,6	
	10	1/1,1					1/0,4	
	11			3/1,8			3/1,2	
	17	1/1,1					1/0,4	
	22			2/1,2			2/0,8	
	28	1/1,1					1/0,4	
<b>VR7</b>	0	82/90,1	0,18	133/80,6	0,32	0,770	211/82,4	0,30
	9	6/6,6		28/17			38/14,8	
	10			2/1,2			2/0,8	
	16	3/3,3					3/1,2	
	20			2/1,2			2/0,8	
<b>VR8</b>	0	86/94,5	0,11	153/92,7	0,14	0,897	237/92,6	0,14
	2	1/1,1		2/1,2			3/1,2	
	3	1/1,1					1/0,4	
	4	1/1,1					1/0,4	
	15	1/1,1		9/5,5			12/4,7	
	19	1/1,1		1/0,6			2/0,8	

Vertinant alelių įvairovę skirtingais izoliavimo metais, Nei indekso reikšmės 2014 metais išskirtuose izoliatuose pasiskirstė nuo 0 (jokios įvairovės) iki 0,43 (mediana 0,11), o 2018 metais išskirtuose izoliatuose – nuo 0 iki 0,32 (mediana 0,1–0,11). Didžiausiu polimorfizmu 2014 metais pasižymėjo VNTR lokusas VR5 ( $D = 0,43$ ), 2018 metais – lokusas VR7 ( $D =$

0,32) (**3.20 lentelė**). Tačiau nebuvo nustatyta statistiškai patikimos polimorfinių alelių priklausomybės nuo izoliatų išskyrimo metų ( $p > 0,05$ ,  $p$  reikšmė variavo nuo 0,73 iki 0,95).

Genetinė įvairovė skirtinguose lokusuose buvo palyginta, priklausomai nuo ligoninių, iš kurių *E. coli* izoliatai buvo išskirti. Rezultatai parodė, kad didžiausiu alelių polimorfizmu skirtingose ligoninėse pasižymėjo VNTR lokusai VR4 (ligoninėse I, III, VI, XI ir XII), VR5 (ligoninėje VII) ir VR7 (ligoninėse II, IV, V, VIII, IX ir X). Šių polimorfinių lokusų reikšmės ligoninėse svyravo nuo 0,27 iki 0,61 (**3.21 lentelė**). Tačiau įvertinus statistinę alelių polimorfizmo priklausomybę nuo skirtingų ligoninių, tiesioginės statistinės priklausomybės nustatyta nebuvo ( $p > 0,05$ ,  $p$  reikšmės buvo apie 0,9).

3.21 lentelė. *E. coli* izoliatų alelių pasiskirstymas VNTR lokusuose.

VNTR lokusas	Alelis	Ligoninė I (n=38)		Ligoninė II (n=46)		Ligoninė III (n=7)		Ligoninė IV (n=18)		Ligoninė V (n=22)		Ligoninė VI (n=19)		Ligoninė VII (n=9)		Ligoninė VIII (n=45)		Ligoninė IX (n=10)		Ligoninė X (n=22)		Ligoninė XI (n=14)		Ligoninė XII (n=6)		p reikšmė														
		n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D															
VR1	9	38/100	0	46/100	0	7/100	0	18/100	0	22/100	0	19/100	0	9/100	0	45/100	0	10/100	0	22/100	0	14/100	0	6/100	0															
VR2	0	37/97,4	0,05	43/93,5	0,12	7/100	0	18/100	0	22/100	0	19/100	0	9/100	0	41/91,1	0,17	9/90	0,18	21/95,5	0,09	14/100	0	6/100	0	0,99991														
	7																																							
	11			1/2,2																																				
	12																																							
	13					2/4,3																																		
	17	1/2,6																1/10		1/4,5																				
VR3	3		0,00	3/6,5	0,99	1/14,3	0,24		0		0	1/5,3	0,10		0	3/6,7	0,12		0		0		0		0	0,98535														
	6	38/100		43/93,5		6/85,7		18/100		22/100		18/94,7		9/100		42/93,3		10/100		22/100		14/100		6/100																
VR4	0	30/78,9	0,33	36/78,3	0,34	5/71,4	0,41	13/72,2	0,40	19/88,4	0,24	16/84,2	0,27	6/66,7	0,44	41/91,1	0,16	9/90	0,18	19/86,4	0,24	9/64,3	0,59	3/50	0,50	0,99999														
	10	8/21,1		10/21,7		2/28,6		5/27,8		3/13,6		3/15,8		3/33,3		4/8,9		1/10		3/13,6		5/35,7		3/50																
VR5	3	1/2,6	0,31	2/4,3	0,39		0		0,10		0	2/10,5	0,19	2/22,2	0,49		0,20		0,18		0,09		0,26	1/7,1	0,28	0,99996														
	5	31/81,6		35/76,1		7/100		17/94,4		22/100		17/89,5		6/66,7		40/88,9		21/95,5		12/85,7		5/83,3																		
	6			1/2,2																																				
	10	6/15,8		8/17,4				1/5,6				1/11,1		5/11,1		1/10		1/4,5		1/7,1		1/16,7																		

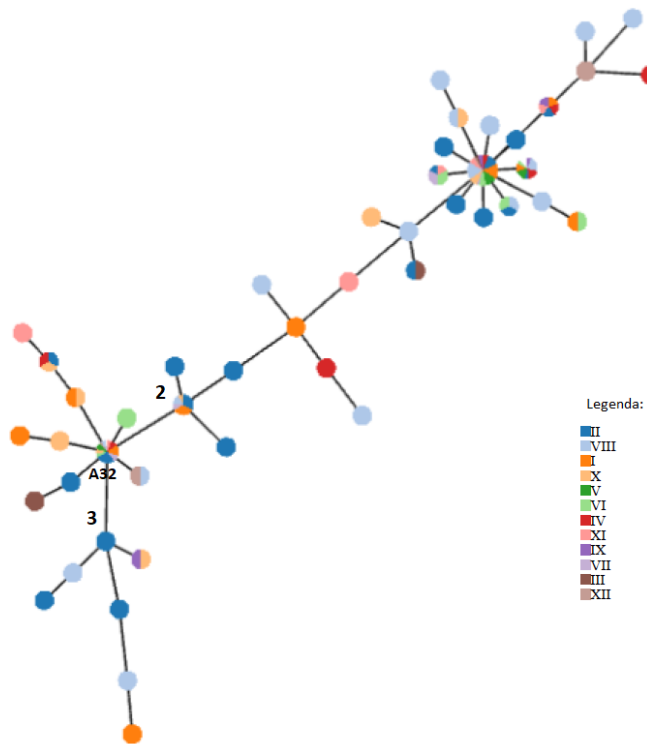
Lentelė 3.21 tęsinys. . *E. coli* izoliatų alelių pasiskirstymas VNTR lokusuose.

VNTR lokusas	Alelis	Ligoninė I (n=38)		Ligoninė II (n=46)		Ligoninė III (n=7)		Ligoninė IV (n=18)		Ligoninė V (n=22)		Ligoninė VI (n=19)		Ligoninė VII (n=9)		Ligoninė VIII (n=45)		Ligoninė IX (n=10)		Ligoninė X (n=22)		Ligoninė XI (n=14)		Ligoninė XII (n=6)		p reikšmė												
		n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D													
VR6	0	36/ 94,7	0,10	45/ 97,8	0,04	6/ 85,7	0,24	16/ 88,9	0,20	22/ 100	0	19/ 100	0	9/ 100	0	40/ 88,9	0,21	10/ 100	0	21/ 95,5	0,09	13/ 92,9	0,13	6/ 100	0	0,99995												
	6			1/ 2,2																																		
	9							1/ 14,3																					2/ 4,4									
	10	1/ 2,6																																				
	11	1/ 2,6																												2/ 4,4								
	17																																			1/ 7,1		
	22															1/ 5,6														1/ 2,2								
	28															1/ 5,6																						
VR7	0	31/ 81,6	0,31	31/ 67,4	0,54	6/ 85,7	0,24	9/ 50	0,61	16/ 72,7	0,43	18/ 94,7	0,10	7/ 77,8	0,37	29/ 64,4	0,54	8/ 80	0,34	16/ 72,7	0,44	13/ 92,9	0,13	4/ 66,7	0,44	0,99999												
	9	2/ 5,3		1/ 2,2				3/ 16,7				3/ 13,6				1/ 11,1				5/ 11,1				1/ 10				2/ 9,1										
	10	5/ 13,2		3/ 6,5				6/ 33,3				3/ 13,6				1/ 11,1				11/ 24,4				1/ 10				3/ 13,6						1/ 7,1				
	16			2/ 4,3																								1/ 4,5										
	20			1/ 2,2				1/ 14,3																														
VR8	0	36/ 94,7	0,10	43/ 93,5	0,12	7/ 100	0	16/ 88,9	0,20	22/ 100	0	18/ 94,7	0,10	9/ 100	0	39/ 86,7	0,24	10/ 100	0	20/ 90,9	0,17	13/ 92,9	0,13	6/ 100	0	0,99999												
	2	1/ 2,6																		1/ 2,2																		
	3			1/ 2,2																																		
	4			1/ 2,2																																		

**Lentelė 3.21** tęsinys. . *E. coli* izoliatų alelių pasiskirstymas VNTR lokusuose.

VNTR lokusas	Alelis	Ligoninė I (n=38)		Ligoninė II (n=46)		Ligoninė III (n=7)		Ligoninė IV (n=18)		Ligoninė V (n=22)		Ligoninė VI (n=19)		Ligoninė VII (n=9)		Ligoninė VIII (n=45)		Ligoninė IX (n=10)		Ligoninė X (n=22)		Ligoninė XI (n=14)		Ligoninė XII (n=6)		p reikšmė	
		n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D	n/%	D		
	15	1/2,6		1/2,2				2/11,1				1/5,3				4/8,9											
	19															1/2,2						1/7,1					

MLVA tipai buvo papildomai įvertinti pagal minimaliai apimantį medį (MST), siekiant nustatyti galimą VNTR alelių kilmę pagal ligoines, iš kurių buvo išskirti tiriamieji *E. coli* izoliatai (**3.8 pav.**). Rezultatai parodė, kad visi MLVA tipai kilo iš vieno tipo A32 (VNTR profilis: 9-0-6-10-5-0-0-0, paveiksle pažymėta „A32“), kurio izoliatai buvo išskirti iš visų ligoinių, išskyrus ligoinę IX. Toliau visi tipai išsišakojo į dvi giminingas šakas (pažymėtos paveiksle „2“ ir „3“), kurių „2“ šaka pasižymėjo didžiausiu izoliatų kilmės variabilumu (turėjo izoliatų, išskirtų iš visų tyrime dalyvavusių ligoinių) bei turėjo MLVA tipą A47, kurio izoliatai buvo išskirti iš visų tyrime dalyvavusių ligoinių. Giminingumo šakos „3“ MLVA tipai priklausė daugiausiai izoliatų iš ligoinių II ir VIII.



**3.8 pav.** *E. coli* MLVA tipų minimaliai apimantis medis (MST), remiantis izoliatų kilme. Apskritimais pažymėti skirtingi MLVA tipai. Spalvos atitinka skirtingas ligoines (pagal legendą).

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tirti *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* klinikiniai izoliatai, išskirti iš pacientų, kuriems buvo diagnozuota bakteremija (sepsis), o mėginiai buvo paimti iš kraujo ir/ar likvoro pasėlių. Visi izoliatai pasižymėjo daugiavaisčiu atsparumu antibiotikams bei buvo surinkti iš 12 (*E. coli*) ir 14 (*Acinetobacter* spp.) Lietuvos ligoninių.

Pirmoje šio darbo dalyje buvo įvertintas *Acinetobacter* spp. bakterijų paplitimas tarp Lietuvos ligoninių, įvertinti galimi plitimo keliai iš vienos ligoninės į kitą bei genetinės determinantės, lemiančios šios bakterijos efektyvų prisitaikymą išplisti. Pirmiausia buvo įvertintas *Acinetobacter* spp. kamienų paplitimas ir antibiotikams atsparumo genų kaita skirtingais tyrimo metais. Kelių dešimtmečių bėgyje vienu didžiausiu hospitalinių infekcijų sukėlėju, pernešančiu atsparumus antibiotikams laikomos *Acinetobacter* spp. genties bakterijos (Rafei et al., 2019), dėl savo gebėjimo išplisti visame pasaulyje, didelio prisitaikymo prie besikeičiančių aplinkos sąlygų ir gebėjimo adaptuotis prie ligoninėse esančių antibiotikų vartojimo strategijų. Dėl šių adaptacinių savybių, aplinkoje didėja daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčių *Acinetobacter* spp. kamienų. Tyrimai rodo, kad *Acinetobacter* spp. kamienų atsparumas keičiasi metai iš metų ir bakterija įgauna atsparumą beveik visiems žinomiems ir šiuo metu ligoninėse naudojamiems antibiotikams (Bergogne-Berezin et al., 1996; Bergogne-Berezin et al., 2020). Dėl šios priežasties tik daugiavaisčiu atsparumu pasižymintys *Acinetobacter* spp. izoliatai buvo pasirinkti kaip tyrimo objektas. Tyrime buvo siekta nustatyta *Acinetobacter* spp. kamienų kaitą skirtingais tyrimo metais, priklausomybę nuo skirtingų ligoninių bei bakterijos patogeniškumo laipsnis. Tyrimo metu buvo ištirti 24 atsparumo genai, priklausantys keturioms atsparumo genų grupėms: koduojantys atsparumą aminoglikozidams, chinolonams, β-laktaminiams antibiotikams, taip pat eflukso pompos reguliaciniai genai.

Aminoglikozidų atsparumo genų analizė parodė, kad dažniausi šios grupės genai tarp visų izoliatų buvo *rmtB* (57,7 % visų izoliatų), *aphA6* (52,1 %) ir *aacC2* (51,6 %). *rmtB* genas yra siejamas su 16S rRNR metilazės produkcija, kuri sukelia fermentinius pakitimus 16S rRNR metiliniame ir taip padidina *Acinetobacter* spp. kamienų atsparumą aminoglikozidams. Lyginant šiuos gautus rezultatus su pasauline statistika, skirtingais tyrimų metais Prancūzijoje (Galimand et al., 2003), Japonijoje (Yamane et al., 2007) ir keliuose Azijos regionuose (Afganistane, Bangladeše, Kinijoje, Hong Konge, Indijoje, Korėjoje, Omane ir Pakistane) (Wachino ir Arakawa, 2012) taip pat



buvo aptiktos dideliu atsparumu aminoglikozidams pasižyminčios gramneigiamos bakterijos, gaminančios 16S rRNR metilazes. Kiti du dažniausi genai buvo atsakingi už tiesiogines aminoglikozidų modifikacijas, t.y. modifikacinių fermentų gamybą, kur *aphA6* genas kodavo fosfotransferazę APH (3')-Via bei *aacC2* genas kodavo acetiltransferazę AAC (3)-Iia. Abu šie fermentai kartu su APH fermentu yra dažniausia bakterijų atsparumo aminoglikozidams priežastis pasaulyje (Aliakbarzade et al., 2014). Vertinant aminoglikozidų atsparumą koduojančių genų kaitą skirtingais studijų metais buvo nustatyta, kad tam tikrų šios grupės genų įvairovė kito skirtingais metais ( $p < 0,05$ ). Atsparumo genų analizė parodė, kad keturių aminoglikozidus koduojančių genų (*aadA1*, *aphA6*, *armA* ir *rmtB*) statistiškai patikima kaita vyko penkerių metų periode tarp 2014 ir 2018 metų ( $p < 0,05$ ). Vertinant rezultatus tarp 2014 ir 2016 metų izoliatų buvo nustatyta, kad aminoglikozidų atsparumą koduojančių genų *aadA1*, *aphA6* ir *armA* dažnis sumažėjo ( $p < 0,05$ ). Šie rezultatai įrodė, kad skirtingais tyrimo metais vyko *Acinetobacter* spp. izoliatų aminoglikozidų atsparumą koduojančių genų kaita. Buvo nustatyta statistiškai patikima geno *rmtC* priklausomybė nuo tam tikros ligoninės, kadangi jo buvimas buvo būdingas tik ligoninėms I, VI ir VIII ( $p = 0,02$ ). Gauti rezultatai buvo palyginti su pasaulio duomenimis ir buvo nustatyti tam tikri atsparumo genų dažnio skirtumai. Moniri et al. (2010) įvertino aminoglikozidų atsparumą koduojančius genus 60 *Acinetobacter* izoliatų ir skirtingų pacientų Irano ligoninėse ir nustatė kitokius atsparumo genų dažnumus: *aacC1* genas buvo aptiktas 63,3 % izoliatų, *aphA6* 65 % izoliatų, *aadA1*–41,7 % ir *aadB* genas 3,3 % visų tirtų mėginių. Kitame tyrime Australijoje (Nigro et al., 2016) buvo įvertintas aminoglikozidų atsparumas 61 daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčiame *A. baumannii* izoliatai, kurie buvo surinkti 2000 ir 2010 metų periode iš šešių skirtingų Australijos ligoninių. Atrinktuose izoliatuose buvo ieškoma atsparumo genų *aadB*, *aacC1*, *aphA1b* ir *aphA6* ir buvo nustatyta, kad atsparumo genas *aphA6* buvo randamas, dažniausiai, kombinacijoje su *aacC1* ir, retkarčiais, su *aphA1b* genu. Šie gauti rezultatai nesutampa su šio darbo metu gautais rezultatais, kadangi šiame tyrime *Acinetobacter* spp. izoliatuose *aacC1* genas nebuvo aptiktas nei viename iš izoliatų, o *aadB* genas buvo aptiktas tik keliuose izoliatuose, išskirtuose 2018 metais. Toks rezultatų skirtumas parodo, kad nėra vienos būdingos tendencijos aminoglikozidų atsparumo determinančių plitime skirtingų šalių ligoninėse, nes skirtingose ligoninėse yra naudojami skirtingi antibiotikai ir jų deriniai.

Chinolonų atsparumą koduojantys genai *gyrA* ir *parC* buvo nustatyti visuose izoliatuose, nepriklausomai nuo jų išskyrimo metų, *qnrA* tik 2016 metais išskirtuose izoliatuose. Tarp chinolonų atsparumą koduojančių genų

dažniausi atsparumo genai buvo *parC* (62,9 % visų izoliatų) ir *gyrA* (23,7 %). Abu šie genai yra susiję su chinolonų taikinių, DNR girazės (*gyrA*) ir topoizomerazės IV (*parC*), mutacijomis (Cheung et al., 2005). Vertinant *qnrA* geno paplitimą pasaulyje, buvo nustatyta, kad šis genas yra labai paplitusi atsparumo determinantė tarp *Enterobacteriaceae* šeimos atstovų (Cheung et al., 2005; Fernández-Cuenca et al., 2003) bei tarp *A. baumannii* kamienų (Touati et al., 2008).

*Acinetobacter* spp. izoliatų didžiausia atsparumo genų grupė buvo β-laktaminių antibiotikų atsparumą koduojantys genai. Dažniausios genų grupės, nustatytos tarp visų izoliatų, buvo: *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-3* (rasta visuose tiriamuose izoliatuose, apėmė šiuos genus: *bla<sub>OXA-51</sub>*, *bla<sub>OXA-64</sub>*, *bla<sub>OXA-65</sub>*, *bla<sub>OXA-66</sub>*, *bla<sub>OXA-68</sub>*, *bla<sub>OXA-69</sub>*, *bla<sub>OXA-70</sub>*, *bla<sub>OXA-71</sub>*, *bla<sub>OXA-75</sub>*, *bla<sub>OXA-76</sub>*, *bla<sub>OXA-77</sub>* ir *bla<sub>OXA-78</sub>*), *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-2* (nustatyta, 96,9 % visų izoliatų, apėmė šiuos genus: *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-25</sub>*, *bla<sub>OXA-26</sub>*, *bla<sub>OXA-40</sub>* ir *bla<sub>OXA-72</sub>*) ir *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-1* (87,6 % izoliatų, apėmė: *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-27</sub>* ir *bla<sub>OXA-49</sub>*). Lyginant šiuos duomenis su ankstesniais tyrimais Lietuvoje (Povilonis et al., 2013), keli šių grupių genai – *bla<sub>OXA-24/40</sub>* ir *bla<sub>OXA-23</sub>* – jau buvo anksčiau nustatyti, tačiau *bla<sub>OXA</sub> subgrupė-3* genai tik šiame tyrime pirmą kartą nustatyti Lietuvoje. Kiti tyrimai (Héritier et al., 2005) parodė, kad fermentai, koduojami OXA-51 grupės genų, yra būdingi *Acinetobacter* spp. genties atstovams ir sutinkami beveik visuose daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčiuose genties kamienuose. Rezultatai koreliuoja su šiame tyrime gautais rezultatais, kur *bla<sub>OXA-51</sub>* genas buvo aptiktas 99 % visų tyrime dalyvavusių izoliatų. Taip pat panašūs rezultatai buvo gauti Lenkijos ligoninėse, kur *bla<sub>OXA-51</sub>* buvo aptiktas visuose tirtuose 125 *Acinetobacter* izoliatuose (Chmielarczyk et al., 2016).

Atskirai buvo įvertinti karbapenemų atsparumą koduojantys genai *Acinetobacter* spp. tiriamuosiuose izoliatuose, nes karbapenemai yra laikomi svarbiausiais antibiotikais gydant hospitalines *Acinetobacter* genties infekcijas. Karbapenemų atsparumą sukeliančios metalo-β-laktamazės (MBL) yra kritiškiausias antibiotikų atsparumo mechanizmas, nes MBL fermentai geba hidrolizuoti beveik visus β-laktaminius antibiotikus. Taip pat MBL koduojantys genai yra įterpti į integronus, kurie pakankamai paprastai gali būti perduodami kitoms bakterijoms (Noori et al., 2014). Šiame tyrime pirmą kartą Lietuvoje buvo nustatyti metalo-β-laktamazės koduojantys genai: *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>IMP-2</sub>*, *bla<sub>VIM-1</sub>* ir *bla<sub>NDM</sub>*. Dažniausi MBL koduojantys genai buvo *bla<sub>VIM-1</sub>* (76,3 % visų tirtų izoliatų) ir *bla<sub>IMP-1</sub>* (20,6 %). Gauti rezultatai sutampa su kitais atliktais tyrimais Irane (Amin et al., 2019), tačiau skiriasi nuo rezultatų, gautų Lenkijos ligoninėse, kur *bla<sub>VIM-1</sub>* geną turinčių *Acinetobacter* spp. kamienų buvo nustatyta labai nedaug (genas aptiktas tik dviejuose izoliatuose) ir nei vienas iš izoliatų neturėjo *bla<sub>IMP</sub>* genų (Chmielarczyk et al., 2016).

Tolimesnė karbapenemų atsparumą koduojančių genų analizė parodė MBL genų kitimą skirtingais tyrimo laikotarpiais. Rezultatai parodė, kad geno *bla<sub>IMP-1</sub>* aptikimo dažnis 2014-2016 metų laikotarpiu padidėjo, tuo tarpu 2016-2018 metais nustatytas sumažėjimas ( $p < 0,05$ ), bei geno *bla<sub>IMP-2</sub>* aptikimo dažnis statistiškai patikimai 2016-2018 metų laikotarpiu sumažėjo ( $p < 0,05$ ). Galimas šių pakitimų paaiškinimas galėtų būti *Acinetobacter* spp. efektyvus prisitaikymas prie besikeičiančių antibiotikų gydymo strategijų skirtingais metais, tačiau, tačiau norint tai patvirtinti, reikia papildomų tyrimų.

Be taikinio modifikavimo fermentų, daugiavaisčiame *Acinetobacter* spp. atsparume antibiotikams taip pat dalyvauja išorinės membranos eflukso pompų sistemos. Lyginant šį atsparumo mechanizmą su kitais, eflukso pompų sistema yra plačiai paplitusi ir yra mažai atranki substratui, kas labai prisideda prie skirtingų klasių antibiotikų pašalinimo iš bakterijų (Xu et al., 2019). Vienas svarbiausių atsparumo mechanizmų *Acinetobacter* genties bakterijose yra AdeABC eflukso pompa, kuri gali keisti savo ekspresiją iš indukcinės į konstitucinę hiperekspresiją. Perdėta ekspresija yra galima įvykus skirtingoms mutacijoms arba aktyvacijos dėka insercinių sekų pompos reguliaciniame gene (Marchand et al., 2004; Magnet et al., 2001). AdeABC operonas yra sudarytas iš dviejų baltymus koduojančių genų, vienas iš kurių atlieka sensoriaus funkciją (*adeS*), kitas atsakingas už pompos reguliavimą (*adeR*). Šio tyrimo metu *adeR* genas buvo nustatytas tik 2 % visų tirtų *Acinetobacter* spp. izoliatų. Buvo nustatytas statistiškai patikimas šio geno dažnio kitimas nuo 2014 iki 2016 metų (šio geno padaugėjo,  $p < 0,05$ ), tačiau nuo 2016 iki 2018 metų šio geno aptikimo dažnis sumažėjo ( $p < 0,05$ ). Palyginus gautus rezultatus su pasauliniais duomenimis, tyrimo rezultatai labai skyrėsi nuo JAV atlikto tyrimo (Hujer et al., 2006), kur 95 % visų tirtų *Acinetobacter* spp. izoliatų turėjo *adeR* reguliacinį geną. Toks rezultatų skirtumas parodo, kad nėra bendros pasaulinės tendencijos šio geno buvime klinikiniuose *Acinetobacter* spp. izoliatuose.

*Acinetobacter* spp. klinikinių izoliatų giminingumo ryšių įvertinimas yra labai svarbus norint nustatyti daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčių izoliatų plitimo kelią, numatyti epidemiologinę padėtį nacionaliniame ir pasauliniame lygmenyje, užtikrinti tinkamą infekcijos kontrolės politiką bei išvengti daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčių izoliatų plitimo tarp ligoninių (Romanin et al., 2019; Rossi et al., 2021). Rep-PGR genotipavimas pasižymi specifinių izoliatų grupavimu bei aukštu atrankumu genotipuojant *Acinetobacter* spp. izoliatas (Koczura et al., 2014), dėl šios priežasties darbe buvo parinkti BOX-PGR ir (GTG)<sub>5</sub>-PGR klinikinių *Acinetobacter* spp. izoliatų genotipavimui. Tyrimo metu buvo nustatyti 6 izoliatai, pasižymėję vienodu BOX-PGR genotipavimo profiliu (izoliatai priklausė ligoninėms I,

III, VII ir VIII), jų giminingumas buvo patvirtintas naudojant (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimo metodą, kuris parodė aukštą giminytės lygį tarp visų izoliatų. Atlikus BOX-PGR dendrogramos klasterių analizę buvo nustatyti dominuojantys klasteriai 6 ir 4, kurie apjungė 24 % ir 18,9 % visų *Acinetobacter* spp. izoliatų atitinkamai. Be to klasteriai 4, 1 ir 6 apjungė izoliatų iš aštuonių skirtingų ligoninių ir turėjo izoliatų iš visų trijų tyrimo metų. Klasteriuose 2 ir 5 buvo aptikti endeminiai profiliai, kurie atsikartojo metai iš metų. Tik vienam klasteriui (klasteris 3) priklausė izoliatai išskirti tik 2018 metais. Įvertinus klasterių priklausomybę nuo izoliatų išskyrimo ligoninės buvo nustatyta, kad didžiausiu skirtingų ligoninių skaičiumi klasteryje pasižymėjo klasteris 4, kurio profiliai buvo išskirti iš dešimt skirtingų ligoninių. Mažiausią skirtingų ligoninių skaičių turėjo izoliatai iš klasterio 3 (septynios ligoninės). Vertinant atliktą klasteriuose esančių izoliatų priklausomybės nuo ligoninių statistinę analizę, buvo nustatyta, kad nėra nei vienos statistiškai patikimos klasterių priklausomybės nuo izoliatų kilmės ( $p > 0,05$ ). Gauti tyrimo rezultatai papildė anksčiau atliktus tyrimus (Kirtikliene et al., 2019) ir įrodo, kad klinikiniai *Acinetobacter* spp. izoliatai dalyvauja inter-ir/arba intrahospitaliniame išplitime Lietuvos ligoninėse. Galimas tokių rezultatų paaiškinimas galėtų būti efektyvus susidariusių profilių prisitaikymas klasteriuose išplisti metai iš metų, galimai dėka netinkamai apmokyto medicinos personalo, užkrėstų medicininių įrankių bei pacientų migracijos iš vienos medicininės įstaigos į kitą (Cheon et al., 2016). Šis darbas papildė pasaulyje atliktus tyrimus, kurie parodo endeminių *Acinetobacter* spp. klasterių inter-ir/arba intrahospitalinį plitimą metai iš metų (Alsan ir Klompas, 2010; Da Silva et al., 2016; Romanin et al., 2019).

Yra nustatyta, kad MLVA metodas turi aukštą atkartojamumo lygį *A. baumannii* izoliatams (Johnson et al., 2016) ir dėl šios priežasties palengvėja genotipavimo rezultatų lyginimas su kitomis pasaulio laboratorijomis (Hu et al., 2013) bei tarptautinių duomenų bazių kurimas (Dijkshoorn et al., 2013). Palyginus šio darbo rezultatus su pasauliniais rezultatais (Hu et al., 2013; Najar-Peerayeh ir Karmostaji, 2019; Saffari et al., 2017;), buvo nustatyta, kad šio tyrimo metu visi aštuoni VNTR regionai buvo nustatyti tirtuose izoliatuose. Tuo tarpu kitų autorių tyrimuose tie patys tirti lokusai buvo arba nustatyti tik keliuose izoliatuose arba iš viso nenustatyti. Tai rodo tyrimo metu aptiktų tikrų VNTR lokusų aukštą polimorfizmą. Taip pat žemas tam tikrų lokusų nustatymo lygis leidžia daryti išvadą, kad tam tikrų VNTR lokusų pasiskirstymas izoliatuose tiesiogiai priklauso nuo geografinio izoliatų išskyrimo regiono (Saffari et al., 2017). Aukščiausiu lokusų polimorfizmu pasižymėjo VNTR markeriai Abaum\_0845 (10 skirtingų alelių,  $D = 0,77$ ) bei Abaum\_0826 (9 aleliai,  $D = 0,75$ ), be to 2014 ir 2016 metais išskirtuose

izoliatuose didžiausias polimorfizmas buvo nustatytas VNTR markeryje Abaum\_0826 ( $D = 0,81$  ir  $D = 0,80$  atitinkamai), tačiau 2016 metais tai buvo VNTR markeris Abaum\_2396 ( $D = 0,76$ ). Kaip buvo nustatyta ankstesniuose tyrimuose (Pourcel et al., 2011), gauti alelių pasiskirstymo rezultatai galėtų būti paaiškinti aukštu S-pasikartojimo variabilumu. Atlikus tolimesnę MLVA-8 dendrogramos analizę buvo nustatyta panaši genetinė tendencija, kaip ir BOX-PGR dendrogramoje, kurioje gauti profiliai paskirstė tirtus izoliatams tolygiai. Be to buvo nustatyta ir statistiškai įrodyta, kad tam tikri MLVA tipai (A34, A44 ir A121) buvo būdingi tik 2014 metams, MLVA tipas A49 buvo būdingas 2018 metais išskirtiems izoliatams, bei tipas A51 būdingas tik 2016 metais išskirtiems izoliatams. Priklausomybės konkrečiai ligoninei MLVA tipai neparodė ( $p > 0,05$ ). Galiausiai MLVA-8 papildė rep-PGR rezultatus, įrodant genetinių profilių judėjimą tarp skirtingų Lietuvos ligoninių skirtingais tyrimo metais.

Tolimesnis MST vertinimas leido nustatyti galimą *Acinetobacter* spp. daugiavaisčiu antibiotikų atsparumu pasižyminčių izoliatų plitimą ligoninėse ir galimą kilmę. Buvo nustatyta, kad visi MLVA tipai pagal giminingumą atsišakojo nuo vieno MLVA tipo (A70, VNTR alelių profilis: 6-7-9-3-24-17-12-14) ir galimai yra kilę nuo jo. Vėliau tipai atsišakojo į keturias giminingas šakas, kurios pasižymėjo skirtingu pasiskirstymu tarp ligoninių. Šie rezultatai dar kartą įrodo, kad *Acinetobacter* spp. atsparūs antibiotikams izoliatai dalyvauja inter- ir intrahospitaliniame infekcijos perdavime ir parodo, kad toks plitimas kelia grėsmę šių infekcijų gydymui ligoninėse.

Antroje šio darbo dalyje buvo nagrinėjama antra pagal svarbumą bei dažnumą hospitalines infekcijas Lietuvoje sukelianti bakterija *E. coli*, kurios atsparūs antibiotikams izoliatai buvo vertinami išplitimo Lietuvos ligoninėse ir skirtingų metų kontekste, buvo vertinamos įvairios genetinės determinantės, lemiančios galimą bakterijos plitimą ir prisitaikymą prie besikeičiančių ligoninių sąlygų ir infekcijų gydymo strategijų. Šiam tikslui pasiekti buvo pasitelkti atsparumo, virulentiškumo genų nustatymo, filogenetinių grupių nustatymo, rep-PGR ir MLVA genotipavimo metodai, kurie yra efektyvūs nustatant inter- ir intrahospitalinius infekcijos plitimo kelius.

Pirmiausia buvo nustatomos atsparumo genų determinantės tiriamuosiuose izoliatuose, norint įvertinti kokie atsparumo mechanizmai yra būdingi tiriamiesiems klinikiškai izoliatams, koks šių mechanizmų savitumas ir pritaikomumas pernešant daugiavaisčiais atsparumais pasižyminčius *E. coli* kamienus. Rezultatai parodė, kad dažniausias atsparumo genas (aptiktas visuose *E. coli* izoliatuose) buvo *tetA* genas, atsakingas už atsparumą tetraciklinams. Domínguez et al. (2002) nustatė, kad šis eflukso

mechanizmą koduojantis genas yra dažniausias tetraciklinų atsparumo mechanizmas *E. coli* izoliatuose, išskirtuose iš žmogaus klinikinės medžiagos. Buvo nustatyti dažniausi aminoglikozidų atsparumą koduojantys genai: *aadA* (aptiktas 92,6 % visų tirtų izoliatų), *strA* (98,4 %) ir *strB* (99,2 %). Visi trys genai yra atsakingi už aminoglikozidus modifikuojančių fermentų, kurie sukelia antibiotiko deaktyvavimą jį modifikuodami, sintezę (*strA*: adeniltransferazę ir fosfotransferazę; *strB*: fosfotransferazę), (Ramirez ir Tolmasky, 2010).

Buvo nustatyti atsparumą  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams koduojantys genai. Rezultatai parodė, kad dažniausias šios grupės genas buvo *bla<sub>TEM</sub>* (nustatytas 98,8 % visų izoliatų). Lyginant šiuos rezultatus su anksčiau atliktais darbais (Kirtikliene et al., 2019), gauti rezultatai skiriasi nuo anksčiau gautų rezultatų, kur *bla<sub>TEM</sub>* genas buvo aptiktas tik 33,9 % tirtų izoliatų. Šis rezultatų skirtumas galėtų būti paaiškintas tuo, kad *bla<sub>TEM</sub>* atsparumo genas su metais vis labiau įsitvirtino klinikiškuose *E. coli* izoliatuose dėl ligozinėse taikomų skirtingų antibiotikų vartojimo programų. Įvertinus *bla<sub>CTX-M</sub>* grupės genus buvo nustatyta, kad dažniausias šios grupės genas tarp tirtų *E. coli* izoliatų buvo *bla<sub>CTX-M-9</sub>* genas (nustatytas 90,6 % visų izoliatų). Šis rezultatas skiriasi nuo anksčiau atliktų tyrimų Lietuvoje ir Šiaurės Europos šalyse (Sepp et al., 2019), kur *bla<sub>CTX-M-9</sub>* genas iš viso nebuvo aptiktas klinikiškuose izoliatuose iš Lietuvos, be to, jų tyrime dažniausias *bla<sub>CTX-M</sub>* grupės genas buvo *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. Toks rezultatų nesutapimas galėjo atsirasti dėl to, kad *bla<sub>CTX-M-9</sub>* genas Lietuvoje atsirado tarpe tarp 2012 (kai Sepp et al. surinko savo tyrime naudota tyriamąją medžiagą) ir 2014 metų (kai šioje disertacijoje pirmą kartą šį geną aptikome klinikiškuose *E. coli* izoliatuose). Tyrime pavyko aptikti du genus, koduojančius metalo- $\beta$ -laktamazių gamybą. Tai *bla<sub>NDM</sub>* (98,4 % visų tirtų izoliatų), kuris jau buvo anksčiau aptiktas klinikiškuose mėginiuose Lietuvoje (Kirtikliene et al., 2019) bei *bla<sub>AIM</sub>* (97,3 % izoliatų), kuris šiame tyrime yra nustatytas pirmą kartą Lietuvoje.

Tolimesnė izoliatų, išskirtų skirtingais tyrimo metais, analizė parodė, kad atsparumo genų pasiskirstymas ir kombinacijos skyrėsi penkerių metų periode, tarp 2014 ir 2018 metų. Rezultatai ir statistinis duomenų palyginimas parodė, kad trys genai (*bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *tetC* ir *mcr-1*) buvo dažnesni 2014 metais ( $p < 0,05$ ), tačiau atsparumo genai *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* ir *aac3(IV)* buvo daugiau būdingi izoliatams, išskirtiems 2018 metais ( $p < 0,05$ ). Atskirų izoliatų analizė parodė, kad daugiausiai atsparumo determinančių (19 atsparumo genų) turėjo vienas izoliatas, išskirtas 2014 metais (1598), ir šeši izoliatai išskirti 2018 metais. Be to buvo aptikta dvylika izoliatų, kurie turėjo mažiausią atsparumo determinančių skaičių (12 atsparumo genų), iš kurių septyni buvo izoliuoti 2014 metais bei penki izoliatai – 2018 metais. Šie rezultatai leidžia daryti

išvadą, kad atsparumo genų kaita skirtingais metais vyksta ir kad ji prisideda prie daugiavaisčių atsparumu pasižyminčių *E. coli* kamienų įvairovės didėjimo.

Norint įvertinti atsparumo genų kilmę, tyrimo metu buvo nustatyta atsparumo genų priklausomybė nuo lignoninių, kuriose buvo išskirti tiriamieji izoliatai. Rezultatai parodė, kad atsparumo genų *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *tetC* ir *bla<sub>SPM</sub>* buvimas tiesiogiai priklausė nuo lignoninės, kurioje izoliatai buvo išskirti ( $p < 0,05$ ): *bla<sub>CTX-M-1</sub>* genas buvo daugiausiai būdingas lignoninėms I, II ir VII, *tetC* genas – lignoninei II ir *bla<sub>SPM</sub>* genas lignoninėms – X ir XII. Atskirų lignoninių atsparumo genų duomenų analizė parodė, kad lignoninės II atsparumo genų *bla<sub>VIM</sub>* ir *aac3(IV)* buvimas priklausė nuo izoliatų išskyrimo metų ( $p < 0,05$ ): *bla<sub>VIM</sub>* ir *aac3(IV)* genai daugiausiai būdingi šios lignoninės 2018 metų izoliatams. Tokia pat priklausomybė nuo izoliatų išskyrimo metų buvo nustatyta lignoninėje IV, atsparumo genui *tetC* (būdingas šios lignoninės 2014 metų izoliatams), lignoninėje VI – genui *bla<sub>KPC</sub>* (būdingas 2018 metų izoliatams) ir lignoninėje X – atsparumo genui *bla<sub>CTX-M-1</sub>* (būdingas 2014 metų izoliatams).

Toliau buvo vertinami skirtingi *E. coli* klinikinių izoliatų virulentiškumo mechanizmai, lemiantys šios bakterijos efektyvų plitimą ir prisitaikymą prie šeimininko skirtingų apsaugos mechanizmų, specifinės organų fiziologijos ir skirtingų galimų maistinių medžiagų šeimininko aplinkoje. Vienas iš šių virulentiškumo mechanizmų apėmė *E. coli* kamienų gebėjimą išgyventi kraujotakoje ir išvengti komplemento sistemos atpažinimo įgaunant atsparumą serumui (Mícenková et al., 2017). Serumui atsparumo išvystyme dalyvauja keletas faktorių. Darbe buvo nustatyta, kad 81,3 % tirtų izoliatų turėjo *traT* geną, kas papildo panašius, kitų autorių gautus duomenis (Bozcal et al., 2018; Koga et al., 2014; Miajlovic et al., 2016). Vertinant kito serumo atsparumo faktorių – *E. coli* formuojamą kapsulę – buvo nustatyta, kad beveik pusė tirtų izoliatų (49,2 %) ekspresavo virulentiškumo geną *kpsMTII*, kuris koduoja K1 ir K5 tipo kapsulių baltymų formavimą. Gauti rezultatai patvirtina kitų pasaulio laboratorijų darbus, kur tiriant kraujo infekcijas taip pat buvo nustatyta *kpsMTII* geno ekspresija (Daga et al., 2019).

Kitas virulentiškumo faktorius – sideroforai – padeda patogeninėms bakterijoms pasisavinti surištą geležį iš šeimininko aplinkoje susidariusių molekulių kompleksų. Sideroforų buvimas yra glaudžiai siejamas su patogeninių *E. coli* kamienų gebėjimu sukelti kraujo infekcijas (Bozcal et al., 2018; Koga et al., 2014). Šiame tyrime sideroforas jersiniabaktinas (koduojamas *fyuA* geno) buvo nustatytas net 91,8 % tirtų izoliatų. *fyuA* geno koduojamas jersiniabaktino receptorius padeda *E. coli* pasisavinti geležies jonus, esančius žmogaus organizme (Ananias ir Yano, 2008) ir bakterijos

įsitvirtinimui iš šlapimo takų kraujotakoje (Johnson ir Stell, 2000). Antras dažniausiai nustatytas sideroforas tiriant iš Lietuvos lignoninių mėginių išskirtus *E. coli* izoliatų buvo salmocherinas (koduojamas *iroN* geno), kuris buvo aptiktas 62,5 % tirtų izoliatų, bei labiausiai prisideda prie infekcijos plitimo ir invazijos iš šlapimo takų sistemos į kraujotakos sistemą (Johnson ir Stell, 2000).

Buvo įvertinti virulentiškumo genai, koduojantys skirtingus adhezinus, padedančius patogeninėms bakterijoms prisitvirtinti prie šeimininko ląstelių. Tyrimo metu buvo ieškoma šių adhezinų: 1 tipo fimbrija (*fimH*), S fimbrija (*sfaD/E*), P fimbrija (*papC*) ir Dr jungiantis adhezinas (*afaB/C*). Dažniausias šios grupės genas buvo *fimH* (nustatytas 98,4 % tirtų *E. coli* izoliatų), kuris yra kritinis virulentiškumo faktorius uropatogeninių *E. coli* izoliatų prisijungimui prie šlapimo takų epitelio (Dale et al., 2015). Dėka šio faktoriaus infekcija efektyviai pereina iš šlapimo takų infekcijos į bakteremiją (Laupland, 2013).

Paskutinė virulentiškumo faktorių grupė apjungė genus, atsakingus už patogenų toksinų ir hemolizinių raišką. Šiame tyrime buvo tirti šie toksinus koduojantys genai: *sat*, *ibeA*, *cvaC*, *hlyA* ir *cnf1*. Dažniausias virulentiškumo genas tarp tirtų *E. coli* izoliatų buvo *sat* (aptiktas 53,3 % visų izoliatų), koduojantis sekretuojamą autotransporterio toksiną. Šis toksinas turi proteolizinių savybių ir skatina šlapimo takų epitelio vakuolizaciją (Sarowska et al., 2019), dėl ko pažeidžiamos epitelio ląstelės ir bakterijos gali infekuoti pažeistas vietas. Antras dažniausias aptiktas toksinus koduojantis genas tarp tirtų izoliatų buvo *hlyA* (40,3 % visų izoliatų), koduojantis  $\alpha$ -hemolizina, kuris yra šeimininko ląstelėse poras formuojantis bakterinis egzotoksinas, prisidedantis prie bakterijos virulentiškumo baktereminės infekcijos plitimo metu (Sonnen ir Henneke, 2013).

Vertinant virulentiškumo determinančių kitimą penkerių metų laikotarpyje, rezultatai parodė, kad virulentiškumo determinantės kito tarp 2014 ir 2018 metų: trijų virulentiškumo genų dažnumas nuo 2014 metų padidėjo (*hlyA*, *cnf1* ir *sfaD/E*,  $p < 0,05$ ), bei keturių genų dažnumas sumažėjo (*cvaC*, *ibeA*, *papC* ir *afaB/C*,  $p < 0,05$ ). Buvo įvertinta virulentiškumo genų aptikimo priklausomybė nuo lignoninės, iš kurios izoliatai buvo išskirti. Rezultatai parodė, kad nei viena virulentiškumo determinantė nėra tiesiogiai priklausoma nuo lignoninės ( $p > 0,05$ ). Buvo nustatyta tam tikrų virulentiškumo genų priklausomybė nuo izoliatų išskyrimo lignoninėse skirtingais tyrimo metais. Lignoninėje I *papC* genas buvo labiausiai būdingas 2014 metų izoliatams, lignoninėje VIII virulentiškumo genai *cvaC* ir *afaB/C* taip pat buvo daugiau būdingi 2014 metų izoliatams. Lignoninėje XI virulentiškumo genas *hlyA* buvo daugiausiai būdingas izoliatams, išskirtiems



2018 metais. Šie gauti rezultatai parodo virulentiškumo genų kaitą metai iš metų, tačiau neparodo virulentiškumo genų atsiradimo arba išplitimo priklausomybės nuo skirtingų Lietuvos ligoninių.

Toliau sekė *E. coli* filogenetinių grupių nustatymas, kuris yra svarbus, norint įvertinti patogeninės bakterijos pavojingumo laipsnį bei įvertinti epidemiologinę situaciją šalies ligoninėse. Tyrimo metu buvo nustatyta, kad dažniausia filogenetinė grupė tarp visų tirtų izoliatų Lietuvos ligoninėse yra filogenetinė grupė A, kuriai priklausė net 79,3 % visų tirtų izoliatų. Tačiau lyginant šiuos rezultatus su kitų šalių tyrimais, randame skirtumą, nes kitų tyrimų duomenimis dažniausia filogenetinė grupė pasaulyje yra B2 (Koga et al., 2014; Micenková et al., 2017). Šie rezultatai sutampa su anksčiau Lietuvoje atliktais tyrimais (Giedraitienė et al., 2017; Prakapaite et al., 2019; Čiginskienė, 2020), kur buvo tirti klinikiniai *E. coli* izoliatai. Tačiau tyrimo metu filogenetinė grupė B2 buvo nustatyta tik 15,6 % visų izoliatų, kurių dauguma buvo surinkta 2018 metais (10 izoliatų 2014 ir 30 izoliatų 2018 metais). Toks šios disertacijos rezultatų skirtumas nuo kitų anksčiau atliktų tyrimų galėtų būti paaiškintas tuo, kad šiame tyrime buvo paimti klinikiniai izoliatai iš didesnio skaičiaus ligoninių, kas praplečia gautus rezultatus. Panašus tyrimui filogenetinis profilis buvo nustatytas Rumunijoje, kur filogenetinė grupė A dominavo tarp tiriamųjų klinikinį izoliatų ir grupė B2 buvo mažiau paplitusi (Usein et al., 2016). Remiantis Micenkova et al (2017) duomenimis, filogenetinės grupės A izoliatai yra griežti komensalai ir įprastai yra randami žarnyno mikrobiotoje. Tai leidžia manyti, kad tyrimo metu iširti izoliatai, priklausantys filogenetinei grupei A, taip pat galėtų būti kilę iš žarnyno mikrobiotos. Kitame tyrime (Fratamico et al., 2016) buvo nustatyta, kad filogenetinių grupių B2 ir D klinikiniai izoliatai pasižymi aukštu virulentiškumo laipsniu žmogui, kas leidžia šių grupių patogeninėms bakterijoms infekuoti tiek sveikus, tiek imunosupresuotus pacientus. Sena Clermont et al (2000) filogenetinių grupių klasifikacija buvo naudota Fratamico et al. tyrime (2016), kur filogenetinė grupė D dar nebuvo išskirstyta į tris grupes: D, E ir F. Šiame darbe buvo naudota nauja filogenetinių grupių klasifikacija (Clermont et al., 2013) ir nei vienas iš izoliatų filogenetinei grupei D nepriskirtas, tačiau 4,3 % tirtų izoliatų buvo priskirti filogenetinei grupei F.

Tyrimo metu buvo įvertinta filogenetinių grupių priklausomybė nuo izoliatų kilmės. Statistinis duomenų vertinimas parodė, kad nėra tiesioginės konkrečių filogenetinių grupių priklausomybės nuo ligoninės ( $p > 0,05$ ) ir tai parodo, kad tirtų izoliatų filogenetinių grupių pasiskirstymas nepriklausė nuo konkrečios ligoninės. Buvo palygintas filogenetinių grupių pasiskirstymas priklausomai nuo izoliatų išskyrimo metų. Buvo nustatyta, kad filogenetinės

grupės B2 ir F buvo labiausiai būdingos izoliatams, išskirtiems 2018 metais. Filogenetinė grupė B1 buvo nustatyta tik 2014 metų izoliatuose. Atlikus papildomai šių duomenų statistinę analizę paaiškėjo, kad tik vienos, filogenetinės grupės B1, kitimas nuo 2014 iki 2018 buvo statistiškai patikimas ( $p = 0,049$ ), kitų filogenetinių grupių kitimas buvo statistiškai nereikšmingas.

Rep-PGR genotipavimas yra laikomas patikimu metodu genotipuojant *E. coli* izoliatams bei tiriant izoliatų paplitimą ir infekcijos atsiradimo kilmę (Mohapatra et al., 2007). Atlikus BOX-PGR genotipavimą tiriamiesiems *E. coli* izoliatams buvo nustatyta keturiolika giminingumo klasterių ir 235 BOX-PGR genotipiniai profiliai. Buvo nustatytas dominuojantis klasteris 9, kuris apjungė 21,9 % tirtų *E. coli* izoliatų. Visų klasterių analizė parodė, kad tarpusavyje genetiškai jie yra labai artimi ir, be to, nebuvo aptikta statistiškai patikimos tam tikrų klasterių tiesioginės priklausomybės nei nuo metų, kada izoliatai buvo surinkti, nei nuo ligoninių, iš kurių izoliatai buvo išskirti. Buvo nustatyta, kad beveik visi klasteriai (išskyrus Klasterius 3, 4 ir 5) turėjo izoliatų, išskirtų tiek 2014, tiek 2018 metais. Be to Klasteriai 3 ir 5 turėjo izoliatų, išskirtų tik 2018 metais, Klasteris 4 – izoliatų išskirtų tik 2014 metais. Visi klasteriai pasižymėjo savitomis atsparumo ir virulentiškumo genų kombinacijomis. Galimas tokių rezultatų paaiškinimas galėtų būti sėkmingas bakterijos adaptavimasis metai iš metų prie besikeičiančių infekcijos gydymo strategijų bei dėka pacientų migracijos iš vienos gydymo įstaigos į kitą (Gurieva et al., 2017). Gauti rezultatai papildė anksčiau atliktus tyrimus su *E. coli* izoliatais (Kirtikliene et al., 2019) bei įrodo, kad šios bakterijos plitimas vyksta tiek ligoninės viduje, tiek tarp skirtingų Lietuvos ligoninių. Pasaulio duomenimis atsparūs antibiotikams *E. coli* kamienai taip pat metai iš metų vis labiau plinta tarp ligoninių (Voor In't Holt et al., 2016; Baudry et al., 2008). Septyniolikai BOX-PGR profilių, kurie apjungė du arba tris izoliatams kiekvienas, buvo papildomai atliktas (GTG)<sub>5</sub>-PGR genotipavimas, kuris parodė, kad visi parinkti izoliatai buvo genetiškai labai artimi, išskyrus vieną izoliatą (2137), išskirtą ligoninėje XII. Šių septyniolikos genotipinių profilių virulentiškumo genų analizė parodė, kad virulentiškumo genai *fimH* ir *fyuA* buvo būdingi beveik visiems šios grupės izoliatams. Be to, visuose šiose izoliatuose buvo rastas atsparumo genų derinys: *bla<sub>AIM</sub>-fosA-sul2-strA-tetA*, kuris apjungė skirtingus atsparumo mechanizmus.

Kitas genotipavimo metodas MLVA yra laikomas efektyviu įrankiu tiriant bakterijas, kuriose greitai ir atsitiktinai vyksta genomines mutacijos (van Belkum et al., 1998). Yra keli MLVA metodai, patvirtinti kaip efektyvūs nustatant MLVA tipus (Keys et al., 2005; Lindstedt, 2005; Noller et al., 2003). Šiame tyrime naudota viena iš metodikų, kuri leidžia nustatyti ne tik ilgą, bet ir trumpą pasikartojančią seką. MLVA profilių analizė leido visus tirtus *E.*

*coli* izoliatus suskirstyti į keturiasdešimt septynis MLVA tipus, remiantis susidariusiais skirtingais VNTR profiliais. Dažniausias MLVA tipas tarp izoliatų buvo A47, kuriam buvo priskirti 131 *E. coli* izoliatai (51,2 % visų tirtų izoliatų). Lyginant šiuos duomenis su BOX-PGR rezultatais, galime pamatyti didelį susidariusį skirtumą tarp BOX-PGR metode nustatytų profilių skaičiaus (235 profiliai) ir MLVA profilių skaičiaus (47 profiliai). Toks skirtumas galėtų būti paaiškintas skirtinga metodų skiriamąja geba (Rivas et al., 2015) bei parodo, kad BOX-PGR metodas yra efektyvesnis tyriant parinktus *E. coli* izoliatus. Buvo nustatyta kelių MLVA tipų priklausomybė nuo izoliavimo metų. Rezultatai parodė, kad MLVA tipas A32 buvo labiausiai būdingas 2014 metais išskirtiems izoliatams, kaip ir tipai A40 ir A45. Buvo nustatyta, kad tipas A47 buvo labiausiai būdingas izoliatams, išskirtiems 2018 metais. Taip pat buvo nustatytas MLVA tipų pasiskirstymas tarp skirtingų ligoninių bei įvertinta susidariusių tipų priklausomybė nuo konkrečios ligoninės. Statistiškai patikimi rezultatai buvo aptikti penkiuose MLVA tipuose, vertinant jų priklausomybę nuo tam tikros ligoninės. Jiems priklauso tipas A23, kuris statistiškai patikimai buvo būdingas ligoninei III, tipai A25 ir A26, kurie buvo būdingi ligoninei XII, taip pat tipas A35, statistikai būdingas ligoninei III bei tipas A45, kuris buvo būdingas ligoninei VII. Šie rezultatai parodo, kad tam tikriems MLVA profilams susiformuoti buvo svarbūs metai, kada izoliatai buvo aptikti bei ligoninė, iš kurios jie buvo kilę, kas daro prielaidą, kad skirtingų ligoninių gydymo ir prevencijos strategijos geba paskatinti genetinę *E. coli* klinikinių kamienų kaitą.

Norint įvertinti susidariusių MLVA tipų charakteristikas bei galimą jų kilmę, buvo papildomai įvertinta VNTR alelių genetinė įvairovė, priklausomai nuo *E. coli* izoliatų išskyrimo metų bei skirtingų ligoninių. Rezultatai parodė, kad didžiausia genetinė įvairovė bei didžiausiu lokusų polimorfizmu pasižymėjo VNTR lokusai VR4 ir VR7 (įvairovės indekso reikšmės 0,33 ir 0,3 atitinkamai), mažiausiu lokusų polimorfizmu pasižymėjo VNTR lokusai VR1, VR2, VR3 ir VR6, kurių polimorfizmas nesiekė 0,1. Bendrai vertinant polimorfizmo įvairovės rezultatus galima teigti, kad visi VNTR lokusai nepasižymėjimo dideliu polimorfizmu, nes gautos įvairovės indekso reikšmės yra labai mažos (nuo 0 iki 0,33). Vėliau vertinant alelių įvairovę skirtingais izoliavimo metais, didžiausiu polimorfizmu 2014 metais pasižymėjo VNTR lokusas VR5 ( $D = 0,43$ ), 2018 metais – lokusas VR7 ( $D = 0,32$ ), tačiau statistiškai patikimos priklausomybės nuo izoliatų išskyrimo metų nei vienas VNTR lokusas neparodė. Norint įvertinti VNTR lokusų pasiskirstymą buvo įvertinta genetinė įvairovė skirtinguose lokusuose ir jų priklausomybė nuo ligoninių, iš kurių *E. coli* izoliatai buvo išskirti. Rezultatai parodė, kad didžiausiu alelių polimorfizmu skirtingose ligoninėse pasižymėjo

VNTR lokusai VR4 (ligoninėse I, III, VI, XI ir XII), VR5 (ligoninėje VII) ir VR7 (ligoninėse II, IV, V, VIII, IX ir X). Šių polimorfinių lokusų reikšmės ligoninėse variavo tarp 0,27 iki 0,61, tačiau tiesioginės VNTR lokusų priklausomybės nuo izoliatų kilmės taip pat nebuvo nustatyta.

Vėliau, susidariusių *E. coli* MLVA tipų ir VNTR lokusų rezultatų pagrindu, buvo sukonstruotas MST, kuris leido įvertinti potencialią visų susidariusių MLVA tipų galimą perdavimą tarp skirtingų ligoninių. Rezultatai parodė, kad visi MLVA tipai atsišakojo iš vieno tipo A32 (VNTR profilis: 9-0-6-10-5-0-0-0), kurio izoliatai buvo išskirti iš visų ligoninių, išskyrus ligoninę IX. Toliau visi tipai atsiskyrė į dvi giminingas šakas, kurių didesnė šaka pasižymėjo didžiausiu izoliatų kilmės variabilumu (turėjo izoliatų, išskirtų iš visų tyrime dalyvavusių ligoninių), mažesnės šakos MLVA tipai turėjo daugiausiai izoliatų iš ligoninių II ir VIII. Gauti rezultatai parodo, kad visi MLVA tipai turi bendrą kilmę, kurioje yra išskiriami VNTR lokusai VR1, VR3, VR4 ir VR5, kiti lokusai skirtingose Lietuvos ligoninėse atsiranda vėliau, kas parodo didelį visų tirtų *E. coli* izoliatų santykį ir priklausomybę genetinėje kaitoje.

Apibendrinant galima teigti, kad *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* tirti izoliatai pasižymėjo savita atsparumo ir virulentiškumo determinančių įvairove bei savita genetinė kilmė, kurią apibrėžė izoliatų išskyrimo metai bei konkrečios ligoninės. Dėka įvairių genetinių elementų, tokių kaip plazmidės, transpozonai, bei kitų faktorių, tokių kaip genų perdavimas ligoninės viduje ir tarp skirtingų ligoninių. Buvo nustatyta, kad abi tirtos bakterijos išvystė skirtingas atsparumo antibiotikams strategijas priklausomai nuo ligoninių gydymo strategijų bei potencialaus pacientų judėjimo iš vienos ligoninės į kitą. Tai leidžia panaudoti gautus rezultatus tobulinant epidemiologinį gydymą Lietuvos ligoninėse bei nuspėti galimus tolimesnius *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* atsparumo antibiotikams ir virulentiškumo vystymosi mechanizmus.

## IŠVADOS

1. Klinikiniuose *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* izoliatuose atsparumo antibiotikams determinantės statistiškai reikšmingai kito laike (2014-2018 metų laikotarpyje) ir izoliatų išskyrimo vietose.
2. *Acinetobacter* spp. dažniausias atsparumo antibiotikams genų derinys buvo *bla<sub>OXAsubgrupė-3</sub>*·*bla<sub>OXAsubgrupė-1</sub>*·*bla<sub>OXA-51</sub>*·*bla<sub>OXAsubgrupė-2</sub>*·*bla<sub>OXAsubgrupė-4</sub>*·*bla<sub>VIM-1</sub>*·*bla<sub>TEM-92</sub>*, kuris buvo nustatytas 45,9 % tirtų izoliatų ir yra atsakingas už atsparumą β-laktaminams antibiotikams.
3. *E. coli* dažniausia atsparumo antibiotikams genų kombinacija buvo *tetA*·*strB*·*sul2*·*bla<sub>TEM</sub>*·*bla<sub>NDM</sub>*·*strA*·*fosA*·*bla<sub>AIM</sub>*·*sul3*·*aadA*·*bla<sub>CTX-M-9</sub>*, kuri buvo būdinga 67,2 % visų tirtų izoliatų, bei kodavo atsparumą tetraciklinams (genas *tetA*), aminoglikozidams (genai *strB*, *strA* ir *aadA*), fosfomicinui (genas *fosA*), sulfonamidams (*sul2* ir *sul3*) ir β-laktaminams antibiotikams (genai *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>AIM</sub>* ir *bla<sub>CTX-M-9</sub>*), o dažniausias virulentiškumo genų derinys buvo *fyuA*·*fimH*·*iroN*, kuris buvo nustatytas 58,6 % visų tirtų izoliatų.
4. Tirtuose *E. coli* izoliatuose virulentiškumo determinančių kaita patikimai koreliavo su izoliatų išskyrimo metais, tačiau patikimos priklausomybės nuo izoliatų išskyrimo vietų nenustatyta.
5. Filogenetinių grupių analizė parodė, kad daugiausiai (79,3 %) *E. coli* izoliatų (filogenetinė grupė A) pasižymėjo mažu virulentiškumo, tačiau kitų filogenetinių grupių izoliatai (B1, B2 ir F) (kurie sudarė 0,8 %, 15,6 %, ir 4,3 %) pasižymėjo aukštu virulentiškumo laipsniu.
6. Rep-PGR genotipavimo profiliai parodė tirtų izoliatų giminingumą bei pasiskirstymą į genetiškai artimus genetinius klasterius: *Acinetobacter* spp. izoliatai pasiskirstė į 191 genetinį profilį bei 6 giminingumo klasterius, *E. coli* izoliatai pasiskirstė į 235 genetinius profilius ir 14 giminingumo klasterių.
7. MLVA profilių variabilumas keitėsi priklausomai nuo izoliatų išskyrimo metų: *Acinetobacter* spp. izoliatuose didžiausiu polimorfizmu 2014 metais pasižymėjo VNTR markeris Abaum\_0826, 2016 metais – Abaum\_2396, bei 2018 metais – markeris Abaum\_2396; *E. coli* izoliatuose – 2014 metais VNTR lokusas VR5 ir 2018 metais – lokusas VR7. Be to nustatyta, kad *E. coli* izoliatai didžiausiu alelių polimorfizmu skirtingose ligoninėse pasižymėjo VNTR lokusai VR4 (ligoninėse I, III, VI, XI ir XII), VR5 (ligoninėje VII) ir VR7 (ligoninėse II, IV, V, VIII, IX ir X); *Acinetobacter* spp. izoliatuose – VNTR markeriai Abaum\_2396 (ligoninėse IV, VII, VIII ir XIII), Abaum\_3468 (ligoninėje V),

Abaum\_0826 (ligoninėse I, II ir VI) bei markeris Abaum\_0845 (ligoninėse I, III, V, VI, VIII, X ir XI).

8. Nustatyta MLVA profilių kaitos priklausomybė nuo izoliatų gimingumo ryšių. Visi tirti *Acinetobacter* spp. MLVA tipai atsišakojo nuo vieno tipo A70 bei VNTR alelių profilio: 6-7-9-3-24-17-12-14, o *E. coli* MLVA tipai atsišakojo nuo tipo A32 bei VNTR profilio: 9-0-6-10-5-0-0-0.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adya, K. A., & Inamadar, A. C. (2015). Gram negative bacterial infections. In *Comprehensive Approach to Infections in Dermatology* (pp. 52-82). *Jaypee Brothers Medical Publishers*, New Delhi.
2. Ahmad, I., Nygren, E., Khalid, F., Myint, S. L., & Uhlin, B. E. (2020). A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
3. Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics*, 9(3), 119.
4. Ajiboye, T. O., Skiebe, E., & Wilharm, G. (2018). Contributions of ferric uptake regulator Fur to the sensitivity and oxidative response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. *Microbial Pathogenesis*, 119, 35-41.
5. Alarcon, I., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. (2009). The role of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* exit from and translocation of corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(5), 2237-2244.
6. Aliakbarzade, K., Farajnia, S., Nik, A. K., Zarei, F., & Tanomand, A. (2014). Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(10).
7. Alyamani, E. J., Khiyami, A. M., Booq, R. Y., Majrashi, M. A., Bahwerth, F. S., & Rechkina, E. (2017). The occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 1-13.
8. Alsan, M., & Klompas, M. (2010). *Acinetobacter baumannii*: an emerging and important pathogen. *Journal of Clinical Outcomes Management: JCOM*, 17(8), 363.
9. Amin, M., Navidifar, T., Shooshtari, F. S., & Goodarzi, H. (2019). Association of the genes encoding metallo- $\beta$ -lactamase with the presence of integrons among multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1171.
10. Ananias, M., & Yano, T. (2008). Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(10), 877-883.

11. Andreu, A., Stapleton, A. E., Fennell, C., Lockman, H. A., Xercavins, M., Fernandez, F., & Stamm, W. E. (1997). Urovirulence determinants in *Escherichia coli* strains causing prostatitis. *Journal of Infectious Diseases*, 176(2), 464-469.
12. Antunes, L., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292-301.
13. Baudry, P. J., Nichol, K., DeCorby, M., Mataseje, L., Mulvey, M. R., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. (2008). Comparison of antimicrobial resistance profiles among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and acquired AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canadian intensive care units. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1846-1849.
14. Benmahmod, A. B., Said, H. S., & Ibrahim, R. H. (2019). Prevalence and mechanisms of carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Egypt. *Microbial Drug Resistance*, 25(4), 480-488.
15. Bentancor, L. V., Camacho-Peiro, A., Bozkurt-Guzel, C., Pier, G. B., & Maira-Litrán, T. (2012). Identification of Ata, a multifunctional trimeric autotransporter of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 194(15), 3950-3960.
16. Benzerara, Y., Gallah, S., Hommeril, B., Genel, N., Decré, D., Rottman, M., & Arlet, G. (2017). Emergence of plasmid-mediated fosfomycin-resistance genes among *Escherichia coli* isolates, France. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 1564.
17. Bergogne-Berezin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148-165.
18. Bergogne-Berezin, E., Joly-Guillou, M. L., & Towner, K. J. (2020). *Acinetobacter*: microbiology, epidemiology, infections, management. *CRC press*.
19. Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*, 2012.
20. Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G. J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K. & Süssmuth, R. D. (2004). The structure of salmochelins: C-glycosylated enterobactins of *Salmonella enterica* §. *Biometals*, 17(4), 471-481.
21. Blair, J., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51.



22. Blake, D. P., Hillman, K., Fenlon, D. R., & Low, J. C. (2003). Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 428-436.
23. Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C. L., Reid-Smith, R., Heather Lim, N. J., Nicholson, V., McEwen, S., Friendship, R. & Archambault, M. (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6753-6761.
24. Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2005). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 373-381.
25. Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1-14.
26. Bozcal, E., Eldem, V., Aydemir, S., & Skurnik, M. (2018). The relationship between phylogenetic classification, virulence and antibiotic resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in İzmir province, Turkey. *PeerJ*, 6, e5470.
27. Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933-951.
28. Brandt, S., Shafikhani, S., Balachandran, P., Jin, S., Hartig, R., König, W., Engel, J. & Backert, S. (2007). Use of a novel coinfection system reveals a role for Rac1, H-Ras, and CrkII phosphorylation in *Helicobacter pylori*-induced host cell actin cytoskeletal rearrangements. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(2), 190-205.
29. Brede, C. M., & Shoskes, D. A. (2011). The etiology and management of acute prostatitis. *Nature Reviews Urology*, 8(4), 207-212.
30. Brotfain, E., Borer, A., Koyfman, L., Saidel-Odes, L., Frenkel, A., Gruenbaum, S. E., Rosenzweig V., Zlotnik A., & Klein, M. (2017). Multidrug resistance *Acinetobacter bacteremia* secondary to ventilator-associated pneumonia: risk factors and outcome. *Journal of Intensive Care Medicine*, 32(9), 528-534.
31. Brown, D. (2015). Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(12), 821-832.
32. Brown, P. C., Borowska, E., Schwartz, T., & Horn, H. (2019). Impact of the particulate matter from wastewater discharge on the abundance of antibiotic resistance genes and facultative pathogenic bacteria in

- downstream river sediments. *Science of the total Environment*, 649, 1171-1178.
33. Buckles, E. L., Wang, X., Lane, M. C., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Rasko, D. A., Mobley, H., & Donnenberg, M. S. (2009). Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(11), 1689-1697.
  34. Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology*, 66, 493-520.
  35. Bush, K. (2015). A resurgence of  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(5), 483-493.
  36. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976.
  37. Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S., & Snyder, M. (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000834.
  38. Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(5), 477-485.
  39. Carbonetti, N. H., & Williams, P. H. (1984). A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30. *Infection and Immunity*, 46(1), 7-12.
  40. Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., ... & Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 56-66.
  41. Caza, M., Lépine, F., & Dozois, C. M. (2011). Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 80(1), 266-282.
  42. Chen, Y., Delmas, J., Sirot, J., Shoichet, B., & Bonnet, R. (2005). Atomic resolution structures of CTX-M  $\beta$ -lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *Journal of Molecular Biology*, 348(2), 349-362.
  43. Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y., & Yu, Y. (2011). Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1255-1259.

44. Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2012). Changing bacteriology of abdominal and surgical sepsis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(5), 590-595.
45. Cheon, S., Kim, M. J., Yun, S. J., Moon, J. Y., & Kim, Y. S. (2016). Controlling endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units using antimicrobial stewardship and infection control. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 31(2), 367.
46. Cheung, T. K. M., Chu, Y. W., Chu, M. Y., Ma, C. H., Yung, R. W. H., & Kam, K. M. (2005). Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica serotype Enteritidis* in Hong Kong. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 586-589.
47. Chmielarczyk, A., Pobiega, M., Wójkowska-Mach, J., Romaniszyn, D., Adamski, P., Heczko, P. B., & Bulanda, M. (2013). Molecular epidemiology, plasmid analysis, virulence, and resistance of *Escherichia coli* isolated from neonatal intensive care units in Poland. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76(4), 542-545.
48. Chmielarczyk, A., Pilarczyk-Żurek, M., Kamińska, W., Pobiega, M., Romaniszyn, D., Ziółkowski, G., Wójkowska-Mach, J., & Bulanda, M. (2016). Molecular epidemiology and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in southern Poland: ICU as a risk factor for XDR strains. *Microbial Drug Resistance*, 22(4), 328-335.
49. Choi, A. H., Slamti, L., Avci, F. Y., Pier, G. B., & Maira-Litrán, T. (2009). The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly- $\beta$ -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 191(19), 5953-5963.
50. Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. E., Lee, S.-K., & Lee, J. C. (2005). Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 7(8), 1127-1138.
51. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260.
52. Cieza, R. J., Hu, J., Ross, B. N., Sbrana, E., & Torres, A. G. (2015). The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages. *Infection and Immunity*, 83(5), 1904-1918.
53. Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.

54. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65.
55. Crosa, J. H., & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 223-249.
56. Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26-38.
57. Čiginiskienė, A. (2020). Dauginio atsparumo antibiotikams gramneigiamų bakterijų sukeltos ventiliacinės pneumonijos: daktaro disertacija: medicinos ir sveikatos mokslai, medicina (M 001).
58. Da Silva, G. J., & Domingues, S. (2016). Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, 4(3), 29.
59. Daga, A. P., Koga, V. L., Soncini, J. G. M., de Matos, C. M., Perugini, M. R. E., Pelisson, M., Kobayashi R. K. T., & Vespero, E. C. (2019). *Escherichia coli* bloodstream infections in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 191.
60. Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J. M., & Lebel, P. (1994). Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(4), 286-291.
61. Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615-626.
62. Dell'Orco, F., Gusmara, C., Loiacono, M., Gugliotta, T., Albonico, F., Mortarino, M., & Zecconi, A. (2019). Evaluation of virulence factors profiles and antimicrobials resistance of *Escherichia coli* isolated from bulk tank milk and raw milk filters. *Research in Veterinary Science*, 123, 77-83.
63. Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., & Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 37-54.
64. Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), 939-951.

65. Dijkshoorn, L. (2013). *Acinetobacter baumannii*. In Molecular Typing in Bacterial Infections (pp. 433-456). *Humana Press*, Totowa, NJ.
66. Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E. Z., Fünfstück, R., & Hacker, J. (2001). S-fimbria-encoding determinant *sfa I* is located on pathogenicity island III536 of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, 69(7), 4248-4256.
67. Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 88-94.
68. Doi, Y., & Paterson, D. L. (2007). Detection of plasmid-mediated class C  $\beta$ -lactamases. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(3), 191-197.
69. Doi, Y., Adams, J. M., Yamane, K., & Paterson, D. L. (2007). Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4209-4210.
70. Doi, Y., Murray, G. L., & Peleg, A. Y. (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance—treatment options. In Seminars in respiratory and critical care medicine (Vol. 36, No. 01, pp. 085-098). *Thieme Medical Publishers*.
71. Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., & Sadowsky, M. J. (2000). Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2572-2577.
72. Domínguez, E., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Briñas, L., & Torres, C. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from healthy children in Spain. *Microbial Drug Resistance*, 8(4), 321-327.
73. Dozois, C. M., Fairbrother, J. M., Harel, J. O. S. E. E., & Bosse, M. A. R. C. (1992). *pap*-and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infection and Immunity*, 60(7), 2648-2656.
74. ECDC. (2020). Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—Annual Epidemiological Report for 2019.
75. Eijkelkamp, B. A., Stroehrer, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Lo, R. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 323(1), 44-51.

76. Elhosseiny, N. M., & Attia, A. S. (2018). *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1-15.
77. Empel, J., Baraniak, A., Literacka, E., Mrówka, A., Fielt, J., Sadowy, E., Hryniewicz W., & Gniadkowski, M. (2008). Molecular survey of  $\beta$ -lactamases conferring resistance to newer  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2449-2454.
78. Endalafer, N., Gebre-Selassie, S., & Kotiso, B. (2011). Nosocomial bacterial infections in a tertiary hospital in Ethiopia. *Journal of Infection Prevention*, 12(1), 38-43.
79. Endimiani, A., Luzzaro, F., Migliavacca, R., Mantengoli, E., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Pagani, L., Bonomo R. A., Rossolini, G. M., & Toniolo, A. (2007). Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2211-2214.
80. Ergönül, Ö., Aydın, M., Azap, A., Başaran, S., Tekin, S., Kaya, Ş., ... & Timurkaynak, F. (2016). Healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. *Journal of Hospital Infection*, 94(4), 381-385.
81. Espinal, P., Fugazza, G., Lopez, Y., Kasma, M., Lerman, Y., Malhotra-Kumar, S., Goossens, H., Carmeli, Y., & Vila, J. (2011). Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5396-5398.
82. Eto, D. S., Jones, T. A., Sundsbak, J. L., & Mulvey, M. A. (2007). Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 3(7), e100.
83. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. EUCAST; 2014. Available from: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_4.0.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf) (tikrinta: 2022 03 31)
84. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. EUCAST; 2016. Available from: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf) (tikrinta: 2022 03 31)
85. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone

- diameters. Version 8.1, 2018. EUCAST; 2018. Available from: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_8.1\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf) (tikrinta: 2022 03 31)
86. Farr, B. M., Salgado, C. D., Karchmer, T. B., & Sherertz, R. J. (2001). Can antibiotic-resistant nosocomial infections be controlled? *The Lancet Infectious Diseases*, 1(1), 38-45.
  87. Ferjani, S., Saidani, M., Ennigrou, S., Hsairi, M., & Redjeb, S. B. (2012). Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from cystitis and pyelonephritis. *Pathologie Biologie*, 60(5), 270-274.
  88. Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Conejo, M. C., Ayala, J. A., Perea, E. J., & Pascual, A. (2003). Relationship between  $\beta$ -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 565-574.
  89. Fetherston, J. D., Kirillina, O., Bobrov, A. G., Paulley, J. T., & Perry, R. D. (2010). The yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. *Infection and Immunity*, 78(5), 2045-2052.
  90. Fournier, P. E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., & Claverie, J. M. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genetics*, 2(1), e7.
  91. Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American journal of medicine*, 113(1), 5-13.
  92. Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660.
  93. Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics*, 28(1), 1-13.
  94. Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 644.
  95. Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S., & Sader, H. S. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 699-702.

96. Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2565-2571.
97. Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2005). Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn 1548. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2949-2953.
98. Gao, Q., Wang, X., Xu, H., Xu, Y., Ling, J., Zhang, D., Gao, S., & Liu, X. (2012). Roles of iron acquisition systems in virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: salmochelin and aerobactin contribute more to virulence than heme in a chicken infection model. *BMC Microbiology*, 12(1), 1-12.
99. Garcia, E. C., Brumbaugh, A. R., & Mobley, H. L. (2011). Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 79(3), 1225-1235.
100. García-Quintanilla, M., Carretero-Ledesma, M., Moreno-Martínez, P., Martín-Peña, R., Pachón, J., & McConnell, M. J. (2015). Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(6), 696-702.
101. Garénaux, A., Caza, M., & Dozois, C. M. (2011). The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 89-98.
102. Geisinger, E., & Isberg, R. R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathogens*, 11(2), e1004691.
103. Germon, P., Chen, Y. H., He, L., Blanco, J. E., Bree, A., Schouler, C., Huang, S.-H., & Moulin-Schouleur, M. (2005). *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 151(4), 1179-1186.
104. Giamarellou, H. (2010). Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, S50-S54.
105. Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina*, 47(3), 19.
106. Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Pavilonis, A., Patamsytė, V., Genel, N., Decre, D., & Arlet, G. (2017). Prevalence of O25b-ST131



- clone among *Escherichia coli* strains producing CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-92  $\beta$ -lactamases. *Infectious Diseases*, 49(2), 106-112.
107. Goh, H. S., Beatson, S. A., Totsika, M., Moriel, D. G., Phan, M. D., Szubert, J., Runnegar, N., Sidjabat, H. E., Paterson, D. L., Nimmo, G. R., Lipman, J., & Schembri, M. A. (2013). Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), 6535-6543.
  108. Goldstein, E. J. (2011). Beyond the target pathogen: ecological effects of the hospital formulary. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24, S21-S31.
  109. Gordon, N. C., & Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219-226.
  110. Greene, C., Wu, J., Rickard, A. H., & Xi, C. (2016). Evaluation of the ability of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms on six different biomedical relevant surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 63(4), 233-239.
  111. Gurieva, T., Dautzenberg, M. J., Gniadkowski, M., Derde, L. P., Bonten, M. J., & Bootsma, M. C. (2018). The transmissibility of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in intensive care units. *Clinical Infectious Diseases*, 66(4), 489-493.
  112. Hagan, E. C., & Mobley, H. L. (2007). Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity*, 75(8), 3941-3949.
  113. Hancock, V., Ferrieres, L., & Klemm, P. (2008). The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology*, 154(1), 167-175.
  114. Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., & Winkelmann, G. (2003). Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor Iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3677-3682.
  115. Harding, C. M., Tracy, E. N., Carruthers, M. D., Rather, P. N., Actis, L. A., & Munson Jr, R. S. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio*, 4(4), e00360-13.
  116. Harris, A. M., & DeGiorgio, M. (2017). An unbiased estimator of gene diversity with improved variance for samples containing related and

- inbred individuals of any ploidy. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(2), 671-691.
117. Haseley, S. R., Pantophlet, R., Brade, L., Holst, O., & Brade, H. (1997). Structural and serological characterisation of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter junii* strain 65. *European Journal of Biochemistry*, 245(2), 477-481.
  118. Hauck, Y., Soler, C., Jault, P., Mérens, A., Gérome, P., Nab, C. M., Trueba, F., Bargues, L., Thien, H. V., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2012). Diversity of *Acinetobacter baumannii* in four French military hospitals, as assessed by multiple locus variable number of tandem repeats analysis. *PLoS One*, 7(9), e44597.
  119. Henderson, I. R., Czczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., & Nataro, J. P. (1999). Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 67(11), 5587-5596.
  120. Héritier, C., Poirel, L., Lambert, T., & Nordmann, P. (2005). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3198-3202.
  121. Higgins, P. G., Dammhayn, C., Hackel, M., & Seifert, H. (2010a). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 233-238.
  122. Higgins, P. G., Lehmann, M., Wisplinghoff, H., & Seifert, H. (2010b). gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter genomic species 3*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4592-4594.
  123. Higgins, P. G., Prior, K., Harmsen, D., & Seifert, H. (2017). Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*, 12(6), e0179228.
  124. Higienos institutas (2012). Jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tyrimai. EUCAST diskų difuzijos metodas. EUCAST ekspertų antimikrobinio jautrumo tyrimų taisyklės.
  125. Higienos institutas (2016). Infekcijų ir jų rizikos veiksnių paplitimo tyrimas.
  126. Higienos institutas (2021). INFEKCIJŲ IR JŲ RIZIKOS VEIKSNIŲ PAPLITIMO TYRIMAS LIETUVOS LIGONINĖSE 2021m. ataskaita. Prieiga per internetą: [https://www.hi.lt/uploads/pdf/hospitalines/duomenu%20ataskaitos/PPS\\_ataskaita\\_2\\_versija.pdf](https://www.hi.lt/uploads/pdf/hospitalines/duomenu%20ataskaitos/PPS_ataskaita_2_versija.pdf) (tikrinta: 2022 03 29).

127. Ho, P. L., Wong, R. C., Chow, K. H., & Que, T. L. (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim–sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5), 627-634.
128. Homeier, T., Semmler, T., Wieler, L. H., & Ewers, C. (2010). The GimA locus of extraintestinal pathogenic *E. coli*: does reductive evolution correlate with habitat and pathotype?. *PLoS One*, 5(5), e10877.
129. Hong, H., Szabo, G., & Tamm, L. K. (2006). Electrostatic couplings in OmpA ion-channel gating suggest a mechanism for pore opening. *Nature Chemical Biology*, 2(11), 627-635.
130. Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R., ... & Mougous, J. D. (2010). A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host & Microbe*, 7(1), 25-37.
131. Hooper, D. C. (1999). Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*, 2(1), 38-55.
132. Hopkins, K. L., Davies, R. H., & Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 358-373
133. Hu, Y., Li, B., Jin, D., Cui, Z., Tao, X., Zhang, B., & Zhang, J. (2013). Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis typing of *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1263-1268.
134. Hui, C. Y., Guo, Y., Li, J., Hao, X. Y., Cao, H., & Huang, S. H. (2009). Purification of *E. coli* invasin IbeA-binding protein in intestinal epithelial cells. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, 29(12), 2375-2378.
135. Huys, G., Cnockaert, M., Vaneechoutte, M., Woodford, N., Nemec, A., Dijkshoorn, L., & Swings, J. (2005). Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant *Acinetobacter baumannii* strains from different European hospitals. *Research in Microbiology*, 156(3), 348-355.
136. Hujer, K. M., Hamza, N. S., Hujer, A. M., Perez, F., Helfand, M. S., Bethel, C. R., Thomson, J. M., Anderson, V. E., Barlow, M., Rice, L. B., Tenover, F. C., & Bonomo, R. A. (2005). Identification of a new allelic variant of the *Acinetobacter baumannii* cephalosporinase, ADC-7  $\beta$ -lactamase: defining a unique family of class C enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2941-2948.

137. Hujer, K. M., Hujer, A. M., Hulten, E. A., Bajaksouzian, S., Adams, J. M., Donskey, C. J., ... & Bonomo, R. A. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), 4114-4123.
138. Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(2), 85-90.
139. Yamane, K., Wachino, J. I., Suzuki, S., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Kimura, K., Kai, K., Ishikawa, S., Ozawa, Y., Konda, T., & Arakawa, Y. (2007). 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), 642.
140. Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046-5054.
141. Yoon, E. J., Courvalin, P., & Grillot-Courvalin, C. (2013). RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 2989-2995.
142. Iwashkiw, J. A., Seper, A., Weber, B. S., Scott, N. E., Vinogradov, E., Stratilo, C., Reiz, B., Cordwell, S. J., Whittal, R., Schild, S., & Feldman, M. F. (2012). Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathogens*, 8(6), e1002758.
143. Jacoby, G. A. (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement\_2), S120-S126.
144. Jauréguy, F., Carbonnelle, E., Bonacorsi, S., Clec'h, C., Casassus, P., Bingen, E., Picard, B., Nassif, X., & Lortholary, O. (2007). Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(9), 854-862.
145. Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C. R., Jeong, B.C., & Lee, S. H. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9654-9692.

146. Jernigan, J. A., Hatfield, K. M., Wolford, H., Nelson, R. E., Olubajo, B., Reddy, S. C., ... & Baggs, J. (2020). Multidrug-resistant bacterial infections in US hospitalized patients, 2012–2017. *New England Journal of Medicine*, 382(14), 1309-1319.
147. Jiang, X., Yu, T., Jiang, X., Zhang, W., Zhang, L., & Ma, J. (2014). Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Henan, China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(3), 381-383.
148. Johnson, J. K., Robinson, G. L., Zhao, L., Harris, A. D., Stine, O. C., & Thom, K. A. (2016). Comparison of molecular typing methods for the analyses of *Acinetobacter baumannii* from ICU patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 345-350.
149. Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261-272.
150. Jones, C. H., Tuckman, M., Keeney, D., Ruzin, A., & Bradford, P. A. (2009). Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 465-475.
151. Juttukonda, L. J., Chazin, W. J., & Skaar, E. P. (2016). *Acinetobacter baumannii* coordinates urea metabolism with metal import to resist host-mediated metal limitation. *MBio*, 7(5), e01475-16.
152. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
153. Karah, N., Samuelsen, Ø., Zarrilli, R., Sahl, J. W., Wai, S. N., & Uhlin, B. E. (2015). CRISPR-cas subtype I-Fb in *Acinetobacter baumannii*: evolution and utilization for strain subtyping. *PLoS One*, 10(2), e0118205.
154. Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S., & Nordmann, P. (2001). Plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence IS Ecp1. *FEMS Microbiology Letters*, 201(2), 237-241.
155. Kawamori, F., Hiroi, M., Harada, T., Ohata, K., Sugiyama, K., Masuda, T., & Ohashi, N. (2008). Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157: H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE. *Journal of Medical Microbiology*, 57(1), 58-63.

156. Keys, C., Kemper, S., & Keim, P. (2005). Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157: H7 and O55: H7 genomes for high-resolution molecular typing. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 928-940.
157. Kenyon, J. J., & Hall, R. M. (2013). Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes. *PloS One*, 8(4), e62160.
158. Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 478-482.
159. Kim, K. S. (2008). Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 625-634.
160. Kim, S. W., Choi, C. H., Moon, D. C., Jin, J. S., Lee, J. H., Shin, J. H., Kim, J. M., Lee, Y. C., Seo, S. Y., Cho, D. T., & Lee, J. C. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 301(2), 224-231.
161. Kirtikliene, T., Naugzemys, D., Steponkiene, A., Bogdevic, R., Vizuje, G., Zvingila, D., & Kuisiene, N. (2019). Evaluation of the Inter- and Intrahospital Spread of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Lithuanian Hospitals. *Microbial Drug Resistance*, 25(3), 326-335.
162. Knapp, S., Wieland, C. W., Florquin, S., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Tshimbalanga, N., Akira, S., & van der Poll, T. (2006). Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(1), 122-129.
163. Knust, Z., Blumenthal, B., Aktories, K., & Schmidt, G. (2009). Cleavage of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 is required for full biologic activity. *Infection and Immunity*, 77(5), 1835-1841.
164. Koczura, R., Przystlakowska, B., Mokracka, J., & Kaznowski, A. (2014). Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance of Clinical *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* Complex in Poznań, Poland. *Current Microbiology*, 69(3), 258-262.
165. Koga, V. L., Tomazetto, G., Cyoia, P. S., Neves, M. S., Vidotto, M. C., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. (2014). Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *BioMed Research International*, 2014.

166. Laupland, K. B. (2013). Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6), 492-500.
167. Lausch, K. R., Fuursted, K., Larsen, C. S., & Storgaard, M. (2013). Colonisation with multi-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitalised Danish patients with a history of recent travel: a cross-sectional study. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 11(5), 320-323.
168. Lautenbach, E., Patel, J. B., Bilker, W. B., Edelstein, P. H., & Fishman, N. O. (2001). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), 1162-1171.
169. Lee, K., Yong, D., Jeong, S. H., & Chong, Y. (2011). Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. *Yonsei Medical Journal*, 52(6), 879-891.
170. Lee, S., Yu, J. K., Park, K., Oh, E. J., Kim, S. Y., & Park, Y. J. (2010). Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with *blaCTX-M*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 40(4), 361-367.
171. Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296.
172. Li, Y., Li, Q., Du, Y., Jiang, X., Tang, J., Wang, J., Li, G., & Jiang, Y. (2008). Prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type AmpC  $\beta$ -lactamase resistance in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1317-1321.
173. Lima, W. G., Alves, M. C., Cruz, W. S., & Paiva, M. C. (2018). Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(6), 1009-1019.
174. Lin, J., Huang, S., & Zhang, Q. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and Infection*, 4(3), 325-331.
175. Lindberg, S., Xia, Y., Sondén, B., Göransson, M., Hacker, J., & Uhlin, B. E. (2008). Regulatory Interactions among adhesin gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 76(2), 771-780.
176. Lindemann, P. C., Risberg, K., Wiker, H. G., & Mylvaganam, H. (2012). Aminoglycoside resistance in clinical *Escherichia coli* and

- Klebsiella pneumoniae* isolates from Western Norway. *Apmis*, 120(6), 495-502.
177. Lindstedt, B. A. (2005). Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26(13), 2567-2582.
178. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168.
179. Livermore, D. M., & Woodford, N. (2006). The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14(9), 413-420.
180. Livermore, D. M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G. M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T. M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., & Woodford, N. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 165-174.
181. Livermore, D. M., Mushtaq, S., Warner, M., Zhang, J. C., Maharjan, S., Doumith, M., & Woodford, N. (2011). Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 48-53.
182. Loehfelm, T. W., Luke, N. R., & Campagnari, A. A. (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1036-1044.
183. Longhi, C., Maurizi, L., Conte, A. L., Marazzato, M., Comanducci, A., Nicoletti, M., & Zagaglia, C. (2022). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Beta-Lactam Antibiotic and Heavy Metal Resistance. *Antibiotics*, 11(3), 328.
184. Lu, S., Jin, D., Wu, S., Yang, J., Lan, R., Bai, X., Liu, S., Meng, Q., Yuan, X., Zhou, J., Pu, J., Chen, Q., Dai, H., Hu, Y., Xiong, Y., Ye, C., & Xu, J. (2016). Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of Marmota himalayana in Qinghai-Tibet plateau of China. *Emerging Microbes & Infections*, 5(1), 1-9.
185. Luke, N. R., Saubaran, S. L., Russo, T. A., Beanan, J. M., Olson, R., Loehfelm, T. W., Cox, A. D., Michael, F. St., Vinogradov, E. V., & Campagnari, A. A. (2010). Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii*



- lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infection and Immunity*, 78(5), 2017-2023.
186. Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3375-3380.
187. Mammeri, H., Guillon, H., Eb, F., & Nordmann, P. (2010). Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4556-4560.
188. Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., & Lambert, T. (2004). Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3298-3304.
189. Maroncle, N. M., Sivick, K. E., Brady, R., Stokes, F. E., & Mobley, H. L. (2006). Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 74(11), 6124-6134.
190. Maruvada, R., & Kim, K. S. (2012). IbeA and OmpA of *Escherichia coli* K1 exploit Rac1 activation for invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 80(6), 2035-2041.
191. Miajlovic, H., Mac Aogain, M., Collins, C. J., Rogers, T. R., & Smith, S. G. (2016). Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. *Journal of Medical Microbiology*, 65(1), 71-79.
192. Mícenková, L., Beňová, A., Frankovičová, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A., Kmeťová, M., & Šmajš, D. (2017). Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(3), 182-189.
193. Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D., Vinogradov, E., Seemann, T., ... & Boyce, J. D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 4971-4977.
194. Mohajeri, P., Azizkhani, S., Farahani, A., & Norozi, B. (2016). Genotyping of *coa* and *aroA* Genes of methicillin-resistant staphylococcus aureus strains isolated from nasal samples in western Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1).

195. Mohapatra, B. R., Broersma, K., & Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 98-106.
196. Moniri, R., Farahani, R. K., Shajari, G., Shirazi, M. N., & Ghasemi, A. (2010). Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in *Acinetobacter* spp. with emergence of multidrug-resistant strains. *Iranian Journal of Public Health*, 39(2), 63.
197. Moore, J. L., Becker, K. W., Nicklay, J. J., Boyd, K. L., Skaar, E. P., & Caprioli, R. M. (2014). Imaging mass spectrometry for assessing temporal proteomics: analysis of calprotectin in *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. *Proteomics*, 14(7-8), 820-828.
198. Mora-Rillo, M., Fernández-Romero, N., Navarro-San Francisco, C., Díez-Sebastián, J., Romero-Gómez, M. P., Arnalich Fernández, F., López, J. R. A., & Mingorance, J. (2015). Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence*, 6(1), 93-100.
199. Morris, F. C., Dexter, C., Kostoulias, X., Uddin, M. I., & Peleg, A. Y. (2019). The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1601.
200. Moubareck, C., Brémont, S., Conroy, M. C., Courvalin, P., & Lambert, T. (2009). GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3579-3581.
201. Mulvey, M. A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 4(5), 257-271.
202. Munro, P., Flatau, G., Doye, A., Boyer, L., Oregioni, O., Mege, J. L., Landraud, L., & Lemichez, E. (2004). Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35849-35857.
203. Nairn, B. L., Lonergan, Z. R., Wang, J., Braymer, J. J., Zhang, Y., Calcutt, M. W., ... & Skaar, E. P. (2016). The response of *Acinetobacter baumannii* to zinc starvation. *Cell Host & Microbe*, 19(6), 826-836.
204. Najar-Peerayeh, S., & Karmostaji, A. (2019). Evaluation of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat (MLVA-8 Or-say) for Typing of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients in Tehran, Iran. *Arch. Clin. Infect. Dis*, 14, e64402.
205. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.

206. Nemeč, A., Dijkshoorn, L., & van der Reijden, T. J. (2004). Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *Journal of Medical Microbiology*, 53(2), 147-153.
207. Nigro, S. J., & Hall, R. M. (2016). Loss and gain of aminoglycoside resistance in global clone 2 *Acinetobacter baumannii* in Australia via modification of genomic resistance islands and acquisition of plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), 2432-2440.
208. Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Pacheco, A. G., Boxrud, D. J., & Harrison, L. H. (2003). Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Distinguishes Outbreak and Sporadic *Escherichia coli* O157: H7 Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5389-5397.
209. Noori, M., Karimi, A., Fallah, F., Hashemi, A., Alimehr, S., Goudarzi, H., & Aghamohammad, S. (2014). High Prevalence of Metallo-beta-lactamase Producing *Acinetobacter*. *Arch Pediatr*, 2(3), e15439.
210. Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263-272.
211. Över, U., Gür, D., Ünal, S., Miller, G. H., & Aminoglycoside Resistance Study Group. (2001). The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(9), 470-478.
212. Owrangi, B., Masters, N., Kuballa, A., O'Dea, C., Vollmerhausen, T. L., & Katouli, M. (2018). Invasion and translocation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(5), 833-839.
213. Paauw, A., Leverstein-van Hall, M. A., van Kessel, K. P., Verhoef, J., & Fluit, A. C. (2009). Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS One*, 4(12), e8240.
214. Pai, H., Kang, C. I., Byeon, J. H., Lee, K. D., Park, W. B., Kim, H. B., Kim, E.-C., Oh, M. O., & Choe, K. W. (2004). Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3720-3728.
215. Parham, N. J., Pollard, S. J., Desvaux, M., Scott-Tucker, A., Liu, C., Fivian, A., & Henderson, I. R. (2005). Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical

- isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4076-4082.
216. Pasterán, F., Rapoport, M., Petroni, A., Faccone, D., Corso, A., Galas, M., Vázquez, M., Procopio, A., Tokumoto, M., & Cagnoni, V. (2006). Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3222-3224.
217. Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.
218. Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538-582.
219. Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471-3484.
220. Pérez-Etayo, L., González, D., & Vitas, A. I. (2020). The Aquatic Ecosystem, a Good Environment for the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Factors Among Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases Producing *E. coli*. *Microorganisms*, 8(4), 568.
221. Pérez-Varela, M., Corral, J., Vallejo, J. A., Rumbo-Feal, S., Bou, G., Aranda, J., & Barbé, J. (2017). Mutations in the  $\beta$ -Subunit of the RNA Polymerase Impair the Surface-Associated Motility and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Immunity*, 85(8), e00327-17.
222. Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 1-11.
223. Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 159-166.
224. Poirel, L., Gniadkowski, M., & Nordmann, P. (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related  $\beta$ -lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6), 1031-1034.
225. Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Mhammeri, H., Liard, A., & Nordmann, P. (2005). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3523-3525.

226. Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 826-836.
227. Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119-123.
228. Potron, A., Poirel, L., Croizé, J., Chanteperdrix, V., & Nordmann, P. (2009). Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum Carb-type ss-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 3010-3016.
229. Pourcel, C., Minandri, F., Hauck, Y., d'Arezzo, S., Imperi, F., Vergnaud, G., & Visca, P. (2011). Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 539-548.
230. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1000-1006.
231. Prakapaite, R., Saab, F., Planciuniene, R., Petraitis, V., Walsh, T. J., Petraitiene, R., Semoskaite, R., Baneviciene, R., Kalediene, L., & Kavaliauskas, P. (2019). Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals emergence of drug resistant O15, O22 and O25 serogroups. *Medicina*, 55(11), 733.
232. Prasadarao, N. V., Blom, A. M., Villoutreix, B. O., & Linsangan, L. C. (2002). A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *The Journal of Immunology*, 169(11), 6352-6360.
233. Rafei, R., Osman, M., Dabboussi, F., & Hamze, M. (2019). Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiology*, 14(12), 1065-1080.
234. Raka, L., Zoutman, D., Mulliqi, G., Krasniqi, S., Dedushaj, I., Raka, N., Ahmeti, S., & Elezi, Y. (2006). Prevalence of nosocomial infections in high-risk units in the university clinical center of Kosova. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 27(4), 421-423.
235. Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151-171.

236. Rangel, D. E., Marín-Medina, N., Castro, J. E., González-Mancera, A., & Forero-Shelton, M. (2013). Observation of bacterial type I pili extension and contraction under fluid flow. *PLoS One*, 8(6), e65563.
237. Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 881-941.
238. Repizo, G. D. (2017). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* strains expressing the Type 6 secretion system in patients with bacteremia. *Virulence*, 8(7), 1099-1101.
239. Reusch, R. N. (2012). Insights into the structure and assembly of *Escherichia coli* outer membrane protein A. *The FEBS Journal*, 279(6), 894-909.
240. Ribeiro-Gonçalves, B., Francisco, A. P., Vaz, C., Ramirez, M., & Carriço, J. A. (2016). PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W246-W251.
241. Rivas, L., Mellor, G. E., Gobius, K., & Fegan, N. (2015). Typing and Subtyping Methods for Pathogenic *Escherichia coli*. In *Detection and Typing Strategies for Pathogenic Escherichia coli* (pp. 67-99). Springer, New York, NY
242. Roberts, M. C. (2002). Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Molecular biotechnology*, 20(3), 261-283.
243. Robicsek, A., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10), 629-640.
244. Roca Subirà, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., & Vila Estapé, J. (2012). The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Frontiers in Microbiology*, 3, 148.
245. Rodríguez-Baño, J., & Pascual, A. (2008). Clinical significance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Expert review of Anti-infective Therapy*, 6(5), 671-683.
246. Romanin, P., Palermo, R. L., Cavalini, J. F., Favaro, L. D. S., De Paula-Petrolí, S. B., Fernandes, E. V., ... & Yamauchi, L. M. (2019). Multidrug-and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil: The importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in a 10-year study. *Microbial Drug Resistance*, 25(9), 1365-1373.
247. Rossi, I., Royer, S., Ferreira, M., Braga, I. A., Campos, P., Batistão, D., Fuga, B., Cerdeira, L., Lincopan, N., Gontijo-Filho P. P., & Ribas, R. M. (2021). Novel ST1465/CC216 Nosocomial Lineage of Carbapenem-

- Resistant *Acinetobacter baumannii* Harboring an Unusual Plasmid Carrying bla NDM-1 Gene. *Microbial Drug Resistance*, 27(4), 471-475.
248. Rowe-Magnus, D. A., & Mazel, D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 115-125.
249. Ruiz, J., Pons, M. J., & Gomes, C. (2012). Transferable mechanisms of quinolone resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(3), 196-203.
250. Ruiz-Perez, F., Wahid, R., Faherty, C. S., Kolappaswamy, K., Rodriguez, L., Santiago, A., Murphy, E., Cross, A., Sztejn, M. B., & Nataro, J. P. (2011). Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12881-12886.
251. Rumbo, C., Gato, E., López, M., Ruiz de Alegría, C., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., ... & Tomás, M. (2013). Contribution of efflux pumps, porins, and  $\beta$ -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5247-5257.
252. Rumbo, C., Tomás, M., Fernandez Moreira, E., Soares, N. C., Carvajal, M., Santillana, E., Beceiro, A., Romero, A., & Bou, G. (2014). The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells. *Infection and Immunity*, 82(11), 4666-4680.
253. Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5(5), 449-456.
254. Russo, T. A., Luke, N. R., Beanan, J. M., Olson, R., Sauberan, S. L., MacDonald, U., Schultz, W. L., Umland, T. C., & Campagnari, A. A. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and Immunity*, 78(9), 3993-4000.
255. Sadeghi, H., Khoei, S. G., Bakht, M., Rostamani, M., Rahimi, S., Ghaemi, M., & Mirzaei, B. (2021). A retrospective cross-sectional survey on nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns in hospitalized patients in northwest of Iran. *BMC Research Notes*, 14(1), 1-7.
256. Sáez-López, E., Bosch, J., Salvia, M. D., Fernández-Orth, D., Cepas, V., Ferrer-Navarro, M., Figueras-Aloy, J., Vila, J., & Soto, S. M. (2017).

- Outbreak caused by *Escherichia coli* O18: K1: H7 sequence type 95 in a neonatal intensive care unit in Barcelona, Spain. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(11), 1079-1086.
257. Saffari, F., Monsen, T., Karmostaji, A., Azimabad, F. B., & Widerström, M. (2017). Significant spread of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes of clonal complex 92 among intensive care unit patients in a university hospital in southern Iran. *Journal of Medical Microbiology*, 66(11), 1656-1662.
258. Sahl, J. W., Johnson, J. K., Harris, A. D., Phillippy, A. M., Hsiao, W. W., Thom, K. A., & Rasko, D. A. (2011). Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. *BMC Genomics*, 12(1), 1-12.
259. Sandkvist, M. (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infection and Immunity*, 69(6), 3523-3535.
260. Sannes, M. R., Kuskowski, M. A., Owens, K., Gajewski, A., & Johnson, J. R. (2004). Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(12), 2121-2128.
261. Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmieciak, A., Frej-Madrzak, M., Ksiaczek, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1), 1-16.
262. Sato, Y., Unno, Y., Kawakami, S., Ubagai, T., & Ono, Y. (2017). Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *Journal of Medical Microbiology*, 66(2), 203-212.
263. Schito, G. C., Naber, K. G., Botto, H., Palou, J., Mazzei, T., Gualco, L., & Marchese, A. (2009). The ARES study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(5), 407-413.
264. Schultz, C., & Geerlings, S. (2012). Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*. *Drugs*, 72(1), 1-16.
265. Sepp, E., Andreson, R., Balode, A., Bilozor, A., Brauer, A., Egorova, S., ... & Naaber, P. (2019). Phenotypic and molecular epidemiology of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Escherichia coli* in Northern and Eastern Europe. *Frontiers in Microbiology*, 2465.



266. Shanthalingam, S., & Srikumaran, S. (2009). Intact signal peptide of CD18, the  $\beta$ -subunit of  $\beta$ 2-integrins, renders ruminants susceptible to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15448-15453.
267. Sharma, H., Tal, R., Clark, N. A., & Segars, J. H. (2014). Microbiota and pelvic inflammatory disease. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 32, No. 01, pp. 043-049). *Thieme Medical Publishers*.
268. Shin, S., & Kim, K. S. (2006). RhoA and Rac1 contribute to type III group B streptococcal invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(1), 538-542.
269. Shokri, D., Khorasgani, M. R., Fatemi, S. M., & Soleimani-Delfan, A. (2017). Resistotyping, phenotyping and genotyping of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) among Gram-negative bacilli from Iranian patients. *Journal of Medical Microbiology*, 66(4), 402-411.
270. Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Kallen, A., Limbago, B., & Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 1-14.
271. Simões, L. C., Simões, M., & Vieira, M. J. (2007). Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6192-6200.
272. Singh, J. K., Adams, F. G., & Brown, M. H. (2019). Diversity and function of capsular polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 3301.
273. Skals, M., Jensen, U. B., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., Leipziger, J., & Praetorius, H. A. (2010). *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin triggers shrinkage of erythrocytes via KCa3. 1 and TMEM16A channels with subsequent phosphatidylserine exposure. *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15557-15565.
274. Skiebe, E., de Berardinis, V., Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., ... & Wilharm, G. (2012). Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1, 3-diaminopropane. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(3), 117-128.
275. Smani, Y., McConnell, M. J., & Pachón, J. (2012). Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PloS One*, 7(4), e33073.

276. Smani, Y., Dominguez-Herrera, J., & Pachón, J. (2013). Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of Infectious Diseases*, 208(10), 1561-1570.
277. Smani, Y., Fàbrega, A., Roca, I., Sánchez-Encinales, V., Vila, J., & Pachón, J. (2014). Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1806-1808.
278. Smith, M. G., Des Etages, S. G., & Snyder, M. (2004). Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 24(9), 3874-3884.
279. Smith, M. G., Gianoulis, T. A., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J., Ornston, L. N., Gerstein, M., & Snyder, M. (2007). New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & Development*, 21(5), 601-614.
280. Sonnen, A. F. P., & Henneke, P. (2013). Role of pore-forming toxins in neonatal sepsis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.
281. Sora, V. M., Meroni, G., Martino, P. A., Soggiu, A., Bonizzi, L., & Zecconi, A. (2021). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens*, 10(11), 1355.
282. Su, Q., Guan, T., & Lv, H. (2016). Siderophore biosynthesis coordinately modulated the virulence-associated interactive metabolome of uropathogenic *Escherichia coli* and human urine. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
283. Sukupolvi, S. O. I. L. A., & O'Connor, C. D. (1990). TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiological Reviews*, 54(4), 331-341.
284. Sundsfjord, A., Simonsen, G. S., Haldorsen, B. C., Haaheim, H., HJELMEVOLL, S. O., Littauer, P. I. A., & Dahl, K. H. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *Apmis*, 112(11-12), 815-837.
285. Šedo, O., Nemeč, A., Křížová, L., Kačalová, M., & Zdráhal, Z. (2013). Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*—*Acinetobacter baumannii* complex. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(8), 572-578.
286. Šeputienė, V., Linkevičius, M., Bogdaitė, A., Povilonis, J., Plančiūnienė, R., Giedraitienė, A., Pavilonis, A., & Sužiedėlienė, E. (2010). Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-

- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals in Lithuania. *Journal of Medical Microbiology*, 59(10), 1263-1265.
287. Talan, D. A., Stamm, W. E., Hooton, T. M., Moran, G. J., Burke, T., Iravani, A., Reuning-Scherer, J., Deborah A., & Church, D. A. (2000). Comparison of ciprofloxacin (7 days) and trimethoprim-sulfamethoxazole (14 days) for acute uncomplicated pyelonephritis in women: a randomized trial. *Jama*, 283(12), 1583-1590.
288. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.
289. Teng, C. H., Xie, Y., Shin, S., Di Cello, F., Paul-Satyaseela, M., Cai, M., & Kim, K. S. (2006). Effects of ompA deletion on expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K1 strain RS218 and on the association of *E. coli* with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 74(10), 5609-5616.
290. Tiku, V. (2022). *Acinetobacter baumannii*: Virulence Strategies and Host Defense Mechanisms. *DNA and Cell Biology*, 41(1), 43-48.
291. Tilley, D., Law, R., Warren, S., Samis, J. A., & Kumar, A. (2014). CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiology Letters*, 356(1), 53-61.
292. Tipton, K. A., & Rather, P. N. (2017). An ompR-envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Journal of Bacteriology*, 199(3), e00705-16.
293. Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A., & Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*, 154(11), 3398-3409.
294. Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472-3500.
295. Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J., & De Champs, C. (2008). First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*, 60(3), 287-290.

296. Touchon, M., Cury, J., Yoon, E. J., Krizova, L., Cerqueira, G. C., Murphy, C., ... & Rocha, E. P. (2014). The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biology and Evolution*, 6(10), 2866-2882.
297. Touchon, M., Perrin, A., De Sousa, J. A. M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C. L., Denamur, E., Gordon, D., & Rocha, E. P. (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 16(6), e1008866.
298. Trebosc, V., Gartenmann, S., Tötzl, M., Lucchini, V., Schellhorn, B., Pieren, M., Lociuero, S., Gitzinger, M., Tigges, M., Bumann, D., & Kemmer, C. (2019). Dissecting colistin resistance mechanisms in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *MBio*, 10(4), e01083-19.
299. Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M. F. I., Babini, G. S., Douboyas, J., & Livermore, D. M. (2000). Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1290-1292.
300. Tumbarello, M., Sanguinetti, M., Montuori, E., Treçarichi, E. M., Posteraro, B., Fiori, B., Citton, R., D'Inzeo, T., Fadda, G., Cauda, R., & Spanu, T. (2007). Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 1987-1994.
301. Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., & Pitt, T. L. (2006). The role of IS *Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 72-77.
302. Usein, C. R., Papagheorghe, R., Oprea, M., Condei, M., & Străuț, M. (2016). Molecular characterization of bacteremic *Escherichia coli* isolates in Romania. *Folia Microbiologica*, 61(3), 221-226.
303. Van Belkum, A., Scherer, S., Van Alphen, L., & Verbrugh, H. (1998). Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 275-293.
304. Verhelst, R., Verstraelen, H., Claeys, G., Verschraegen, G., Van Simaey, L., De Ganck, C., De Backer, E., Temmerman, M., & Vaneechoutte, M. (2005). Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiology*, 5(1), 1-11.

305. Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.
306. Vervoort, J., Baraniak, A., Gazin, M., Sabirova, J., Lammens, C., Kazma, M., ... & Malhotra-Kumar, S. (2012). Characterization of two new CTX-M-25-group extended-spectrum  $\beta$ -lactamase variants identified in *Escherichia coli* isolates from Israel. *PLoS One*, 7(9), e46329-e46329.
307. Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., & Biswas, I. (2016). Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Frontiers in Public Health*, 4, 105.
308. Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., ... & Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437-463.
309. Vincent, J. L. (2003). Nosocomial infections in adult intensive-care units. *The Lancet*, 361(9374), 2068-2077.
310. Voor in 't holt, A. F., Wattel, A. A., Boers, S. A., Jansen, R., Hays, J. P., Goessens, W. H., & Vos, M. C. (2016). Detection of healthcare-related extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* transmission events using combined genetic and phenotypic epidemiology. *PLoS One*, 11(7), e0160156.
311. Waack, U., Warnock, M., Yee, A., Huttinger, Z., Smith, S., Kumar, A., Deroux, A., David Ginsburg, Mobley, H. L. T., Lawrence, D. A., & Sandkvist, M. (2018). CpaA is a glycan-specific adamalysin-like protease secreted by *Acinetobacter baumannii* that inactivates coagulation factor XII. *MBio*, 9(6), e01606-18.
312. Wachino, J. I., & Arakawa, Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resistance Updates*, 15(3), 133-148.
313. Walsh, F., & Rogers, T. R. (2012). Comparison of plasmid-mediated quinolone resistance and extended-spectrum b-lactamases in third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from four Irish hospitals. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 142-147.
314. Wang, S., Niu, C., Shi, Z., Xia, Y., Yaqoob, M., Dai, J., & Lu, C. (2011). Effects of *ibeA* deletion on virulence and biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 79(1), 279-287.

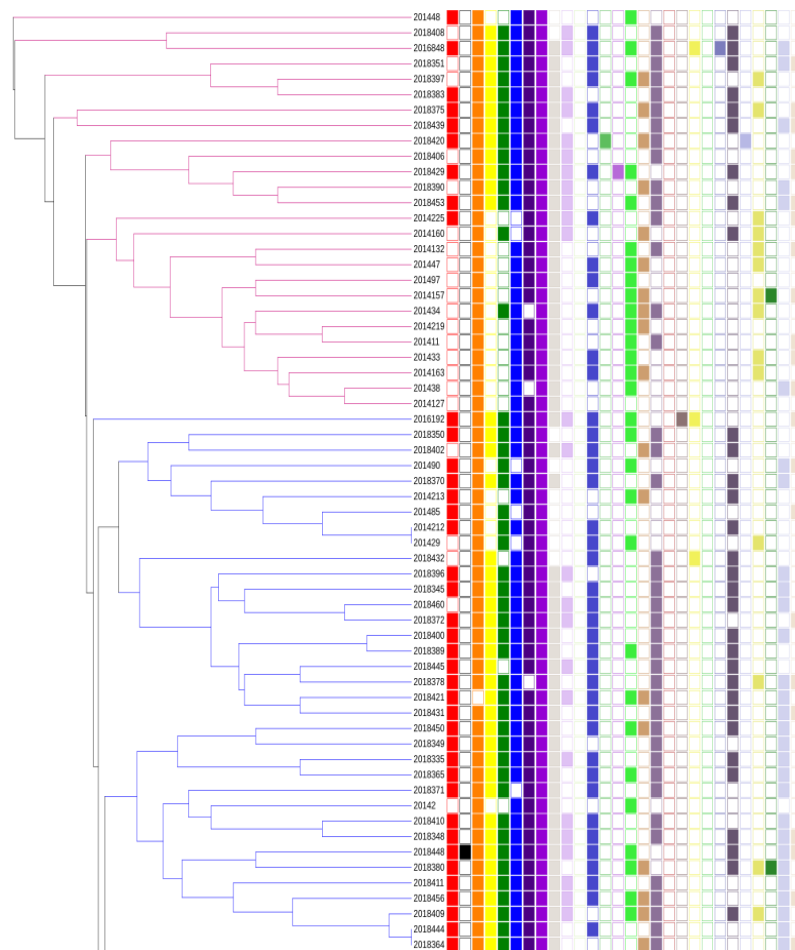
315. Watts, Jeffrey L., and Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2008.
316. Weber, B. S., Kinsella, R. L., Harding, C. M., & Feldman, M. F. (2017). The secrets of *Acinetobacter* secretion. *Trends in Microbiology*, 25(7), 532-545.
317. Welch, R. A. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli*-associated exotoxins. *Microbiology Spectrum*, 4(3), 4-3.
318. Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. (2018). Pili assembled by the chaperone/usher pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus*, 8(1).
319. Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 39-68.
320. Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., & Skiebe, E. (2013). DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *Journal of Bacteriology*, 195(18), 4146-4153.
321. Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research*, 378, 35-44.
322. Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736-755.
323. Wu, H. H., Yang, Y. Y., Hsieh, W. S., Lee, C. H., Leu, S. J. C., & Chen, M. R. (2009). OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68(6), 677-690.
324. Wullt, B., Bergsten, G., Connell, H., Röllano, P., Gebratsedik, N., Hang, L., & Svanborg, C. (2001). P-fimbriae trigger mucosal responses to *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Cellular Microbiology*, 3(4), 255-264.
325. Xu, C. F., Bilya, S. R., & Xu, W. (2019). adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes and New Infections*, 30, 100549.
326. Xu, L., Shabir, S., Bodah, T., McMurray, C., Hardy, K., Hawkey, P., & Nye, K. (2011). Regional survey of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* reveals marked heterogeneity in the distribution of the ST131 clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), 505-511.

327. Zarrilli, R., Giannouli, M., Tomasone, F., Triassi, M., & Tsakris, A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(05), 335-341.
328. Zarubica, T., Baker, M. R., Wright, H. T., & Rife, J. P. (2011). The aminoglycoside resistance methyltransferases from the ArmA/Rmt family operate late in the 30S ribosomal biogenesis pathway. *Rna*, 17(2), 346-355.
329. Zhang, L. P., Xue, W. C., & Meng, D. Y. (2016). First report of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 5 (NDM-5)-producing *Escherichia coli* from blood cultures of three leukemia patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 42, 45-46.
330. Zou, Y., He, L., Wu, C. H., Cao, H., Xie, Z. H., Ouyang, Y., Wang, Y., Jong, A., & Huang, S. H. (2007). PSF is an IbeA-binding protein contributing to meningitic *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Medical Microbiology and Immunology*, 196(3), 135-143.

# PRIEDAI

**Priedas 1.** *Acinetobacter* spp. BOX-PGR dendrograma su nustatytais atsparumo genais.

Klasteris 1–2



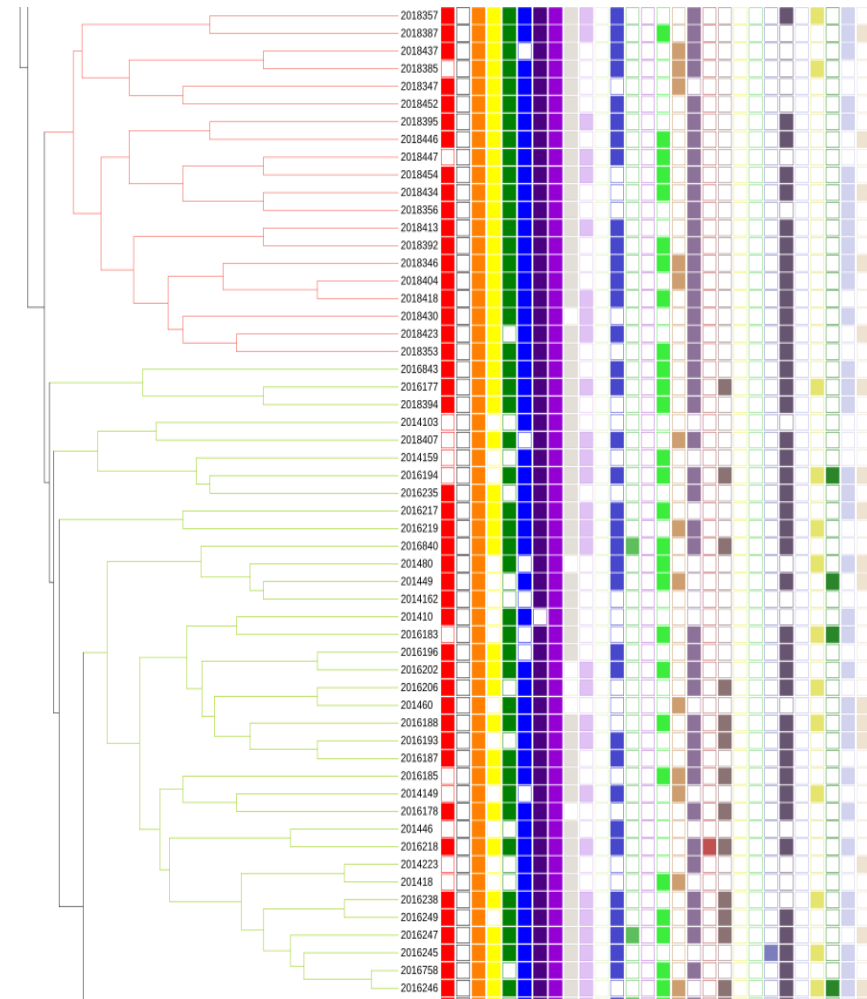
### Atsparumo genai

<span style="color: red;">■</span> TEM-92	<span style="color: lightgreen;">■</span> aacC1	<span style="color: darkgreen;">■</span> adeE
<span style="color: black;">■</span> NDM	<span style="color: darkblue;">■</span> aacC2	<span style="color: cyan;">■</span> armA
<span style="color: orange;">■</span> OXA-51	<span style="color: mediumgreen;">■</span> aadA1	<span style="color: brown;">■</span> rmtB
<span style="color: yellow;">■</span> GES-11	<span style="color: lightpurple;">■</span> aadB	<span style="color: purple;">■</span> rmtC
<span style="color: green;">■</span> VIM-1	<span style="color: brightgreen;">■</span> aphA6	<span style="color: yellowgreen;">■</span> IMP-1
<span style="color: blue;">■</span> OXA sub-1	<span style="color: brown;">■</span> gyrA	<span style="color: green;">■</span> IMP-2
<span style="color: purple;">■</span> OXA sub-2	<span style="color: darkpurple;">■</span> parC	<span style="color: lightpurple;">■</span> VEB
<span style="color: darkpurple;">■</span> OXA sub-3	<span style="color: darkred;">■</span> qnrA	<span style="color: orange;">■</span> PER
<span style="color: grey;">■</span> OXA sub-4	<span style="color: grey;">■</span> carO	
<span style="color: lightblue;">■</span> RTG-4	<span style="color: darkbrown;">■</span> adeR	

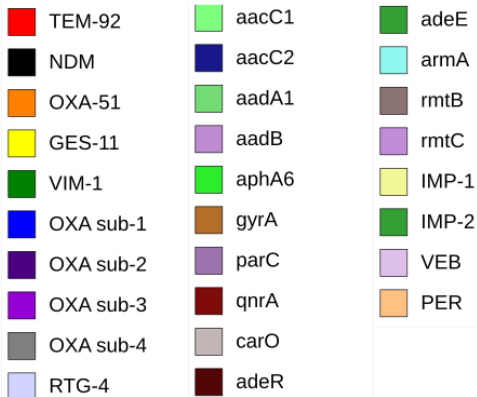


**Priedas 1 (tęsinys).**

**Klasteris 3–4**

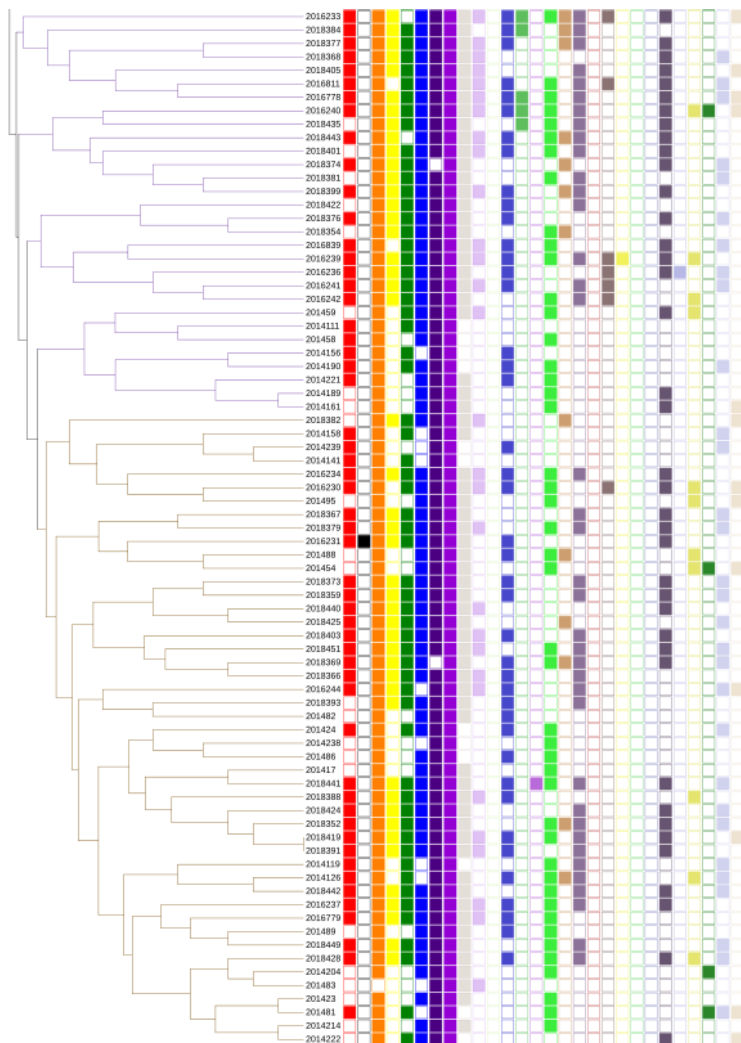


**Atsparumo genai**



# Priedas 1 (tęsinys).

## Klasteris 5–6

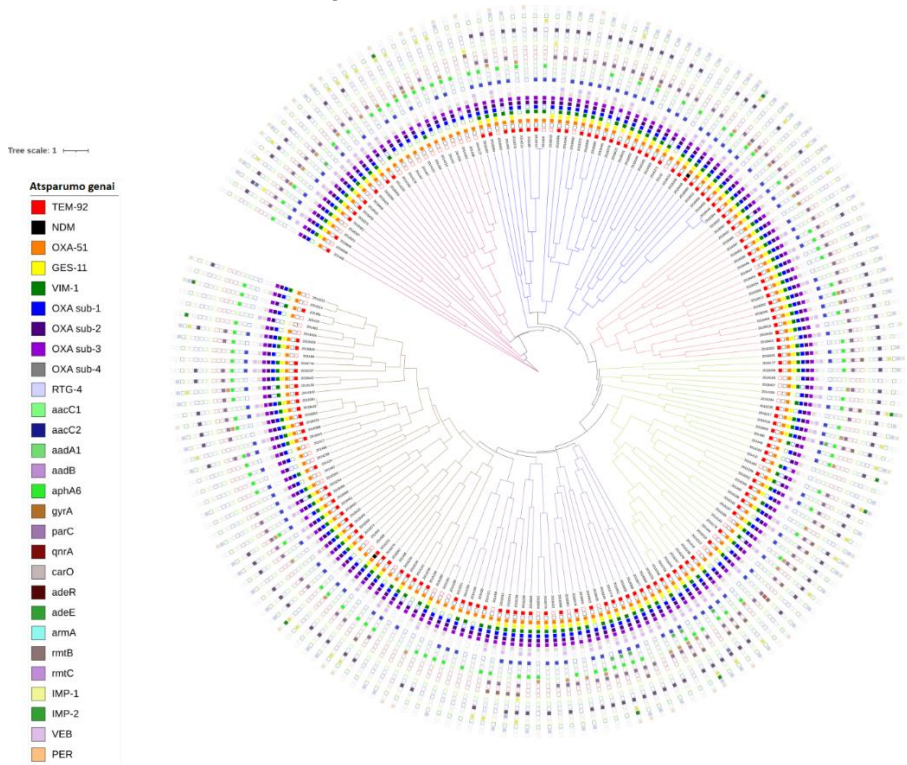


### Atsparumo genai

<span style="color: red;">■</span> TEM-92	<span style="color: lightgreen;">■</span> aacC1	<span style="color: darkgreen;">■</span> adeE
<span style="color: black;">■</span> NDM	<span style="color: darkblue;">■</span> aacC2	<span style="color: cyan;">■</span> armA
<span style="color: orange;">■</span> OXA-51	<span style="color: mediumgreen;">■</span> aadA1	<span style="color: brown;">■</span> rmtB
<span style="color: yellow;">■</span> GES-11	<span style="color: lightpurple;">■</span> aadB	<span style="color: purple;">■</span> rmtC
<span style="color: green;">■</span> VIM-1	<span style="color: brightgreen;">■</span> aphA6	<span style="color: yellowgreen;">■</span> IMP-1
<span style="color: blue;">■</span> OXA sub-1	<span style="color: brown;">■</span> gyrA	<span style="color: green;">■</span> IMP-2
<span style="color: purple;">■</span> OXA sub-2	<span style="color: mediumpurple;">■</span> parC	<span style="color: lightpurple;">■</span> VEB
<span style="color: darkpurple;">■</span> OXA sub-3	<span style="color: darkred;">■</span> qnrA	<span style="color: orange;">■</span> PER
<span style="color: grey;">■</span> OXA sub-4	<span style="color: grey;">■</span> carO	
<span style="color: lightblue;">■</span> RTG-4	<span style="color: darkbrown;">■</span> adeR	

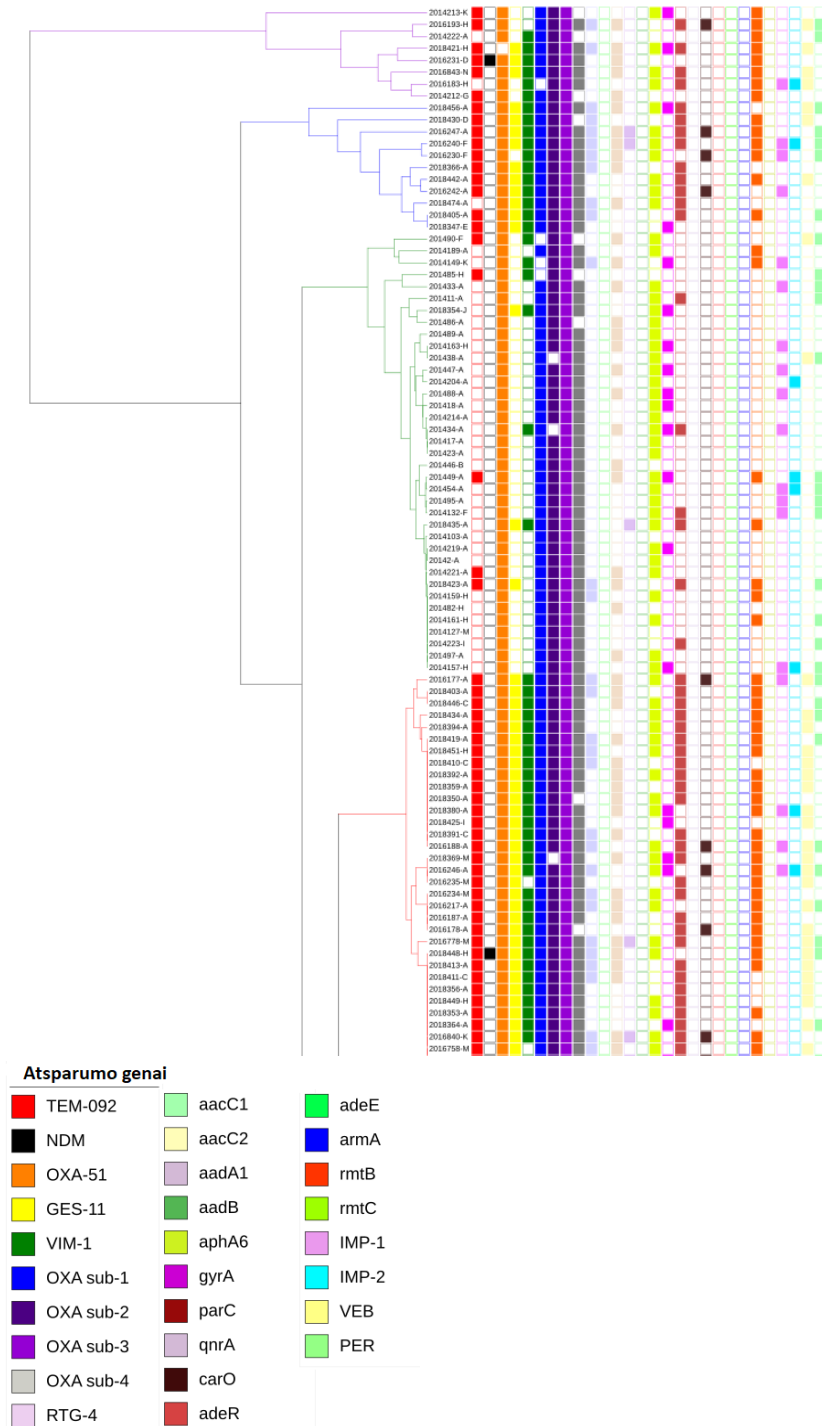
# Priedas 1 (tęsinys).

## Bendras BOX-PGR dendrogramos vaizdas



## Priedas 2. *Acinetobacter* spp. MLVA-8 dendrograma

### Klasteris 1–4

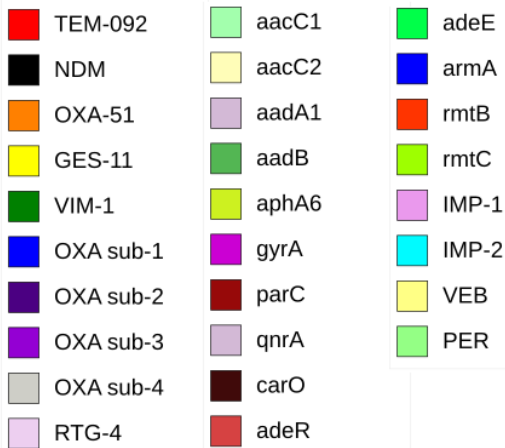


**Priedas 2. (tęsinys).**

**Klasteris 5.**

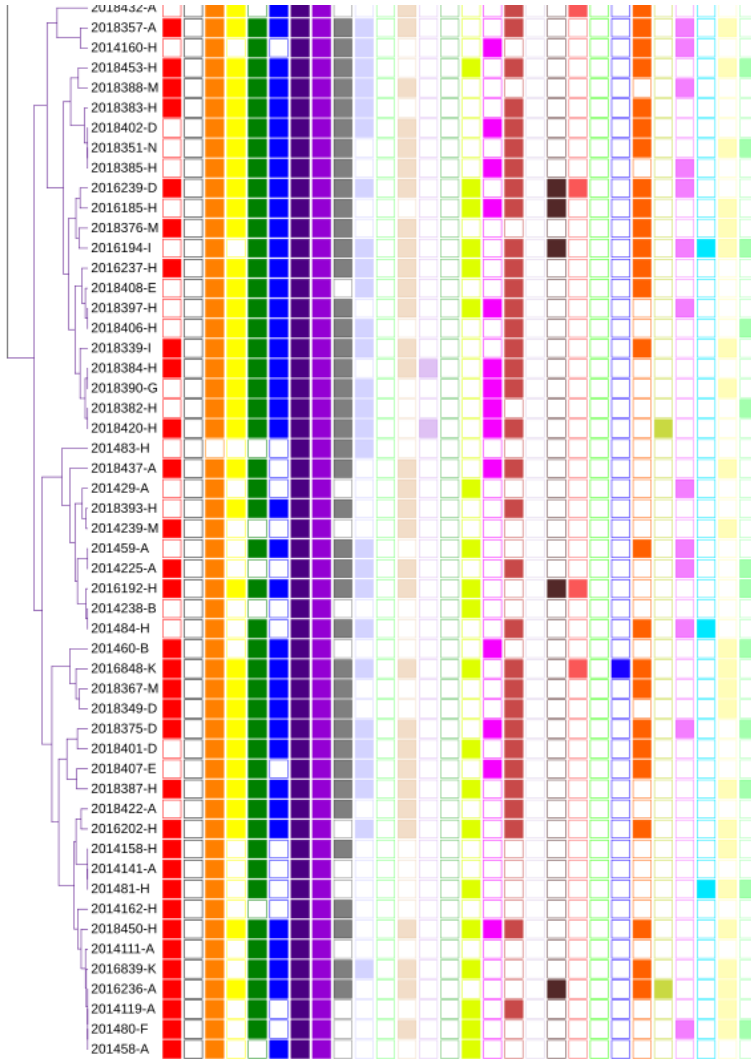


**Atsparumo genai**



**Priedas 2. (tęsinys).**

**Klasteris 6.**

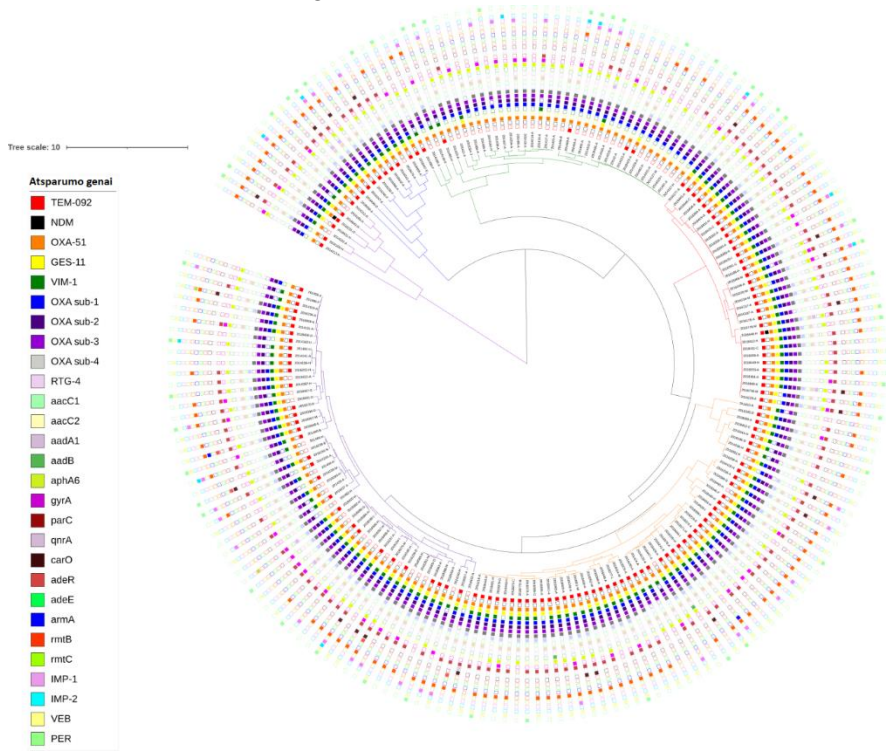


**Atsparumo genai**

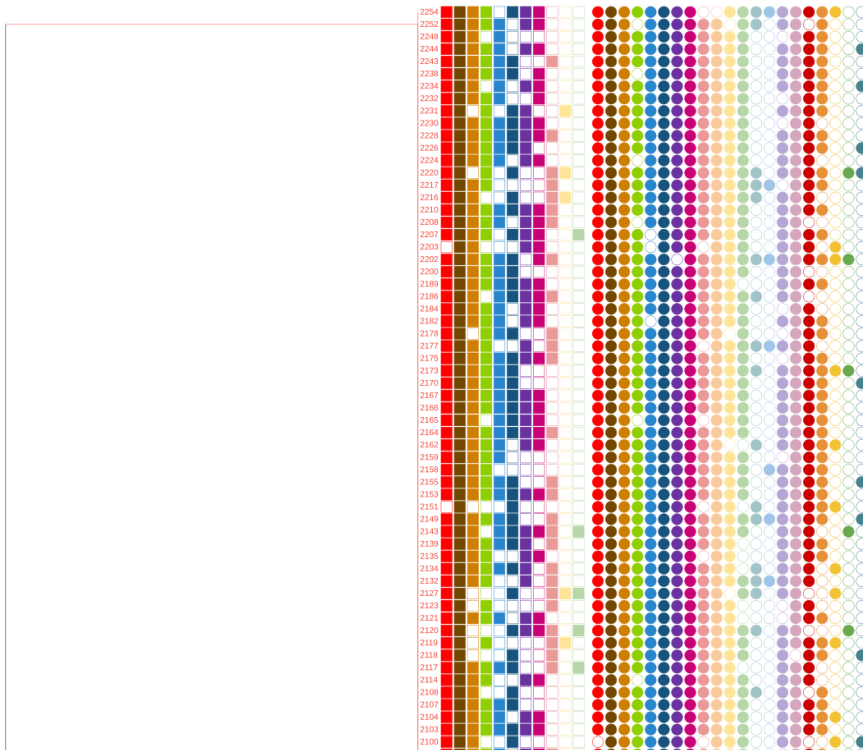
<span style="color: red;">■</span> TEM-092	<span style="color: lightgreen;">■</span> aacC1	<span style="color: green;">■</span> adeE
<span style="color: black;">■</span> NDM	<span style="color: yellow;">■</span> aacC2	<span style="color: blue;">■</span> armA
<span style="color: orange;">■</span> OXA-51	<span style="color: purple;">■</span> aadA1	<span style="color: red;">■</span> rmtB
<span style="color: yellow;">■</span> GES-11	<span style="color: green;">■</span> aadB	<span style="color: lightgreen;">■</span> rmtC
<span style="color: darkgreen;">■</span> VIM-1	<span style="color: yellowgreen;">■</span> aphA6	<span style="color: pink;">■</span> IMP-1
<span style="color: blue;">■</span> OXA sub-1	<span style="color: magenta;">■</span> gyrA	<span style="color: cyan;">■</span> IMP-2
<span style="color: purple;">■</span> OXA sub-2	<span style="color: brown;">■</span> parC	<span style="color: yellow;">■</span> VEB
<span style="color: darkpurple;">■</span> OXA sub-3	<span style="color: grey;">■</span> qnrA	<span style="color: lightgreen;">■</span> PER
<span style="color: grey;">■</span> OXA sub-4	<span style="color: black;">■</span> carO	
<span style="color: lightpurple;">■</span> RTG-4	<span style="color: red;">■</span> adeR	

## Priedas 2. (tęsinys).

Bendras MLVA-8 dendrogramos vaizdas.



### Priedas 3. *E. coli* filogenetinė grupė A



#### Virulentiškumo genai

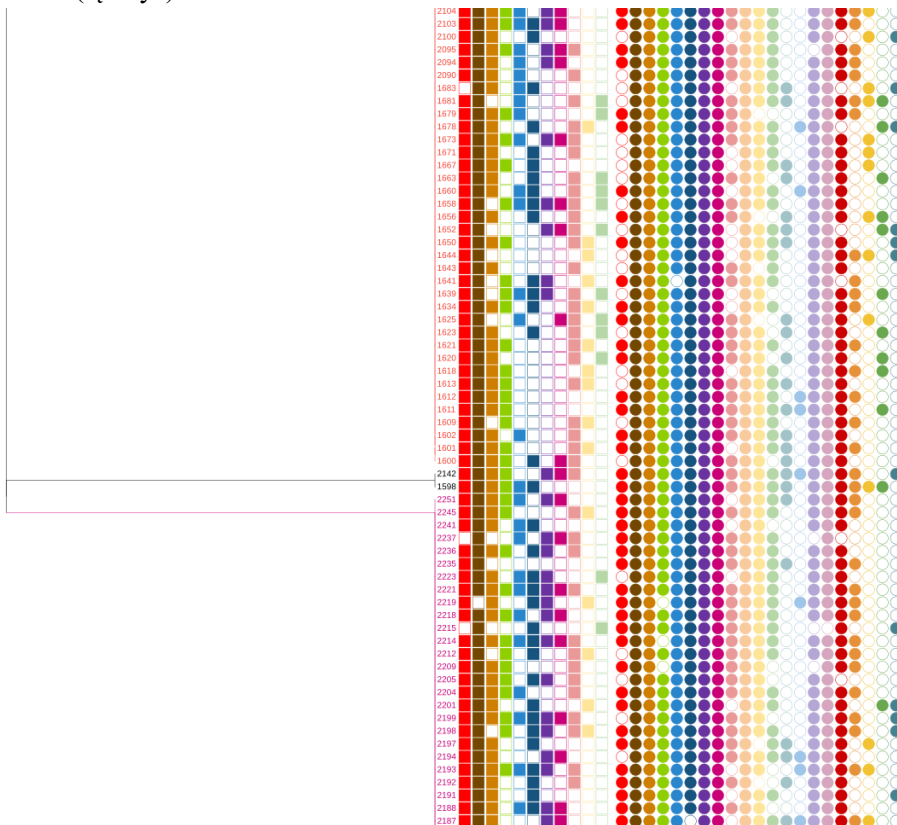
- fyuA
- fimH
- traT
- sat
- sfaD/E
- iroN
- hlyA
- cnf1
- kpsMTII
- afaB/C
- papC

#### Atsparumo genai

- KPC
- fosA
- sul2
- sul3
- strA
- strB
- TEM
- tetA
- cmv-2
- NDM
- aadA
- sul1
- CTX-M-1
- CTX-M-2
- CTX-M-9
- AIM
- IMP
- VIM
- tetB
- tetC
- aac3(IV)



### Priedas 3 (tęsinys).



#### Virulentiškumo genai

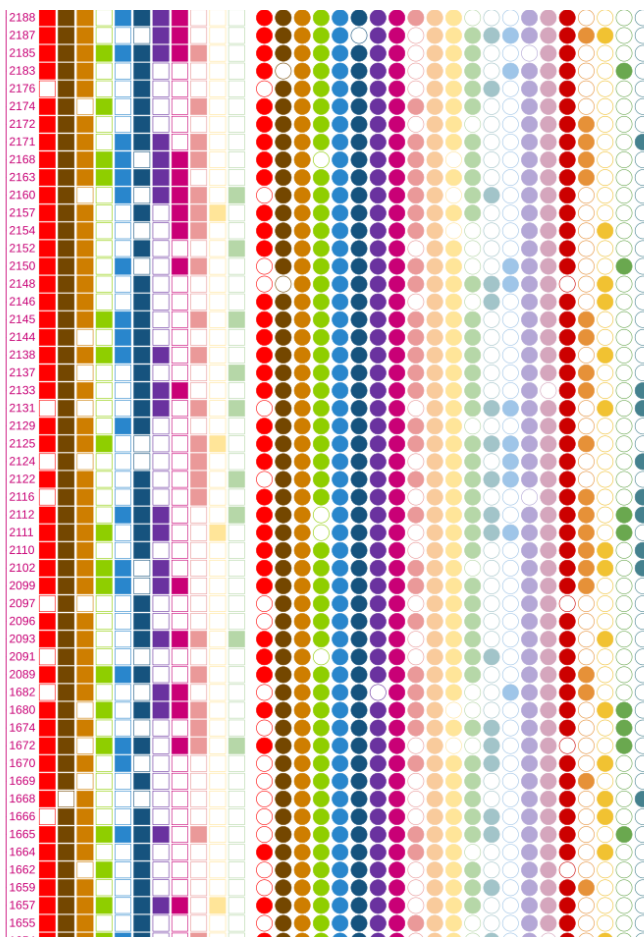
- fyuA
- fimH
- traT
- sat
- sfaD/E
- iroN
- hlyA
- cnf1
- kpsMTII
- afaB/C
- papC

#### Atsparumo genai

- KPC
- fosA
- sul2
- sul3
- strA
- strB
- TEM
- tetA
- cmy-2
- NDM
- aadA

- sul1
- CTX-M-1
- CTX-M-2
- CTX-M-9
- AIM
- IMP
- VIM
- tetB
- tetC
- aac3(IV)

### Priedas 3 (tęsinys).



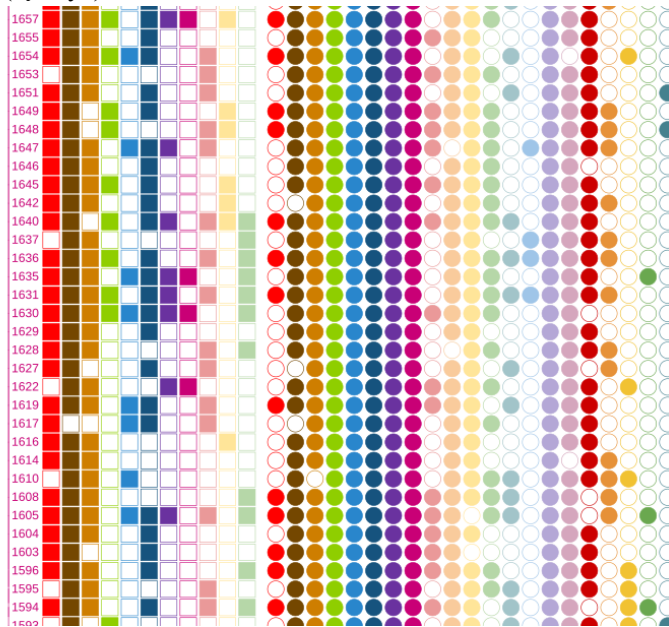
#### Virulentiškumo genai

- fyuA**
- fimH**
- traT**
- sat**
- sfaD/E**
- iroN**
- hlyA**
- cnf1**
- kpsMTII**
- afaB/C**
- papC**

#### Atsparumo genai

- KPC**
- fosA**
- sul2**
- sul3**
- strA**
- strB**
- TEM**
- tetA**
- cmx-2**
- NDM**
- aadA**
- sul1**
- CTX-M-1**
- CTX-M-2**
- CTX-M-9**
- AIM**
- IMP**
- VIM**
- tetB**
- tetC**
- aac3(IV)**

### Priedas 3 (tęsinys).



#### Virulentiškumo genai

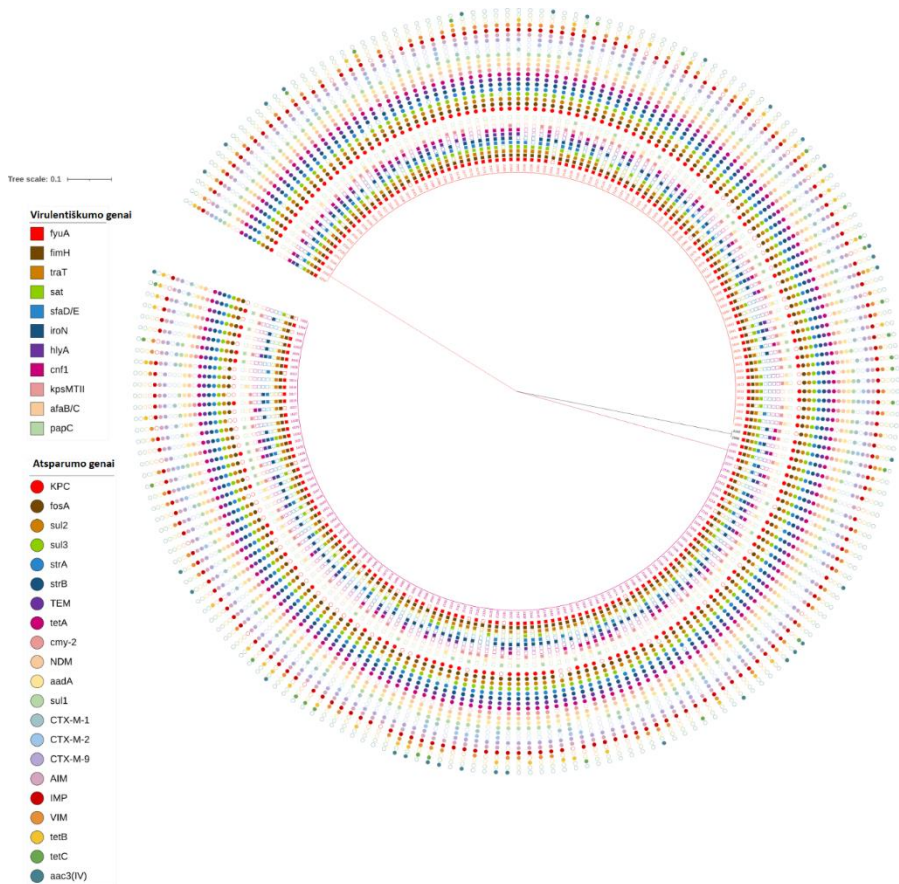
- fyuA
- fimH
- traT
- sat
- sfaD/E
- iroN
- hlyA
- cnf1
- kpsMTII
- afaB/C
- papC

#### Atsparumo genai

- KPC
- fosA
- sul2
- sul3
- strA
- strB
- TEM
- tetA
- cmy-2
- NDM
- aadA
- sul1
- CTX-M-1
- CTX-M-2
- CTX-M-9
- AIM
- IMP
- VIM
- tetB
- tetC
- aac3(IV)

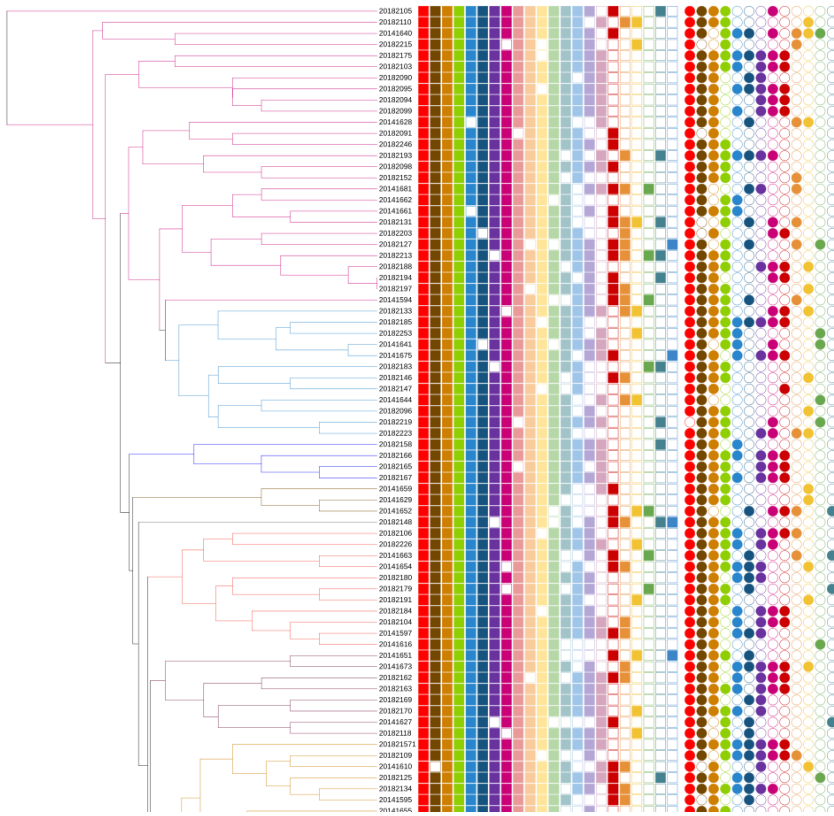
### Priedas 3 (tęsinys).

Bendras *E. coli* filogenetinės grupės A vaizdas.



## Priedas 4. *E. coli* BOX-PGR dendrograma

### Klasteriai 1–7



#### Virulentiškumo genai

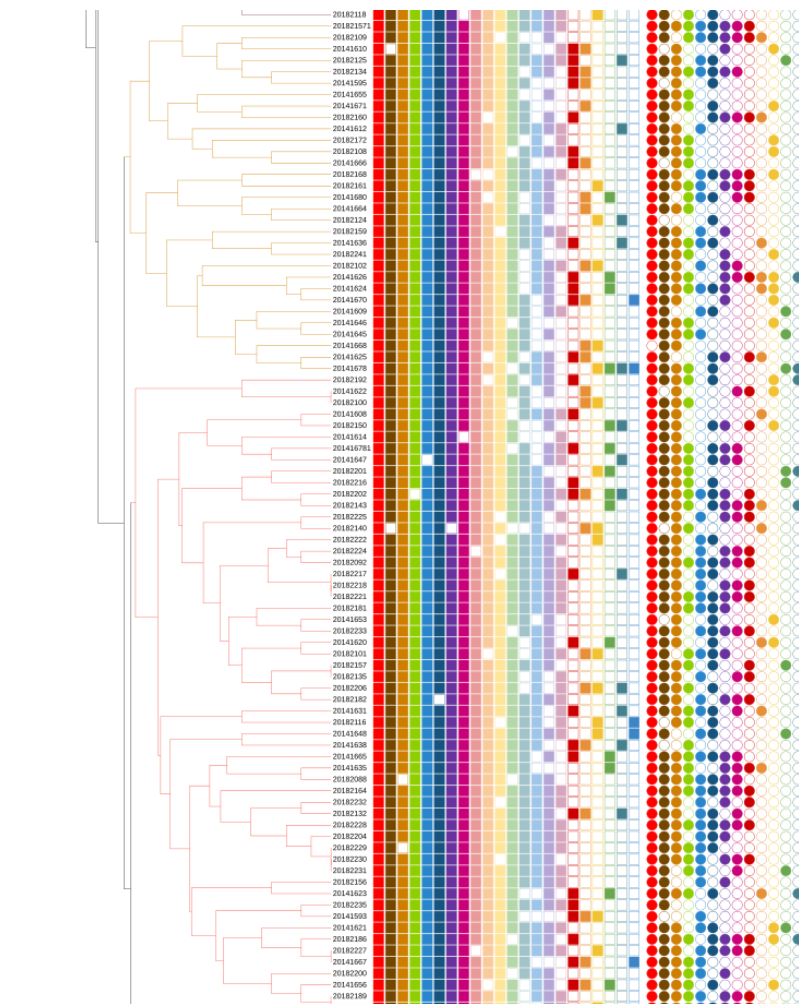
- fyuA
- fimH
- traT
- sat
- sfaD/E
- iroN
- hlyA
- cnf1
- kpsMTII
- afaB/C
- papC

#### Atsparumo genai

- KPC
- fosA
- sul2
- sul3
- strA
- strB
- TEM
- tetA
- cmy-2
- NDM
- aadA
- sul1
- CTX-M-1
- CTX-M-2
- CTX-M-9
- AIM
- IMP
- VIM
- tetB
- tetC
- aac3(IV)

## Priedas 4. (tęsinys)

### Klasteriai 8–9



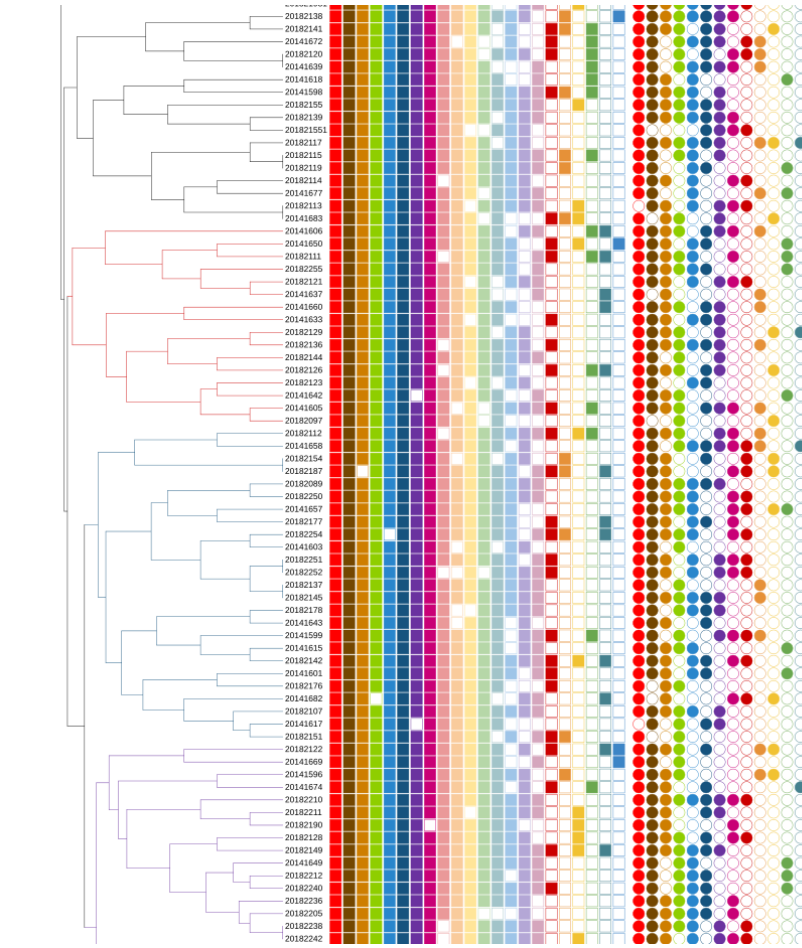
#### Virulentiškumo genai

- fyuA*
- fimH*
- traT*
- sat*
- sfaD/E*
- iroN*
- hlyA*
- cnf1*
- kpsMTII*
- afaB/C*
- papC*

#### Atsparumo genai

- KPC
- fosA*
- sul2*
- sul3*
- strA*
- strB*
- TEM
- tetA*
- cmy-2*
- NDM
- aadA*
- sul1*
- CTX-M-1
- CTX-M-2
- CTX-M-9
- AIM
- IMP
- VIM
- tetB*
- tetC*
- aac3(IV)*

**Priedas 4. (tęsinys)**  
**Klasteriai 10–13**



**Virulentiškumo genai**

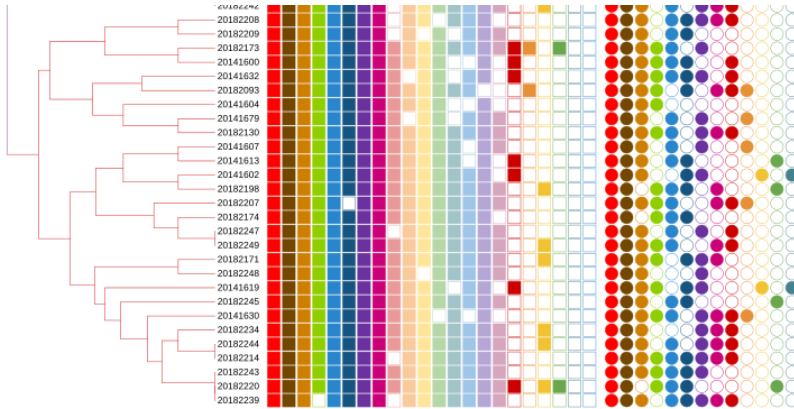
- fyuA**
- fimH**
- traT**
- sat**
- sfaD/E**
- iroN**
- hlyA**
- cnf1**
- kpsMTII**
- afaB/C**
- papC**

**Atsparumo genai**

- KPC**
- fosA**
- sul2**
- sul3**
- strA**
- strB**
- TEM**
- tetA**
- cmy-2**
- NDM**
- aadA**
- sul1**
- CTX-M-1**
- CTX-M-2**
- CTX-M-9**
- AIM**
- IMP**
- VIM**
- tetB**
- tetC**
- aac3(IV)**

## Priedas 4. (tęsinys)

### Klasteris 14



#### Virulentiškumo genai

	fyuA
	fimH
	traT
	sat
	sfaD/E
	iroN
	hlyA
	cnf1
	kpsMTII
	afaB/C
	papC

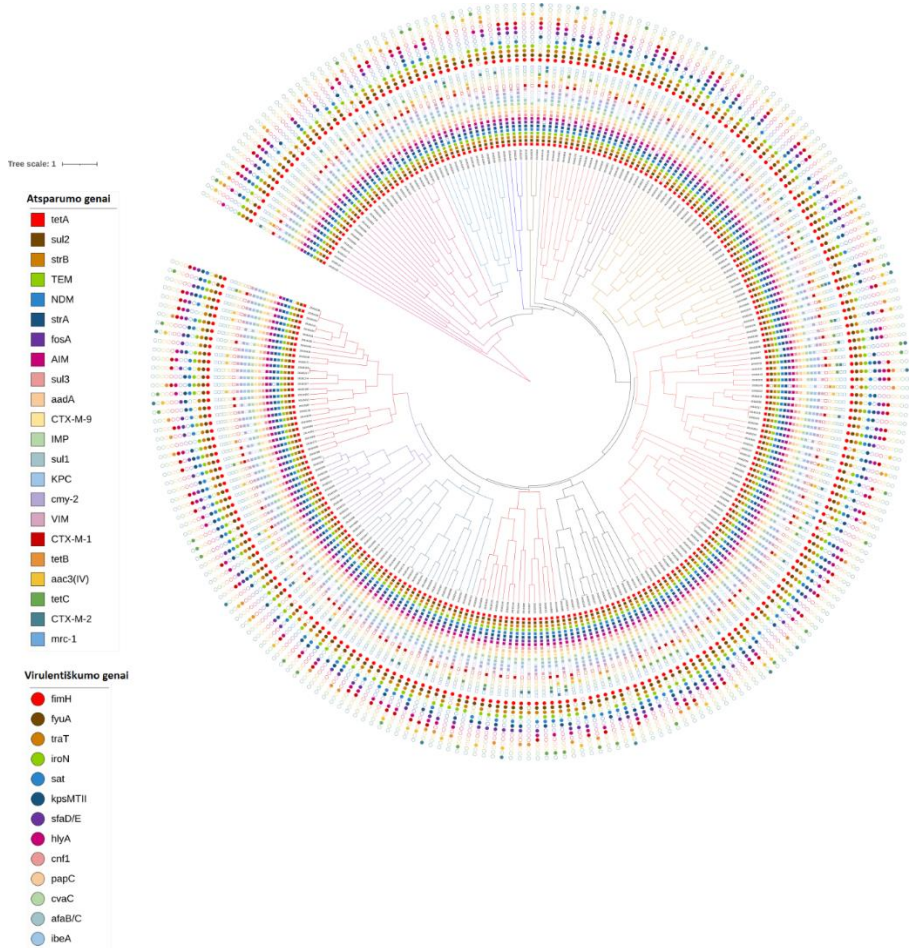
#### Atsparumo genai

	KPC		sul1
	fosA		CTX-M-1
	sul2		CTX-M-2
	sul3		CTX-M-9
	strA		AIM
	strB		IMP
	TEM		VIM
	tetA		tetB
	cmv-2		tetC
	NDM		aac3(IV)
	aadA		



## Priedas 4. (tęsinys)

*E. coli* BOX-PGR dendrogramos bendras vaizdas.



## SUMMARY

### Introduction

The use of antibiotics for clinical purposes, agriculture, and other human economic activities has been ongoing for decades. Such widespread use of antibiotics has led to the development and spread of antimicrobial-resistant bacteria in clinical and other areas. A prevalent group amongst these antimicrobial-resistant bacteria are the gram-negative bacteria (causative agents of nosocomial infections) which have exhibited a rapid progression in antibiotic resistance mechanisms and a wide spread of resistant strains in recent years. In contrast, the spread of antibiotic-resistant gram-positive bacteria is declining (ECDC, 2020). In the clinical environment in Lithuania, the greatest risk is from antibiotic resistant *Acinetobacter* spp. and *Escherichia coli* bacteria.

*Acinetobacter* spp. are important opportunistic pathogens worldwide. Their contribution to nosocomial infections has increased over the years, and many outbreaks in hospitals involving *Acinetobacter* spp. have been reported. The most dangerous property of *Acinetobacter* spp. is their ability to rapidly develop resistance to antibiotics (Poirel et al., 2011), and people with weakened immune systems, chronic lung disease, or diabetes may be more susceptible to infections with *Acinetobacter*; this applies especially to patients with a prolonged hospital stay, those with open wounds, or any person with urinary catheters. *Acinetobacter* can spread to susceptible individuals through person-to-person contact or contact with contaminated surfaces.

*Acinetobacter* spp. have become resistant to almost all antimicrobial agents currently available, including aminoglycosides, quinolones, and broad-spectrum  $\beta$ -lactams. *A. baumannii* is known to be the most resistant species, and there are important differences in antimicrobial susceptibility between *A. baumannii* and other species of the genus. All the known mechanisms leading to antibiotic resistance, including enzymatic degradation, altered targets, and active efflux, have been identified in *A. baumannii*. Genes associated with resistance can be located on the chromosome or on plasmids. The mechanisms and epidemiology of carbapenem-resistant *A. baumannii* have been reviewed by Poirel and Nordmann (2006).

*Escherichia coli* is an opportunistic pathogen and the most frequently isolated organism in patients with bacteraemia (Mora-Rillo et al., 2015). In some cases, *E. coli* infections can result in death (Owrangi et al., 2018). *E. coli* strains that induce extraintestinal diseases and survive in the bloodstream are classified as extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (Russo & Johnson,

2003). The most common extraintestinal site colonised by these bacteria is the urinary tract, which is a common source of bloodstream infection (Micenková et al., 2017).

*E. coli* is resistant to a large group of relevant antimicrobial agents, including aminoglycosides, polymyxins, and broad-spectrum  $\beta$ -lactams. Therefore, all the known mechanisms of antibiotic resistance, including enzymatic degradation, altered targets, and active efflux, can be found in *E. coli* isolates. Genes associated with resistance can be located on chromosomes or on plasmids. They can be transmitted between isolates or transferred to other *Enterobacteriaceae* species (Blake et al., 2003). Moreover, ExPEC strains may have several virulence factors such as host defence subverting mechanisms, iron acquisition systems, toxins, and adhesion, all of which may be important factors in host infection. Furthermore, bacteria without virulence factor-coding genes in the bacterial chromosome may acquire them by transmission from bacteria with virulence factor-coding genes because these genes are usually located on mobile genetic elements, such as pathogenicity islands or plasmids (Dale & Woodford, 2015). Several virulence factors may facilitate infection and colonisation of a host by bacterial cells, and have been associated with bloodstream infections (Mora-Rillo et al., 2015). However, predictions of the initial severity based on the presence of bacterial virulence factors are not fully accurate (Jauréguy et al., 2007).

### **Aim of dissertation**

This study aimed to evaluate the characteristics and spread dynamics of *Acinetobacter* spp. and *E. coli* bacteria that cause nosocomial infections and/or epidemiological outbreaks in different years of study and in different healthcare institutions of Lithuania.

### **Goals of dissertation**

1. To classify isolates of the studied species into groups based on relatedness using rep-PCR and MLVA genotyping methods.
2. To identify resistance and virulence determinants for particular bacterial species using PCR.
3. To determine phylogenetic groups in tested *E. coli* isolates.
4. To evaluate the correlation between the experimental results obtained using genotyping methods and those obtained from the study of resistance determinants of antibacterial agents.

5. To evaluate the correlation between the experimental results obtained using genotyping methods and the results obtained from the study of virulence genes and their prevalence.
6. To evaluate the resistance, virulence determinants, and phylogenetic group emergence dependency on different years and different hospitals where isolates were collected.
7. To evaluate the possible distribution of the genotypic profiles in Lithuanian hospitals.

### **Scientific novelty**

The present study is the first molecular epidemiological study in Lithuania that covers the evaluation of resistance of both *Acinetobacter* spp. and *E. coli* to various antibiotic groups, as well as virulence gene identification, phylogenetic isolation, application, and analysis of different genotyping methods. This study describes 194 *Acinetobacter* spp. and 256 multidrug-resistant *E. coli* isolates from hospitalised patients diagnosed with sepsis. This is the first study of this kind in Lithuania, in which only isolates with multidrug resistance from blood or cerebrospinal fluid were selected.

Antibiotic susceptibility genes, which have been minimally studied in Lithuania, have been characterised in this study. These include the OXA group  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases, and carbapenemases. Only a few genes of the OXA group have been identified in Lithuania so far, and genes encoding metallo- $\beta$ -lactamases and carbapenemases are frequently detected in Europe but have not yet been identified in Lithuania.

Resistance to aminoglycoside-, quinolone-, and polymyxin-encoding genes have not been extensively studied in Europe and have never been identified in Lithuania prior to this study. Similarly, regulatory genes for efflux pumps, which are increasingly being detected worldwide, were identified in Lithuania for the first time.

Genes encoding virulence factors responsible for the invasion and pathogenesis of ExPEC strains in the human body, have also been identified for the first time in Lithuania. Phylogenetic groups of *E. coli* isolates from different Lithuanian hospitals were also identified in this study, which further supplemented the results of previous studies in Lithuania.

*Acinetobacter* spp. and *E. coli* isolates from different Lithuanian hospitals were described in detail by different genotyping methods, with a strong focus on the analysis of the genotypic profiles and the investigation of possible associations between the isolation year and the particular hospital. This genotypic assessment is the first of its kind in Lithuania and complements

global data on the epidemiology of *Acinetobacter* spp. and *E. coli*, the potential for further spread, and the development of prevention programs to combat infections caused by these bacteria.

### **Defensive statements**

- Changes in the resistance and virulence determinants of clinical *Acinetobacter* spp. and *E. coli* isolates depend on the year of isolation and origin in Lithuanian hospitals.
- The distribution of phylogenetic groups among tested isolates of *E. coli* indicates a possible degree of infection virulence.
- Rep-PCR genotyping profiles show the relatedness of isolates belonging to genetically similar groups (clusters) with a distinctive diversity of resistance and virulence genes.
- The variability of MLVA profiles varies depending on the year of isolation and the hospitals from which the isolates originated, and the variation in MLVA profiles depends on the relatedness of the isolates.

## MATERIALS AND METHODS

### **Collection of clinical *E. coli* and *Acinetobacter* spp. isolates, identification, and genomic DNA extraction**

A total of 256  $\beta$ -lactam-resistant *E. coli* isolates and 194 isolates of *Acinetobacter* spp. were selected from patients with bloodstream infections at different healthcare institutions in Lithuania. *E. coli* samples were collected in 2014 and 2018 at 12 different healthcare institutions (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, and XII) in Lithuania and *Acinetobacter* spp. samples were collected in 2014, 2016, and 2018 from 14 different healthcare institutions (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV). All isolates were cultivated by hospitals on blood agar for 17–24 h and then sent to National Public Health Surveillance Laboratory for final antibiotic resistance confirmation and pure culture identification using a MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Billerica, MA, USA). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics was confirmed using the disc diffusion method on Müller–Hinton agar and an automated VITEK®2 system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Antibiotic resistance data were evaluated using the EUCAST *E. coli* and *Acinetobacter* spp. breakpoints, and commercial disks of the following antibiotics were used: ampicillin (10  $\mu$ g), amoxicillin/clavulanic acid (20/10  $\mu$ g), meropenem (10  $\mu$ g), cefuroxime (30  $\mu$ g), amikacin (30  $\mu$ g), ampicillin/sulbactam (10/10  $\mu$ g), cefotaxime (5  $\mu$ g), piperacillin/tazobactam (30/6  $\mu$ g), ceftazidime (10  $\mu$ g), ciprofloxacin (5  $\mu$ g), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75  $\mu$ g), gentamicin (10  $\mu$ g), and imipenem (10  $\mu$ g). The colistin E-test was also used (BioMaxima, Lublin, Poland).

To extract genomic DNA, the isolates were cultivated on tryptic soy agar at 30 °C for 12 h. Genomic DNA was extracted using the GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol.

### **Characterization of genes associated with antibiotic resistance and virulence**

Genes associated with antibiotic resistance and virulence were detected after the collection and identification of *Acinetobacter* spp. and *E. coli* isolates. A total of 29 antibiotic resistance genes and 13 bacterial virulence genes were identified via PCR in *E. coli* isolates and 28 antibiotic resistance genes in *Acinetobacter* spp. isolates, using primers reported in previously

published studies (**Table 1** and **Table 2**). The PCR reaction mixture had a total volume of 50  $\mu$ L, which included DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.25  $\mu$ M of each primer, and 1  $\mu$ L of *E. coli* or *Acinetobacter* spp. genomic DNA. The PCR conditions were established according to previously published protocols. After PCR analysis, the amplification products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis.

**Table 1.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *Acinetobacter* spp. bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference	
<b>Resistance Gene</b>					
Aminoglycoside -modifying enzymes (AMEs) regulation genes	<i>aacC1 - F</i>	ATGGGCATCATTTCGCACATGT AGG	750	Hujer et al., 2006	
	<i>aacC1 - R</i>	TTAGGTGGCGGTACTTGGGGTC			
	<i>aacC2 - F</i>	ATGCATACGCGGAAGGCAAT AAC	800		
	<i>aacC2 - R</i>	CTAACCGGAAGGCTCGCAAG			
	<i>aadB - F</i>	ATGGACACAACGCAGGTCCG	495		
	<i>aadB - R</i>	TTAGGCCGCATATCGCGACC			
	<i>aadA1 - F</i>	ATGAGGGAAGCGGTGATCG	624		
	<i>aadA1 - R</i>	TTAGGCCGCATATCGCGACC			
	<i>aphA6 - F</i>	ATGGAATTGCCCAATATTATTC	736		
	<i>aphA6 - R</i>	TCAATTCAATTCATCAAGTTT TA			
	<i>armA - F</i>	ATTCTGCCTATCCTAATTGG	315		Doi et al., 2007
	<i>armA - R</i>	ACCTATACTTTATCGTCGTC			
	<i>rmtB - F</i>	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA	173		
	<i>rmtB - R</i>	ATGCAATGCCGCGCTCGTAT			
<i>rmtC - F</i>	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	711			
<i>rmtC - R</i>	ATCCCAACATCTCTCCCACT				
Fluoroquinolone resistance- determining regions (QRDR)	<i>gyrA - F</i>	AAATCTGCCCGTGTGCTTGGT	285	Hujer et a., 2006	
	<i>gyrA - R</i>	GCCATACCTACGGCGATACC			
	<i>parC - F</i>	AAACCTGTTCAGCGCCGCATT	276		
	<i>parC - R</i>	AAAGTTGTCTTGCCATTCACT			
	<i>qnrA - F</i>	GGGTATGGATATTATTGATAA AG	661		
<i>qnrA - R</i>	CTAATCCGGCAGCACTATTA				
Efflux pumps regulation genes	<i>adeR - F</i>	ATGTTTGATCATTCTTTTCTT TTG	687	Hujer et al., 2006	
	<i>adeR - R</i>	GTATAAAGTTTACAATTAATT			
	<i>adeE - F</i>	ATGTTGTCGAGTTTTTTTATG CACG	550		
	<i>adeE - R</i>	CAATTTATGGTTTTTCCGTTTT ACT			
$\beta$ -lactams resistance genes	<i>blacarO - F</i>	ATGAAAGTATTACGTGTTTTA GTG	294	Hujer et al., 2006	
	<i>blacarO - R</i>	CCACATTTGAAGATGACCATT			

**Table 1 con.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *Acinetobacter* spp. bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference
	<i>bla</i> GES-11 - F	ATGCGCTTCATTACGCAC	863	Moubareck et al., 2009
	<i>bla</i> GES-11 - R	CTATTGTCCGTGCTCAGGA		
	<i>bla</i> IMP-1 - F	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG C	591	Gales et al., 2003
	<i>bla</i> IMP-1 - R	GAACAACCAAGTTTTGCCTTAC C		
	<i>bla</i> IMP-2 - F	TGCCGCGGGAGCGGTTTG	261	
	<i>bla</i> IMP-2 - R	GCCCTTTAACAGCCTGTTCC		
	<i>bla</i> GES-11 - F	ATGCGCTTCATTACGCAC	863	Moubareck et al., 2009
	<i>bla</i> GES-11 - R	CTATTGTCCGTGCTCAGGA		
	<i>bla</i> IMP-1 - F	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG C	591	Gales et al., 2003
	<i>bla</i> IMP-1 - R	GAACAACCAAGTTTTGCCTTAC C		
	<i>bla</i> IMP-2 - F	TGCCGCGGGAGCGGTTTG	261	
	<i>bla</i> IMP-2 - R	GCCCTTTAACAGCCTGTTCC		
	<i>bla</i> NDM - F	GAAGCTGAGCACCAGATTAG	761	Shokri et al., 2017
	<i>bla</i> NDM - R	TGCGGGCCGTATGAGTGATT		
	<i>bla</i> OXA subgroup-1 - F ( <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-27</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-49</sub> )	TCGGATTGGAGAACCAGAAA A	513	
	<i>bla</i> OXA subgroup-1 - R	GTATAGATGCCGGCATTCTG A		
	<i>bla</i> OXA subgroup-2 - F ( <i>bla</i> <sub>OXA-24</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-25</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-26</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-40</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-72</sub> )	GATGAAGCTCAAACACAGGG	246	Pasterán et al., 2006
	<i>bla</i> OXA subgroup-2 - R	ATGATTCCAAGATTTTCTAGC G		
	<i>bla</i> OXA subgroup-3 F ( <i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-64</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-65</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-68</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-69</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-70</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-71</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-75</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-76</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-77</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-78</sub> )	CTCGTGCTTCGACCGAGTAT	686	
	<i>bla</i> OXA subgroup-3 R	GCTGAACAACCCATCCAGTT		
	<i>bla</i> OXA subgroup-4 F ( <i>bla</i> <sub>OXA-58</sub> )	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	504	
	<i>bla</i> OXA subgroup-4 R	TACGACGTGCCAATTCTTGA		
	<i>bla</i> OXA-51 - F	ATGAACATTAAAGCACTC	1107	Turton et al., 2006
	<i>bla</i> OXA-51 - R	CTATAAAATACCTAATTGTTC		
	<i>bla</i> PER-1 - F	ATGAATGTCATTATAAAAGC	715	Poirel et al., 2005
	<i>bla</i> PER-1 - R	AATTTGGGCTTAGGGCAGAA		



**Table 1 con.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *Acinetobacter* spp. bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference
	<i>blaRTG-4 - F</i>	CTCACGCTATCATTAATGC	450	Potron et al., 2009
	<i>blaRTG-4 - R</i>	TCAAACGAGGCGTCTGTCTC TG		
	<i>blaTEM-92 - F</i>	ATAAAATTCTTGAAGACGAA	310	Endimiani et al., 2007
	<i>blaTEM-92 - R</i>	ATATGAGTAAGCTTGGTCTGA CAG		
	<i>blaVEB-1 - F</i>	GGAACAACCTTGACGATTGA	542	Pasterán et al., 2006
	<i>blaVEB-1 - R</i>	CCCTGTTTTATGAGCAACAA		
	<i>blaVIM-1 - F</i>	AGTGGTGAGTATCCGACAG	261	Tsakris et al., 2000
	<i>blaVIM-1 - R</i>	ATGAAAGTGCCTGGAGAC		
<b>MLVA- 8 Genes</b>				
MLVA genotyping genes	<i>Abaum_3530-L</i>	TGCAACCGGTATTCTAGGAAC	162-642	Pourcel et al., 2011
	<i>Abaum_3530-R</i>	CCTTGAACAACATCGATTAC TGGA		
	<i>Abaum_3002-L</i>	GACTGAAGCAAGACTAAAAC GT	428-596	
	<i>Abaum_3002-R</i>	TCTGGGCAGCTTCTTCTTGAG C		
	<i>Abaum_2240-L</i>	CCCGCAGTACATCATGGTTC	204-538	
	<i>Abaum_2240-R</i>	AGAACATGTATACGCAACTG		
	<i>Abaum_1988-L</i>	GGCAAGGCATGCTCAAGGGC C	136-447	
	<i>Abaum_1988-R</i>	CAGTAGACTGCTGGTTAATGA G		
	<i>Abaum_0826-L</i>	TGACTACTGAAACAGTTTTTG	415-649	
	<i>Abaum_0826-R</i>	ATGATTGTACCGAGTAAAAG A		
	<i>Abaum_0845-L</i>	AATTTAATTCCAAATTGCTC C	129-346	
	<i>Abaum_0845-R</i>	ACTTAAAATCGCATTTTTATC A		
	<i>Abaum_2396-L</i>	CAAGTCCAATCAACTCATGAT G	147-315	
	<i>Abaum_2396-R</i>	CTCCTGTAAGTGTGTTTCAGC C		
	<i>Abaum_3468-L</i>	CAGAAGTCACTGCATCTGCA AC	350-429	
	<i>Abaum_3468-R</i>	CGGTTGAAATTTTTATAAT GAAG		

**Table 2.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *E. coli* bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference	
<b>Resistance Genes</b>					
β-lactams resistance genes	<i>blaCMY-2 - F</i>	CAATGTGTGAGAAGCAGTC	1432	Li et al., 2008	
	<i>blaCMY-2 - R</i>	CGCATGGGATTTTCCTTGCTG			
	<i>Multiplex II CTX-M group 1 - F</i>	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	Alyamani et al., 2017	
	<i>Multiplex II CTX-M group 1 - R</i>	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT			
	<i>Multiplex II CTX-M group 2 - F</i>	CGTTAACGGCACGATGAC	404		
	<i>Multiplex II CTX-M group 2 - R</i>	CGATATCGTTGGTGGTRCCA			
	<i>Multiplex II CTX-M group 9 - F</i>	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561		
	<i>Multiplex II CTX-M group 9 - R</i>	TGATTCTCGCCGCTGAAG			
	<i>Multiplex III CTX-M group 8/25 - F</i>	AACRRCAGACGCTCTAC	326		
	<i>Multiplex III CTX-M group 8/25 - R</i>	TCGAGCCGGAASGTGYAT			
	<i>Multiplex SHV - F</i>	GCCGCTTGAGCAAATTA AAC	713		
	<i>Multiplex SHV - R</i>	ATCCCGCAGATAAATCACCAC			
	<i>Multiplex I TEM - F</i>	CATTCCGTGTCGCCCTTATT C	800		
	<i>Multiplex I TEM - R</i>	CGTTCATCCATAGTTGCCTGA C			
	<i>blaAIM - F</i>	CTGAAGGTGTACGGAAACAC	322		Poirel et al., 2011
	<i>blaAIM - R</i>	GTTTCGGCCACCTCGAATTG			
<i>blaIMP - F</i>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCT C	232			
<i>blaIMP-R</i>	GGTTTAAAYAAAACAACCACC				
<i>blaDIM - F</i>	GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG	699			
<i>blaDIM - R</i>	CGTTCGGCTGGATTGATTG				

**Table 2 con.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *E. coli* bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference	
	<i>blaGIM - F</i>	TCGACACACCTTGGTCTGAA	477		
	<i>blaGIM - R</i>	AACTTCCAACCTTGGCCATGC			
	<i>blaSIM - F</i>	TACAAGGGATTTCGGCATCG	570		
	<i>blaSIM - R</i>	TAATGGCCTGTTCCCATGTG			
	<i>blaSPM - F</i>	AAAATCTGGGTACGCAAACG	271		
	<i>blaSPM - R</i>	ACATTATCCGCTGGAACAGG			
	<i>blaVIM - F</i>	GATGGTGTGGTGCATA	390		
	<i>blaVIM - R</i>	CGAATGCGCAGACCAG			
	<i>blaKPC - F</i>	TGTCACTGTATCGCCGTC	1011		Zhang et al., 2016
	<i>blaKPC - R</i>	CTCAGTGCTCTACAGAAAAC C			
	<i>blaNDM - F</i>	GTCTGGCAGCACACTTCCTA	465		
	<i>blaNDM - R</i>	AGTGCTCAGTGTCCGCATC			
Fosfomycin resistance gene (glutathione S-transferase)	<i>fosA - F</i>	ATCTGTGGGTCTGCCTGTCGT	271	Benzerara et al., 2017	
	<i>fosA - R</i>	ATGCCCGCATAGGGCTTCT			
Aminoglycoside resistance genes	<i>aac(3)IV - F</i>	TGCTGGTCCACAGCTCCTTC	653	Boerlin et al., 2005	
	<i>aac(3)IV - R</i>	CGGATGCAGGAAGATCAA			
	<i>aadA - F</i>	GTGGATGGCGGCCTGAAGCC	525		
	<i>aadA - R</i>	AATGCCCAGTCGGCAGCG			
	<i>strA - F</i>	CCTGGTGATAACGGCAATTC	546		
	<i>strA - R</i>	CCAATCGCAGATAGAAGGC			
	<i>strB - F</i>	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	509		
<i>strB - R</i>	GGATCGTAGAACATATTGGC				
Tetracycline resistance genes	<i>tetA - F</i>	GGCGGTCTTCTCATCATGC	502		
	<i>tetA - R</i>	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA			
	<i>tetB - F</i>	CATTAATAGGCGCATCGCTG	930		
	<i>tetB - R</i>	TGAAGGTCATCGATAGCAGG			

**Table 2 con.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *E. coli* bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference
	<i>tetC</i> - F	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT	888	
	<i>tetC</i> - R	GCCGGAAGCGAGAAGAATCA		
Sulphonamide resistance genes	<i>sul1</i> - F	GTGACGGTGTTCGGCATTCT	779	
	<i>sul1</i> - R	TCCGAGAAGGTGATTGCGCT		
	<i>sul2</i> - F	CGGCATCGTCAACATAACCT	721	
	<i>sul2</i> - R	TGTGCGGATGAAGTCAGCTC		
	<i>sul3</i> - F	GAGCAAGATTTTTGGAATCG	880	
	<i>sul3</i> - R	CATCTGCAGCTAACCTAGGGC TTTGA		
Colistin resistance gene	<i>mcr-1</i> - F	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	Liu et al., 2016
	<i>mcr-1</i> - R	CTTGGTCGGTCTGTA GGG		
<b>Virulence Genes</b>				
Adhesin: Dr binding adhesin	<i>afaB/C</i> - F	GCTGGGCAGCAAAGCTGATAA CTCTC	750	Daigle et al., 1994
	<i>afaB/C</i> - R	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCC GCCG		
Adhesin: P fimbriae	<i>papC</i> - F	GACGGCTGTACTGCAGGGTG TGGCG	328	
	<i>papC</i> - R	ATATCCTTTCTGCAGGGATGC AATA		
Adhesin: S fimbriae	<i>sfaD/E</i> - F	CGGAGGAGTAATTACAAACC TGGCA	410	
	<i>sfaD/E</i> - R	CTCCGGAAGACTGGGTGCAT CTTAC		
Toxin: necrotizing cytotoxic factor type 1	<i>cnf1</i> - F	AAGATGGAGTTTCCTATGCAG GAG	498	Yamamoto et al., 1995
	<i>cnf1</i> - R	CATTCAGAGTCCTGCCCTCAT ATT		
Toxin: $\alpha$ -hemolysin	<i>hlyA</i> - F	AACAAGGATAAGCACTGTTT TGGCT	1177	
	<i>hlyA</i> - R	ACCATATAAGCGGTCATCCCG TCA		

**Table 2 con.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *E. coli* bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference
Toxin: colicin V	<i>cvaC - F</i>	CACACACAAACGGGAGCTGT T	680	Johnson ir Stell, 2000
	<i>cvaC - R</i>	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		
Toxin: Ibe A cell invasin	<i>ibeA - F</i>	AGGCAGGTGTGCGCCGCGTA C	170	
	<i>ibeA - R</i>	TGGTGCTCCGGCAAACCATG C		
Adhesin: type I fimbriae	<i>fimH - F</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTG G	508	
	<i>fimH - R</i>	GCAGTCACCTGCCCTCCGGT A		
Siderophore: yersiniabactin	<i>fyuA - F</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGA A	880	
	<i>fyuA - R</i>	CGCAGTAGGCACGATGTTGT A		
Siderophore: salmocherin	<i>iroN - F</i>	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCC CG	665	
	<i>iroN - R</i>	GACGCCGACATTAAGACGCA G		
Serum resistance: K1 and K5 capsules	<i>kpsMTIII - F</i>	GCGCATTGCTGATACTGTGT TG	272	
	<i>kpsMTIII - R</i>	CATCCAGACGATGAGCACAG		
Toxin: autotransporter toxin	<i>sat - F</i>	GTTGTCTCTGGCTGTTGCG	501	Ananias ir Yano, 2008
	<i>sat - S</i>	AATGATGTTCCCTCCAGAGC		
Serum resistance: complement resistance protein	<i>traT - F</i>	GGTGTGGTGGCATGAGCACA G	290	Johnson ir Stell, 2000
	<i>traT - R</i>	CACGGTTCAGCCATCCCTGA G		
<b>Phylogenetic Groups</b>				
Phylogenetic groups identification genes	<i>arpA - F</i>	ACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	Clermont et al., 2013
	<i>arpA - R</i>	TCTCCCCATACCGTACGCTA		

**Table 2 con.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *E. coli* bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference
	<i>arpA</i> - F	GATTCCATCTTGTCAAAATAT GCC	301	
	<i>arpA</i> - R	GAAAAGAAAAAGAATTCCCA AGAG		
	<i>chuA</i> - F	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	
	<i>chuA</i> - R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
	<i>trpA</i> - F	AGTTTATGCCAGTGCGAG	219	
	<i>trpA</i> - R	CTGCGCCGGTCACGCC		
	<i>TspE4.C2</i> - F	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	
	<i>TspE4.C2</i> - R	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
	<i>yjaA</i> - F	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211	
	<i>yjaA</i> - R	AATGCGTCCTCAACCTGTG		
<b>MLVA Genes</b>				
MLVA genotyping genes	<i>VR1</i> - F	ATTATTGGCGGAGCTTCTG	~120	Kawamori et al., 2008
	<i>VR1</i> - R	TCTGGCTGCAAATAAAAGAC G		
	<i>VR2</i> - F	TGATCCCAAGTTACGCCATT	~285	
	<i>VR2</i> - R	GACGATGACAATCACCACCA		
	<i>VR3</i> - F	AGCATCATCACCACGATCAC	~108	
	<i>VR3</i> - R	ACTCTCGTTGTCGCCATGT		
	<i>VR4</i> - F	AATCGAAATACATGAACTAAA GAAAAA	~129	
	<i>VR4</i> - R	CCAATTGAATCTACAGTGGTC TG		
	<i>VR5</i> - F	CTGCCGGAGTATCAGCTTG	~122	
	<i>VR5</i> - R	GGAAAACTGATGCAGACTC G		
	<i>VR6</i> - F	ACGCGAAGCTAACAAGGAAA	~258	
	<i>VR6</i> - R	CCTTTACAACCTCACCTGCGAA T		

**Table 2 con.** Summary of the primers used for the detection of target genes in *E. coli* bacteria.

Target	Gene Primers	Sequence (5'-3')	Amplicon size, bp	Reference
	<i>VR7 - F</i>	AACCCGGAATGGAAAATCTC	~278	
	<i>VR7 - F</i>	CAATGTCAGAGCGAAAAATG TC		
	<i>VR8 - F</i>	GCTGCAGTTGCTCGGTTTIA	~145	
	<i>VR8 - R</i>	GAGTTTGACGATGGCGATCTA		

### Phylogenetic classification

To assign *E. coli* isolates to one of the seven main phylogenetic groups, four marker genes (*chuA*, *yjaA*, *TspE4C2*, and *arpA*) and an additional gene (*trpA*) were targeted. Quadruplex PCR was performed as previously described (Clermont et al., 2000; Clermont et al., 2013). Based on the PCR products, the strains were classified as lineage A, B1, B2, C, D, E, or F.

### Genotyping of isolates

To analyse the spread of multidrug-resistant *E. coli* and *Acinetobacter* spp. clinical isolates in Lithuania, three genotyping methods were used. First, BOX-PCR genotyping was performed. Next, the results were evaluated to identify isolates belonging to the same strain. These isolates were then analysed via (GTG)<sub>5</sub>-PCR. BOX-PCR and (GTG)<sub>5</sub>-PCR were performed according to Dombek et al. (2000) and Versalovic et al. (1994), respectively. The reaction mixture used for both PCR methods had a total volume of 50 µL, containing DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 µM of primer (BOX-PCR: BOXA1R, 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'; (GTG)<sub>5</sub>: 5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'), and 1 µL of bacterial DNA. PCR conditions were established as described by Versalovic et al. (1994). The amplification products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis.

After genotyping with BOX-PCR and (GTG)<sub>5</sub>-PCR, the MLVA method was performed as described by Pourcel et al. (2011) for *Acinetobacter* spp. and Kawamori et al. (2008) for *E. coli* isolates. The PCR reaction mixture contained the DreamTaq Green PCR Master Mix (2×). The products of MLVA were analysed via electrophoresis using 2% agarose gel for L repeats and 3% agarose gel for S repeats as described by Pourcel et al. (2011) and Kawamori et al. (2008). The number of tandem repeats in each loci was

calculated manually based on the size of the PCR products. The size of the PCR products was the sum of the primers, tandem repeats, and the sequence between the primers and tandem repeats. The values of flanking region size referred to the genome of strain *A. baumannii* ATCC 17978 and *E. coli* O157 : H7 EDL933, respectively.

### **Data analysis**

Electrophoresis profiles of the BOX-PCR and (GTG)<sub>5</sub>-PCR products were determined using BioNumerics 7.0 and 8.0 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) and Tree Of Life (iTOL) v6, an online tool for phylogenetic tree preparation (Letunic & Bork, 2021). Next, dendrograms were constructed using the unweighted-pair group method with the arithmetic mean (UPGMA).

The MLVA electrophoresis profiles were analysed manually, and the variable number of tandem repeats was calculated as described by Pourcel et al. (2011) and Kawamori et al. (2008). A dendrograms were constructed from the MLVA results using the unweighted pair group method with the arithmetic mean (UPGMA) grouping method. Moreover, minimum spanning trees (MST) were constructed according to the VNTR profiles using PHYLOViZ Online software (Ribeiro-Gonçalves et al., 2016).

The Nei diversity index (Nei, 1973; Harris & DeGiorgio, 2017) was used to evaluate the VNTR profiles variety in different healthcare institutions in Lithuania and during different years of extraction of isolates. Diversity index was calculated according to the formula:  $D=1 - \sum (\text{VNTR profile repeat number})^2$ .

The  $\chi^2$  test or Fisher's exact test was used to compare categorical variables. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using SPSS software (version 10.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and MS Excel (Microsoft, JAV).

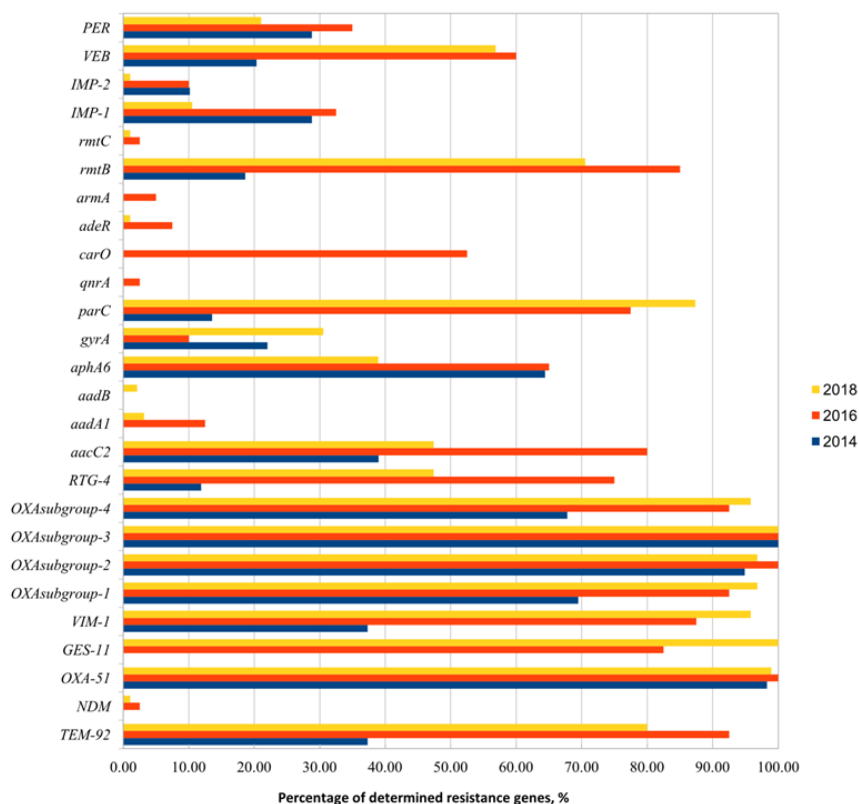


## RESULTS

### Identification and characterization of antibiotic resistance genes

During the different years covered by the study (2014, 2016, and 2018), 194 clinical isolates of *Acinetobacter* spp. were collected from 14 healthcare institutions in Lithuania. After confirmation of phenotypic resistance, genetic resistance was confirmed in all identified isolates by dividing the analysed resistance genes into four groups: genes responsible for aminoglycoside resistance, quinolone resistance,  $\beta$ -lactam resistance, and efflux pump regulators. Screening of these gene groups showed that the most common resistance genes were *bla*<sub>OXA subgroup-3</sub> (100% of all isolates), *bla*<sub>OXA-51</sub> (98.9%), *bla*<sub>OXA subgroup-1</sub> (99.5%), *bla*<sub>OXA subgroup-2</sub> (97%), *bla*<sub>OXA subgroup-4</sub> (86%), *bla*<sub>VIM-1</sub> (76.2%), *bla*<sub>TEM-92</sub> (69.9%), *bla*<sub>GES-11</sub> (66%), *parC* (63%), *aacC2* (61.3%), and *aphA6* (52.1%). Eight of these gene groups (*bla*<sub>OXA subgroup-3</sub>, *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA subgroup-1</sub>, *bla*<sub>OXA subgroup-2</sub>, *bla*<sub>OXA subgroup-4</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>TEM-92</sub>, and *bla*<sub>GES-11</sub>) were responsible for resistance to  $\beta$ -lactams, two genes (*aacC2* and *aphA6*) for resistance to aminoglycosides, and one gene, *parC*, for resistance to quinolones. The resistance genes, *adeE* and *aacC1*, were not found in any of the isolates. Moreover, it was determined that 45.9% of all *Acinetobacter* spp. isolates exhibited an antibiotic resistance gene combination of *bla*<sub>OXA subgroup-3</sub>-*bla*<sub>OXA subgroup-1</sub>-*bla*<sub>OXA51</sub>-*bla*<sub>OXA subgroup-2</sub>-*bla*<sub>OXA-subgroup-4</sub>-*bla*<sub>VIM-1</sub>-*bla*<sub>TEM-92</sub>.

The composition of *Acinetobacter* spp. resistance genes changed during the years of study (**Fig. 1**) and showed dependency on the healthcare institution from which the isolates were collected. Statistical analysis showed that the rate of 13 resistance genes (*bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>GES-11</sub>, *bla*<sub>OXA subgroup-2</sub>, *bla*<sub>RTG-4</sub>, *bla*<sub>carO</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>PER</sub>, *parC*, *aadA1*, *aphA6*, *armA*, *rmtB*, and *adeR*) increased from 2014 to 2016 ; however, from 2016 to 2018, the rate of only three resistance genes increased (*bla*<sub>GES-11</sub>, *gyrA*, and *parC*) ( $p < 0.05$ ). However, only one resistance gene (*rmtC*) showed a statistically significant dependency on healthcare institutions I, VI, and VIII ( $p = 0.02$ ). Other antibiotic resistance genes showed no statistical dependency related to any healthcare institution.



**Fig. 1.** Analysis of detected resistance genes of *Acinetobacter* spp. during 2014, 2016, and 2018.

In 2014 and 2018, 256 clinical isolates of *E. coli* were collected from 12 healthcare institutions in Lithuania. Genetic resistance determinants were divided into groups according to the six types of antibiotic resistance observed in clinical *E. coli* cases:  $\beta$ -lactam, sulphonamide, aminoglycoside, tetracycline, fosfomycin, and colistin resistance. Screening of these gene groups showed that the most common resistance genes were *tetA* (100% of isolates), *strB* (99.2%), *sul2* (99.2%), *bla<sub>TEM</sub>* (98.8%), *bla<sub>NDM</sub>* (98.4%), *strA* (98.4%), *fosA* (97.3%), *bla<sub>AIM</sub>* (97.3%), *sul3* (92.6%), *aadA* (92.6%), and the *bla<sub>CTX-M-9</sub>* group (90.6%). Four genes (*bla<sub>TEM</sub>*, the *bla<sub>CTX-M-9</sub>* group, *bla<sub>AIM</sub>*, and *bla<sub>NDM</sub>*) caused resistance to  $\beta$ -lactams, three genes (*aadA*, *strA*, and *strB*) to aminoglycosides, two genes (*sul2* and *sul3*) to sulphonamides, one gene (*fosA*) to fosfomycin, and one gene (*tetA*) to tetracyclines. Moreover, the most common resistance gene combination was *tetA-strB-sul2-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-fosA-bla<sub>AIM</sub>-sul3-aadA-bla<sub>CTX-M-9</sub>*, detected in 67.2% of all *E. coli* isolates collected in 2014 and 2018. The resistance genes *bla<sub>CTX-M-8</sub>*, *bla<sub>CTX-M-25</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*,

*bla<sub>DIM</sub>*, and *bla<sub>GIM</sub>* were not found in any of the isolates. *bla<sub>SHV</sub>* and *bla<sub>SPM</sub>* were found in only three and two isolates collected in 2018, respectively.

A comparison of the resistance genes detected in isolates from 2014 and 2018 showed that their rates changed during this period (**Table 3**). Three genes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, and *aac3(IV)*) were more common in 2018 than in 2014 ( $p < 0.05$ ). Conversely, three genes (*bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *tetC*, and *mcr-1*) were more common in 2014 than in 2018 ( $p < 0.05$ ). The expression rates of the three genes (*bla<sub>TEM</sub>*, *strA*, and *tetA*) remained constant in both years of study.

A dependency of some resistance genes linked to the healthcare institutions from which *E. coli* isolates were collected was observed. A statistically significant dependency on a specific hospital was observed in the resistance genes *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *tetC* and *bla<sub>SPM</sub>* ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Distribution of *E. coli* different antibiotic resistance genes in 2014 and 2018\*.

Resistance Genes Group	Resistance Gene	Number of isolates in 2014 (n = 91), n (%)	Number of isolates in 2018 (n = 165), n (%)	% of Increase (+%) or Decrease (-%)	$\chi^2$ Value	p Value
β-lactams resistance genes	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	88 (96.7)	164 (99.4)	+2.7	0.002	>0.05
	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	37 (40.7)	149 (90.3)	+49.6	18.165	<b>0.0002</b>
	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	90 (98.9)	163 (98.8)	+0.1	0.071	>0.05
	<i>bla<sub>AIM</sub></i>	89 (97.8)	160 (96.7)	-1.1	0.103	>0.05
	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	45 (49.5)	42 (25.5)	-24	11.017	<b>0.009</b>
	<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	11 (12.1)	24 (14.5)	+2.4	0.173	>0.05
	<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	90 (98.9)	142 (86.1)	-12.8	1.651	>0.05
	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	77 (84.6)	150 (90.9)	+6.3	0.073	>0.05
	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	36 (39.5)	98 (59.4)	+19.9	3.697	<b>0.050</b>
Sulphonamide resistance genes	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	54 (59.3)	129 (78.2)	+18.9	2.239	>0.05
	<i>sul1</i>	63 (69.2)	135 (81.8)	+12.6	1.066	>0.05
	<i>sul2</i>	90 (98.9)	164 (99.4)	+0.5	1.066	>0.05
Aminoglycoside resistance genes	<i>sul3</i>	91 (100)	146 (88.5)	-11.5	0.764	>0.05
	<i>strA</i>	90 (98.9)	162 (98.2)	-0.7	0.048	>0.05
	<i>strB</i>	91 (100)	163 (98.8)	-1.2	1.370	>0.05
	<i>aac3 (IV)</i>	9 (9.9)	36 (21.8)	+11.9	0.098	<b>0.037</b>
Tetracycline resistance genes	<i>aadA</i>	82 (90.1)	155 (93.8)	+3.7	0.124	>0.05
	<i>tetA</i>	91 (100)	165 (100)	0	4.331	>0.05
	<i>tetB</i>	23 (25.3)	30 (18.2)	-7.1	0.003	>0.05
Fosfomycin resistance gene	<i>tetC</i>	23 (25.3)	15 (9.1)	-16.2	0.067	<b>0.0009</b>
	<i>fosA</i>	88 (96.7)	161 (97.6)	+0.9	1.736	>0.05

\* Statistically significant p values ( $p \leq 0.05$ ) are marked with bold font.

**Table 3 con.** Distribution of *E. coli* different antibiotic resistance genes in 2014 and 2018.

Resistance Genes Group	Resistance Gene	Number of isolates in 2014 ( <i>n</i> = 91), <i>n</i> (%)	Number of isolates in 2018 ( <i>n</i> = 165), <i>n</i> (%)	% of Increase (+%)/or Decrease (-%)	$\chi^2$ Value	<i>p</i> Value
Colistin resistance gene	<i>mcr-1</i>	8 (8.8)	5 (3.03)	-5.77	11.109	0.043

### Identification of virulence genes in *E. coli*

Virulence genes were analysed in all *E. coli* isolates collected in 2014 and 2018. Thirteen virulence genes from four groups common to bloodstream-associated *E. coli* infections (toxins, serum resistance factors, iron uptake factors (siderophores), and adhesins) were tested. The most common virulence genes were *fimH* (98.4% of all isolates), *fyuA* (91.8%), and *traT* (81.3%), which were responsible for type 1 fimbria adhesin activation, siderophore (yersiniabactin) activation, and bacterial serum resistance, respectively. The least common virulence gene was *ibeA*, which is responsible for activating adhesion group virulence factors. This gene was detected in only 17 isolates (6.6%), which were mostly collected from healthcare institution II. The most common virulence gene combination was *fuyA-fimH-iroN*, found in 150 isolates (58.6%); *fuyA* and *iroN* encode siderophores and *fimH* is responsible for bacterial adhesion to host cells.

Next, the virulence gene analysis results from 2014 and 2018 were compared to determine how virulence determinants changed over time (**Table 4**). The distribution of the virulence genes changed over the five-year period; some virulence genes increased in frequency, while others decreased ( $p < 0.05$ ). The frequencies of three virulence genes (*hlyA*, *cnfI* and *sfaD/E*) increased from 2014 to 2018, whereas those of four genes (*cvaC*, *ibeA*, *papC* and *afaB/C*) decreased. However, no virulence genes were significantly linked to healthcare institutions in Lithuania ( $p > 0.05$ ).

**Table 4.** Distribution of *E. coli* virulence genes over the five-year period\*.

Virulence Factor	Genes	Number of	Number of	% of Increase (+%)/or Decrease (-%)	$\chi^2$	
		Isolates in 2014 (n = 91), n (%)	Isolates in 2018 (n = 165), n (%)		Value	p Value
Toxins	<i>hlyA</i>	21 (23.1)	83 (50.3)	+27.2	1.264	<b>0.004</b>
	<i>cnfI</i>	16 (17.6)	70 (42.2)	+24.6	8.270	<b>0.003</b>
	<i>cvaC</i>	23 (25.3)	23 (13.9)	-11.4	8.568	<b>0.018</b>
	<i>ibeA</i>	10 (11)	7 (4.2)	-6.8	5.620	<b>0.027</b>
	<i>sat</i>	40 (44)	98 (59.4)	+15.4	4.892	>0.050
Adhesins	<i>staD/E</i>	31 (34.1)	91 (55.2)	+21.1	0.373	<b>0.05</b>
	<i>fimH</i>	89 (97.8)	163 (98.8)	+1	3.586	>0.05
	<i>papC</i>	28 (30.8)	19 (11.5)	-19.3	14.340	<b>0.0002</b>
	<i>afaB/C</i>	19 (20.9)	15 (9.1)	-11.8	7.644	<b>0.006</b>
Siderophores	<i>fyuA</i>	81 (89)	154 (93.3)	+4.3	0.098	>0.05
	<i>iroN</i>	54 (59.3)	107 (64.8)	+5.5	0.000	>0.05
Serum resistance	<i>traT</i>	69 (75.8)	139 (84.2)	+8.4	0.010	>0.05
	<i>kpsMTII</i>	47 (51.6)	79 (47.9)	-3.7	0.816	>0.05

### *E. coli* phylogenetic classification

Phylogenetic group determination was performed for all *E. coli* isolates. The isolates belonged to four phylogenetic groups: A, B1, B2, and F. Group A isolates were detected at a significantly higher frequency (79.3% of all isolates) than isolates of groups B1, B2, and F. Group B1 isolates were the least common, with a frequency of 0.8%, and included isolates from 2014 only.

A comparison of the phylogenetic group distribution in 2014 and 2018 showed that groups B2 and F were more common in 2018, whereas group A was more common in 2014 (**Table 5**). However, phylogenetic group B1 was observed only in isolates from 2014. Moreover, statistical analysis showed that only group B1 showed a statistically significant change from 2014 to 2018 ( $p = 0.049$ ), while the other groups were distributed independently.

**Table 5.** *E. coli* phylogenetic groups detected in 2014 and 2018†.

	Phylogenetic Group A	Phylogenetic Group B1	Phylogenetic Group B2	Phylogenetic Group F
Total number of isolates (n = 256), n/%	203/79.3	2/0.8	40/15.6	11/4.3
Number of isolates in 2014 (n = 91), n/%	77/84.6	2/2.2	10/11	2/2.2

\* Statistically significant  $p$  values ( $p \leq 0,05$ ) are marked with bold font.

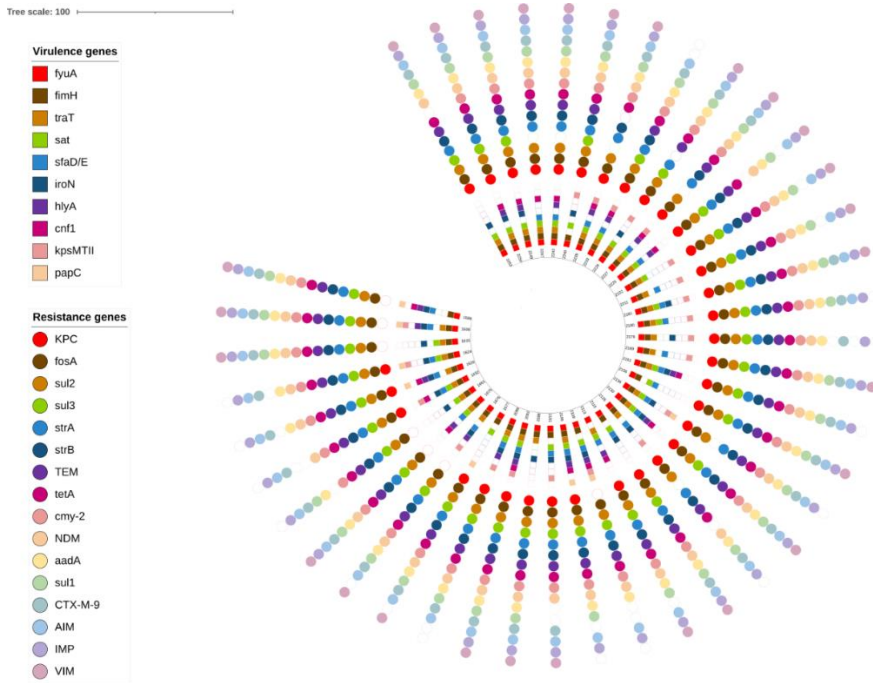
† Statistically significant  $p$  values ( $p \leq 0,05$ ) are marked with bold font.

**Table 5 con.** *E. coli* phylogenetic groups detected in 2014 and 2018.

	Phylogenetic Group A	Phylogenetic Group B1	Phylogenetic Group B2	Phylogenetic Group F
Number of isolates in 2018 (n = 165), n/%	126/76.4	-	30/18.2	9/5.5
p Value	>0.05	0.049	>0.05	>0.05

All group A isolates were separated into three groups according to the presence of phylogenetic genes: *yjaA* and *arp* were detected in the first and second groups, respectively, whereas no genes were detected by quadruplex PCR in the third group. The most common virulence genes in phylogenetic group A were *fimH* (98.5% of phylogroup A isolates) and *fyuA* (89% of phylogroup A isolates). The most common virulence gene combination was *fimH-fyuA-traT* (73.4% of phylogroup A isolates). The most common resistance genes were *tetA* (100% of phylogroup A isolates), *strB* (99.5%), *sul2* (99.5%), *bla<sub>TEM</sub>* (99%), and *bla<sub>NDM</sub>* (98.5%); the most common resistance gene combination was *tetA-strB-sul2-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strA-bla<sub>AIM</sub>-fosA-sul3-bla<sub>CTX-M-9</sub>-aadA-bla<sub>IMP</sub>* (62.1% of phylogroup A isolates).

Moreover, in phylogenetic group B2 (**Fig. 2**), the most common virulence genes were *fyuA* (100% of phylogroup B2 isolates) and *fimH* (97.5% of phylogroup B2 isolates). The most common virulence gene combination was *fyuA-fimH-traT-sat* (60% of phylogroup B2 isolates). The most common resistance genes were *fosA* (100% of phylogroup B2 isolates), *sul2* (100%), *strA* (100%), and *tetA* (100%); the most common resistance gene combination was *fosA-sul2-strA-tetA-bla<sub>TEM</sub>-bla<sub>AIM</sub>-bla<sub>NDM</sub>-strB-aadA* (85% of phylogroup B2 isolates).



**Fig. 2.** Dendrogram of *E. coli* phylogenetic group B2.

All isolates of phylogenetic group F (4.3% of all *E. coli* isolates) had the virulence genes *fimH* and *traT*. All group F isolates harboured the resistance gene combination *bla*<sub>TEM</sub>-*bla*<sub>NDM</sub>-*sul3*-*aadA*-*strA*-*strB*-*tetA*.

### rep-PCR genotyping results

BOX-PCR genotyping analysis was performed on all 194 *Acinetobacter* spp. isolates. A total of 191 BOX-PCR profiles were identified and a dendrogram was created. Cluster 6 was the dominant cluster and contained isolates collected primarily in 2014 (20 isolates) and 2018 (20 isolates). Only one cluster, Cluster 3, had isolates from only one year of collection (2018). Statistical analysis of the dependency of the cluster on the year of isolate collection showed that clusters 1, 2, 3, and 4 had statistically significant results for a specific year of isolation ( $p < 0.05$ ). The results of the cluster comparison are presented in **Table 6**.

**Table 6.** *Acinetobacter* spp. BOX-PCR dendrogram clusters analysis\*.

Cluster	2014 Year: Number of Profiles	2016 Year: Number of Profiles	2018 Year: Number of Profiles	Distribution According to Year of Isolation, p Value	Numbers of Isolates in Healthcare Institutions (Number of Isolates)	Distribution According to Healthcare Institutions, p Value
Cluster 1	14	1	1	<b>0.014</b>	I (11), IV (1), V (1), VI (1), VII (1), VIII (8), XI (1), XIII (1), XIV (1)	0.955
Cluster 2	5	1	27	<b>0.001</b>	I (14), III (2), IV (3), VI (1), VII (3), VIII (9), X (1), XI (2)	0.605
Cluster 3	-	-	20	<b>0.00003</b>	I (9), III (2), IV (1), V (1), VI (1), VIII (4), X (2)	0.525
Cluster 4	11	22	2	<b>&lt; 0.00001</b>	I (16), II (1), IV (1), V (2), VI (1), VIII (7), X (3), XI (1), XIII (2), XIV (1)	0.428
Cluster 5	8	9	13	0.446	I (15), IV (2), VI (1), VIII (5), XI (3), XII (1), XIII (3)	0.403
Cluster 6	20	6	20	0.145	I (20), II (1), III (1), IV (1), VI (1), VII (2), VIII (12), IX (1), XIII (8)	0.325

The BOX-PCR profiles of the three *Acinetobacter* spp. had two isolates, collected in 2014 (one profile) and 2018 (two profiles). All the isolates were collected from different healthcare institutions (I, III, VI, and VIII). Further analysis with (GTG)<sub>5</sub>-PCR allowed to determine that all these isolates were genetically very similar, the only exception being isolate 2018444 (from hospital VIII), which showed 50% genetic difference to all other compared isolates. Moreover, the detection of antibiotic resistance genes showed that the analysed isolates had different resistance gene profiles, gene combinations, and gene numbers (**Table 7**). The lowest number of resistance genes was observed in isolates 201429 and 2014212 (7 and 8 genes), whilst another four isolates showed a higher number of genes: 2018364 (12 genes), 2018444 (11

\* Statistically significant *p* values (*p*≤0,05) are marked with bold font.



genes) 2018391 (12 genes), and 2018419 (14 genes). Resistance gene combinations differed among the six isolates, mostly in the detection of aminoglycoside resistance genes and  $\beta$ -lactams (**Table 7**).

**Table 7.** Data comparison of *Acinetobacter* spp. isolates analysed using (GTG)<sub>5</sub>-PCR.

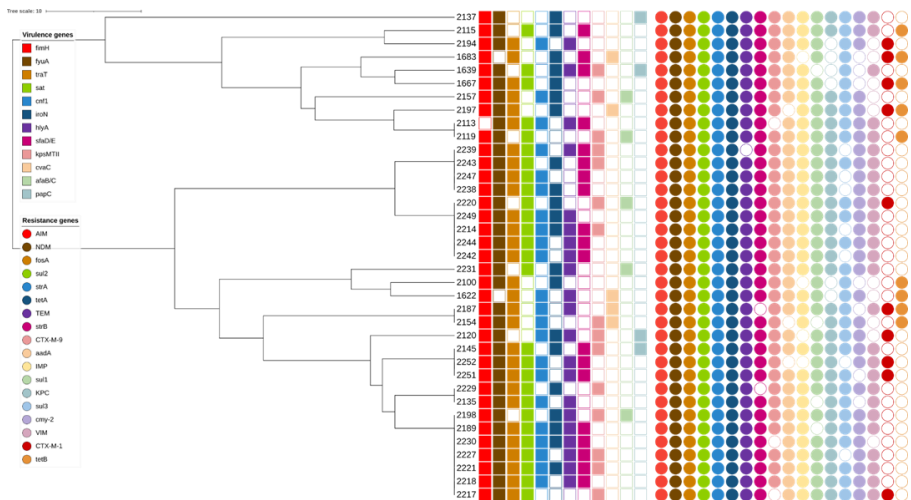
Profile Number	Isolate	Healthcare Institution	Number of Resistance Genes Detected	Genes in Both Isolates	Different Genes in Isolates
1	201429	I	7	<i>bla<sub>OXA-51</sub></i> , <i>bla<sub>VIM-1</sub></i> ,	<i>bla<sub>aacC2</sub></i> , <i>bla<sub>aphA6</sub></i> , <i>bla<sub>IMP-1</sub></i>
	2014212	VI	8	<i>bla<sub>OXA</sub></i> subgroup-2, <i>bla<sub>OXA</sub></i> subgroup-3	<i>bla<sub>TEM-92</sub></i> , <i>bla<sub>OXA</sub></i> subgroup-1, <i>bla<sub>aacC1</sub></i> , <i>bla<sub>armA</sub></i>
2	2018364	I	12	<i>bla<sub>TEM-92</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> ,	<i>bla<sub>gyrA</sub></i> , <i>bla<sub>PER</sub></i>
	2018444	VIII	11	<i>bla<sub>GES-11</sub></i> , <i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA</sub></i> subgroups 1-4, <i>bla<sub>parC</sub></i> , <i>bla<sub>VEB</sub></i>	<i>bla<sub>aacC2</sub></i>
3	2018391	III	12	<i>bla<sub>TEM-92</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> ,	-
	2018419	I	14	<i>bla<sub>GES-11</sub></i> , <i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA</sub></i> subgroups 1-4, <i>bla<sub>RTG-4</sub></i> , <i>bla<sub>aacC2</sub></i> , <i>bla<sub>parC</sub></i> , <i>bla<sub>rmtB</sub></i>	<i>bla<sub>aphA6</sub></i> , <i>bla<sub>PER</sub></i>

The 256 *E. coli* isolates tested exhibited genetic diversity, as revealed by rep-PCR. In total, 235 BOXPCR profiles were obtained. Dendrograms were constructed using UPGMA and all profiles were separated into 14 genotypic clusters. Cluster analysis showed that each cluster contained profiles with a variety of virulence and resistance genes, and the presence of certain genes was not restricted to any specific cluster.

Fourteen genotypic clusters were identified in this study. Cluster 9 had the most isolates (n = 52, 20.3% of all isolates), and cluster 5 had the fewest (n = 1, 0.4%). Most of the isolates in Cluster 9, the dominant cluster, were collected in 2018 (39 isolates), with fewer isolates collected in 2014 (17 isolates). Only Cluster 8 had more isolates from 2014 (18 isolates) than from 2018 (13 isolates). All clusters included isolates from both years of the study.

Cluster 1 lacked virulence genes *afaB/C* and *ibeA*, both of which are responsible for pathogenic *E. coli* adhesion and invasion of host cells but included the antibiotic resistance genes *tetA-sul2-strB-bla<sub>TEM</sub>*. Clusters 5 and 8 lacked the antibiotic resistance genes *bla<sub>CTX-M-2</sub>* ( $\beta$ -lactam resistance) and *mcr-1* (colistin resistance), whereas Cluster 7 lacked *tetB* (tetracycline resistance).

Seventeen *E. coli* BOX-PCR profiles each contained two or three isolates. These profiles were distributed among Clusters 1, 9, 10, 12, 13, and 14. No profiles with more than one isolate were found in clusters 2 and 3. All the isolates were collected from different healthcare institutions (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, and XII). (GTG)<sub>5</sub>-PCR analysis indicated that all analysed isolates were genetically similar; only one isolate, 2137 (hospital XII), was different (**Fig. 3**). The isolates were classified into two phylogenetic groups: A (29 isolates) and B2 (eight isolates). All the isolates had different virulence gene profiles (**Fig. 3**). Virulence genes *fimH* and *fyuA* were observed in all analysed isolates, except 1683 and 2113, respectively. All isolates had different resistance gene profiles and gene combinations. The genes *bla*<sub>AIM</sub>, *fosA*, *sul2*, *strA*, and *tetA*, which cause resistance to different types of antibiotics, were found in all isolates.



**Fig. 3.** *E. coli* (GTG)<sub>5</sub>-PCR dendrogram.

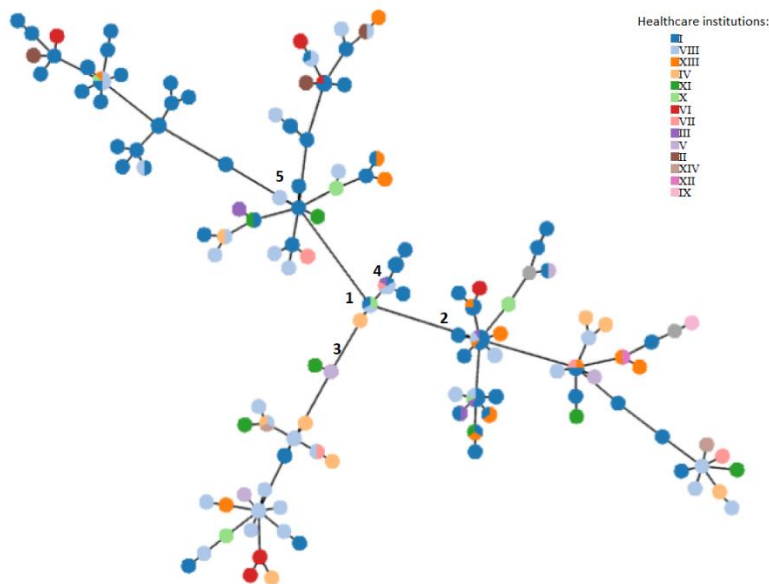
## MLVA genotyping results

The 194 tested *Acinetobacter* spp. isolates showed high genetic diversity, as revealed by rep-PCR analysis. A total of 126 different MLVA profiles were detected and compared with 191 BOX-PCR profiles. The dendrogram constructed using UPGMA separated all the detected profiles into six clusters. An analysis of BOX-PCR and MLVA-8 clusters showed that these clusters had a variety of different resistance genes in all profiles, and the presence of genes was not restricted to one exact cluster.

The occurrence of eight VNTR loci was assessed in 194 *Acinetobacter* spp. isolates. Two VNTR markers (Abaum\_3530 and Abaum\_3002) showed

no polymorphisms, and only one allele for each of these markers was obtained from every selected isolate. Six VNTR markers (Abaum\_1988, Abaum\_2240, Abaum\_2396, Abaum\_3468, Abaum\_0826, and Abaum\_0845) were polymorphic, and allele frequency was determined by visual analysis of the PCR products. Amplification products were obtained from all isolates. Moreover, different VNTR markers showed different polymorphism levels in different health care institutions. The VNTR markers Abaum\_2396, Abaum\_3468, Abaum\_0826, and Abaum\_0845 showed different Nei diversity index values in different hospitals in Lithuania. However, no statistical dependence of polymorphism occurrence on isolate origin was observed ( $p > 0.05$ ).

According to the VNTR marker diversity, a minimum spanning tree (*MST*) was constructed to evaluate the origin and distribution of the MLVA profiles in different healthcare institutions. The results showed that all MLVA types originated from MLVA type A70 (“1”) and then separated into four genetically similar branches (“2”), and branch “2” had the highest number of different MLVA profiles.



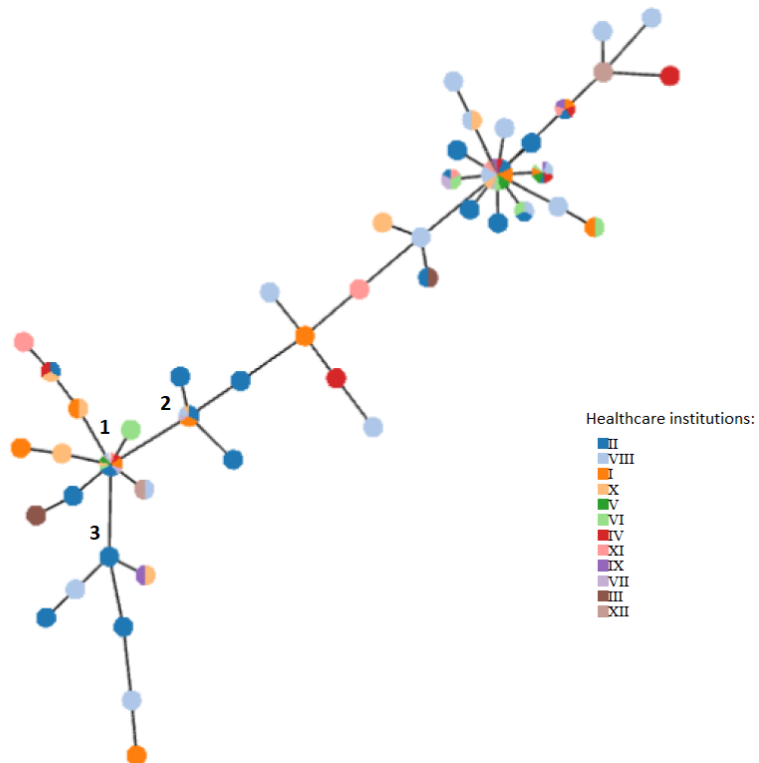
**Fig. 4.** MST of *Acinetobacter* spp. MLVA profiles.

The 256 *E. coli* isolates tested, showed low genetic diversity, as revealed by rep-PCR. A total of 47 different MLVA profiles were detected in comparison with 235 BOX-PCR profiles. The dendrogram constructed using UPGMA separated all the detected profiles into six clusters. An analysis of BOX-PCR and MLVA clusters showed that these clusters had a variety of

different resistance genes in all profiles, and the presence of genes was not restricted to one exact cluster. Statistical data analysis of the origin of MLVA types showed that MLVA type A23 contributed to healthcare institution III, types A25 and A26 to institution XII, and MLVA type A35 to institution III.

The occurrence of eight VNTR loci was assessed in the 256 *E. coli* isolates, and their polymorphism rates were observed. Two VNTR markers (VR4 and VR7) showed the highest polymorphism values in all *E. coli* isolates; however, the VNTR markers, VR1, VR2, VR3, and VR6, were low.

The minimum spanning tree (MST) of *E. coli* MLVA profiles (**Fig. 5**) has showed that all studied isolates had originated from one MLVA profile A32 (“1”) and then branched into two genetically similar branches. Branch “2” showed the highest number of MLVA profiles and branch “3” had isolates mostly from healthcare institutions II and VIII.



**Fig. 5.** MST of *E. coli* MLVA profiles

## DISCUSSION

In this study, clinical *Acinetobacter* spp. and *E. coli* isolates with multidrug-resistance patterns were evaluated. All the isolates were collected from different healthcare institutions in Lithuania.

During the first part of the study, isolates of *Acinetobacter* spp. were evaluated along with their antibiotic resistance genes, genetic profiles, and probable distribution in different healthcare institutions. The number of cases of antimicrobial-resistant bacterial nosocomial infections worldwide has increased over the past decade (Rafei et al., 2019). One of the highest rates of resistance in healthcare institutions is observed in *Acinetobacter* spp., which cause outbreaks worldwide and is highly adaptable to changes in the environment and changes in the use of antibiotics in healthcare institutions. These characteristics lead to a high rate of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. in the environment. Moreover, some studies have shown that antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. has changed over the years, and the bacteria have become almost immune to all known antibiotics (Bergogne-Berezin & Towner, 1996). This study aimed to evaluate the changes in *Acinetobacter baumannii* resistance in isolates collected in different years and to observe the probable origin from different healthcare institutions in Lithuania. Owing to the high risks they pose to healthcare institutions, only multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. isolates were examined. During this study, 24 resistance genes were analysed, which are responsible for resistance to three groups of antibiotics: aminoglycosides, quinolones, and  $\beta$ -lactams, and one group of genes, which is responsible for efflux pump regulation.

An analysis of the aminoglycoside resistance genes detected showed that the most common resistance genes in *Acinetobacter* spp. isolates were *rmtB* (57.7% of all isolates), *aphA6* (52.1%), and *aacC2* (51.6%). The *rmtB* gene is associated with 16S rRNA methylase production, which causes enzymatic modification of the methylation of 16S rRNA resulting in the high resistance of *Acinetobacter* spp. isolates to all clinically important aminoglycosides. In 2003, clinical isolates of highly aminoglycoside-resistant gram-negative bacteria producing 16S rRNA methylase were identified in France (Galimand et al., 2003), Japan (Yamane et al., 2007), and other parts of the world, including Asian countries, such as Afghanistan, Bangladesh, China, Hong Kong, India, Korea, Oman, and Pakistan (Wachino & Arakawa, 2012). Another resistance gene, *aphA6*, encodes the aminoglycoside-modifying enzyme phosphotransferase APH (3')-Via. Enzyme acetyltransferase AAC (3)-IIa, encoded by *aacC2*, which together with the APH enzyme, are responsible for the highest levels of aminoglycoside resistance worldwide

(Aliakbarzade et al., 2014). Moreover, an evaluation of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. isolates in this study showed that over different years, the number of different resistance genes increased. However, only the analysis of resistance genes, *aadA1*, *aphA6*, *armA*, and *rmtB*, was statistically significant ( $p < 0.05$ ). In 2014, the *aacC2*, *aphA6*, and *rmtB* genes were detected, but in 2016, the following new genes were identified: *aadA1*, *armA*, and *rmtC*. Analysis of the data from *Acinetobacter* spp. isolates collected in 2018 revealed a new gene, *aadB*, but the *armA* gene, which was detected in 2016, was absent. These data demonstrate the variability and diversity of resistance genes in *Acinetobacter* spp. isolates during the study period. Moreover, it was found that the resistant gene *rmtC* is statistically significant in healthcare institutions I, VI, and VIII ( $p = 0.02$ ). Worldwide studies on aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. isolates have shown some differences in antibiotic resistance genes. Moniri et al. (2010) evaluated aminoglycoside resistance genes of 60 *Acinetobacter* strains isolated from hospitalised patients in Iran and reported the presence of the *aacC1* gene in 63.3% of *Acinetobacter* isolates; *aphA6*, *aadA1*, and *aadB* genes were detected in 65%, 41.7%, and 3.3% of the isolates, respectively. In another study conducted in Australia by Nigro et al. (2016), the pattern of resistance to aminoglycosides was investigated in 61 multidrug-resistant *A. baumannii* isolates collected between 2000 and 2010 in six Australian hospitals. The isolates were screened for aminoglycoside-modifying genes *aadB*, *aacC1*, *aphA1b*, and *aphA6* and it was found that the *aphA6* gene was present in combination with *aacC1* and *aphA1* in a few isolates (Moniri et al., 2010). These results differ from those of study, where *accC1* was not detected at all, and the *aadB* gene was detected only in two of the *Acinetobacter* spp. isolates collected in 2018.

Three quinolone resistance genes were observed during the evaluation of *Acinetobacter* spp. isolates, *gyrA*, *parC*, and *qnrA*. *gyrA* (23.7% of isolates) and *parC* (62.9% of isolates) were detected in all the years under study. Both genes are associated with the most frequent mechanisms of resistance to quinolones, including alterations in genes that encode subunits of quinolone target DNA gyrase (*gyrA*) and topoisomerase IV (*parC*) (Fernández-Cuenca et al., 2003). *qnrA* was found in only one isolate collected in 2016, which is contrary to other studies, where *qnrA* is commonly found worldwide in *Enterobacteriaceae* bacteria (Cheung et al., 2005; Fernández-Cuenca et al., 2003) and *A. baumannii* isolates (Touati et al., 2008).

The highest number of antibiotic resistance genes, which was observed in isolates of *Acinetobacter* spp., was responsible for resistance to  $\beta$ -lactams. Gene groups that had the highest number of isolates: *bla<sub>OXA</sub> subgroup-3* (found in

all collected isolates; genes: *bla*<sub>OXA-51</sub>, *bla*<sub>OXA-64</sub>, *bla*<sub>OXA-65</sub>, *bla*<sub>OXA-66</sub>, *bla*<sub>OXA-68</sub>, *bla*<sub>OXA-69</sub>, *bla*<sub>OXA-70</sub>, *bla*<sub>OXA-71</sub>, *bla*<sub>OXA-75</sub>, *bla*<sub>OXA-76</sub>, *bla*<sub>OXA-77</sub>, and *bla*<sub>OXA-78</sub>), *bla*<sub>OXA subgroup-2</sub> (*bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-25</sub>, *bla*<sub>OXA-26</sub>, *bla*<sub>OXA-40</sub>, and *bla*<sub>OXA-72</sub>), which contained 96.9% of all isolates, and *bla*<sub>OXA subgroup-1</sub> (*bla*<sub>OXA-23</sub>, *bla*<sub>OXA-27</sub>, and *bla*<sub>OXA-49</sub>), containing 87.6% of all *Acinetobacter* spp. isolates. In previous studies in Lithuania (Povilonis et al., 2013), several genes from these groups were detected, including *bla*<sub>OXA-24/40-like</sub> and *bla*<sub>OXA-23-like</sub>. Recently, it has been suggested that enzymes belonging to the *OXA-51-like subgroup* are intrinsic to *A. baumannii* (Héritier et al., 2005), occurring in most or all strains, although they are variably expressed, and these results correlate with the results of this study, where the *bla*<sub>OXA-51</sub> gene was found in 99% of all *Acinetobacter* spp. isolates. The same results were obtained in Polish healthcare units, where *bla*<sub>OXA-51</sub> was obtained in all the investigated isolates (n = 125) (Chmielarczyk et al., 2016).

Carbapenems are among the most important  $\beta$ -lactam antibiotics used worldwide for multidrug-resistant *A. baumannii* treatment. Carbapenem resistance caused by acquiring metallo-beta-lactamases (MBLs) is considered more serious than other resistance mechanisms because MBLs can hydrolyse almost all  $\beta$ -lactam antibiotics. Furthermore, MBL-encoding genes located in integrons can easily be disseminated from one bacterium to another (Noori et al., 2014). For the first time in Lithuania, metallo- $\beta$ -lactamase-coding genes were observed in *Acinetobacter* spp. isolates, including *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, and *bla*<sub>NDM</sub>. The most common MBL coding genes were *bla*<sub>VIM-1</sub> (76.3% of all isolates) and *bla*<sub>IMP-1</sub> (20.6%). These results are comparable to those of previous studies in Iran (Amin et al., 2019) and differ from the results observed in Poland, where *A. baumannii* strains harbouring *bla*<sub>VIM</sub> were very rare, detected in only two isolates (Chmielarczyk et al., 2016) and *bla*<sub>IMP</sub>, detected in no isolates. In this study results, statistical analysis showed that the number of *Acinetobacter* spp. bacteria with *bla*<sub>IMP-1</sub> resistance gene increased from 2014 to 2016 but decreased from 2016 to 2018 ( $p < 0.05$ ), and the percentage of bacteria with *bla*<sub>IMP-2</sub> decreased from 2016 to 2018 ( $p < 0.05$ ). One possible explanation for this change could be the replacement of genes for the effective survival of *Acinetobacter* spp. isolates due to changes in antibiotic treatment strategies.

Multidrug resistance in *Acinetobacter* spp. isolates includes not only target-modifying enzymes but also the overexpression of the outer membrane active efflux system. Compared to other resistance mechanisms, active efflux pumps are more widely distributed and have a wider substrate range, resulting in resistance to a wide range of antibiotics (Xu et al., 2019). An important resistance determinant in *A. baumannii* is the AdeABC efflux pump, which

can change its expression from inductive to constitutive. Overexpression is possible because of various mutations or inactivation by insertion sequences in local regulatory genes (Magnet et al., 2001; Marchand et al., 2004). The AdeABC operon possesses two genes that encode proteins that act as sensors (*adeS*) and regulators (*adeR*) of the pump. In a study of isolates of *Acinetobacter* spp., the *adeR* gene was identified in only 2% of the isolates, which differs from previous studies in the USA (Hujer et al., 2006), where 95% of all isolates had *adeR* regulators.

Evaluation of relatedness in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. is essential to establish the route of transmission of multidrug-resistant isolates, predict epidemics at the national and global level, provide infection control knowledge for improving hygiene policy, and avoid intrahospital transmission of multidrug-resistant isolates (Romanin et al., 2019). Rep-PCR is a strain-specific group of genotyping method that has previously been shown to be a highly selective molecular typing method for isolates of *Acinetobacter* spp. (Koczura et al., 2014). In this study, BOX-PCR and (GTG)<sub>5</sub>-PCR methods were used to genotype clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Lithuania. During the study, isolates with identical BOX-PCR electrophoretic profiles were identified (six isolates from hospitals I, III, VII, and VIII), and identification was confirmed using (GTG)<sub>5</sub>-PCR, which showed the high relatedness of these isolates. Moreover, cluster analysis of the BOX-PCR dendrogram showed that the dominant clusters 6 (24%) and 4 (18.9%) represented the majority of the detected genetic profiles. Clusters 4, 1, and 6 contained isolates collected from at least eight different healthcare units. All isolates were collected in all years of the study. Endemic clusters that reappeared over the years were also detected in Clusters 2 and 5. Only one cluster (Cluster 3) was isolated in 2018. A possible explanation for these results could be the successful adaptation of profile clusters over the years and their dissemination, which could occur through transmission from medical staff, contaminated equipment, or patient transfers from one healthcare institution to another (Cheon et al., 2016). These data confirmed previously described results that clinical isolates of *Acinetobacter* spp. are involved in intra- and/or interhospital dissemination between Lithuanian healthcare institutions (Kirtikliene et al., 2019). Transmission of endemic clusters of *Acinetobacter* spp. over the years has also been described worldwide (Romanin et al., 2019) and confirms that cluster analysis requires constant evaluation of dissemination at the national and global levels because their persistence indicates adaptation to the hospital environment and represents a risk of more dangerous future outbreaks.



Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) is highly repetitive when used for genotyping *A. baumannii* (Johnson et al., 2016) and the results are comparable with those worldwide (Hu et al., 2013). For this reason, MLVA is a promising method because of its expected robustness and communication between laboratories, which will enable laboratories to identify *Acinetobacter* spp. strains with the help of an Internet-based library (Dijkshoorn, 2013). By comparing the results of this study and studies worldwide (Hu et al., 2013; Saffari et al., 2017; Najar-Peerayeh & Karmostaji, 2019), it was found that all eight VNTR regions were detected in this study; however, in other studies, some of the loci were not observed or observed only in a limited number of isolates, and the data comparison indicated a high degree of variability and polymorphism in some of the VNTR loci. Moreover, the poor amplification of some loci suggests that the distribution of VNTR loci differs among isolates from different geographical regions (Saffari et al., 2017). The highest variability and polymorphism in locus repeat numbers detected in this study belonged to Abaum\_0845 (10 different repeat numbers) and Abaum\_0826 (9 repeat numbers). These results can be explained by the high variability of the S-repeats, as described previously (Pourcel et al., 2011). After analysis of the MLVA-8 dendrogram and the formed clusters, the same genetic trend was found in the BOX-PCR results. There was no correlation between the clustering of isolates and the specific years of study, and the isolates that formed one profile were collected from different years of the study. Moreover, different resistance genes were observed in genetically similar profiles. MLVA-8 complements the rep-PCR results, showing the transmission of genetic profiles during the different years under study. MST analysis of isolates of *Acinetobacter* spp. showed that all MLVA profiles originated from one MLVA profile, A70, which then separated into three genetically similar branches. These results showed that antibiotic-resistant *Acinetobacter* spp. isolates are involved in both inter- and intrahospital spread in Lithuanian hospitals, and resistance mechanisms are changing year by year.

The second part of the study included characterisation of multidrug-resistant, bacteraemia-causing *E. coli* isolates collected from different healthcare institutions in Lithuania in 2014 and 2018. Several techniques were used to characterise the isolates, including resistance and virulence gene determination, phylogenetic group detection, rep-PCR genotyping, and MLVA genotyping, which are important methods for determining inter- and intra-hospital spread.

The most common resistance gene in the studied *E. coli* isolates was *tetA*, which was responsible for resistance to tetracyclines (observed in all isolates). Domínguez et al. (2002) observed that *tetA*, which encodes an efflux mechanism, is the most common tetracycline resistance gene in *E. coli* found in humans. The most common aminoglycoside resistance genes were *aadA* (92.6% of isolates), *strA* (98.4%), and *strB* (99.2%). These genes are responsible for the production of aminoglycoside-modifying enzymes (*strA*: adenylyltransferase and phosphotransferases; *strB*: phosphotransferases), which lead to antibiotic deactivation by modification (Ramirez & Tolmask, 2010).

$\beta$ -lactam resistance genes have also been observed in *E. coli* isolates. The most common  $\beta$ -lactamase gene was *bla<sub>TEM</sub>* (98.8% of all isolates). In comparison, in previous study (Kirtikliene et al., 2019), observed a lower frequency of this gene (33.9%). *bla<sub>CTX-M-9</sub>* was the most commonly detected *bla<sub>CTX-M</sub>* group gene (90.6% of all isolates). This result differs from those of previous studies in Lithuania and northern countries (Sepp et al., 2019); *bla<sub>CTX-M-9</sub>* was not observed among Lithuanian clinical isolates, and the most common gene in the *bla<sub>CTX-M</sub>* group was *bla<sub>CTX-M-15</sub>*. This difference suggests that this gene emerged in Lithuania between 2012 (when the isolates analysed by Sepp et al. were collected) and 2014 (when the isolates were collected for the present study). Furthermore, a high frequency of two additional metallo- $\beta$ -lactamase genes was observed in this study: *bla<sub>NDM</sub>*, which was previously detected in Lithuania (Kirtikliene et al., 2019), and *bla<sub>AIM</sub>*, which was not, were detected in 98.4% and 97.3% of all isolates, respectively.

After the evaluation of antibiotic resistance determinants, virulence determinants were observed in all *E. coli* isolates in this study. One of the virulence mechanisms responsible for the survival of *E. coli* strains in the bloodstream is the escape of recognition by the complement system through serum resistance (Micenková et al., 2017). Multiple virulence factors are involved in serum survival. In this study, 81.3% of isolates had the *traT* gene. Similar results were found in studies on *E. coli* bloodstream infections worldwide (Bozcal et al., 2018; Koga et al., 2014; Miajlovic et al., 2016). *E. coli* capsule research showed that almost half (49.2%) of all isolates expressed *kpsMTIII*, which codes for K1 and K5 capsules proteins. These results confirm those obtained in previous research on bloodstream infections (Daga et al., 2019).

Siderophores represent another virulence mechanism by which pathogenic bacteria take up iron from the host molecules. Siderophores are commonly associated with pathogenic *E. coli* strains isolated from bacteraemia cases (Bozcal et al., 2018; Koga et al., 2014). In this study, yersiniabactin (*fyuA*) was the most prevalent siderophore, present in 91.8% of

the tested *E. coli* isolates. The *fyuA* gene product is involved in the efficient uptake of iron from the bloodstream (Ananias & Yano, 2008) and bacterial invasion of the bloodstream from the urinary tract (Johnson, & Stell, 2000). Another siderophore, salmocherin (*iroN*), is less common (present in 62.5% of isolates) and is mostly associated with invasion of the bloodstream from the urinary tract (Johnson, & Stell, 2000).

Virulence genes related to adhesins were also investigated in *E. coli* isolates, including type 1 fimbriae (*fimH*), S fimbria (*staD/E*), P fimbria (*papC*), and Dr binding adhesin (*afaB/C*). The most common gene was *fimH* (98.4%), a critical virulence factor of uropathogenic *E. coli* strains, which facilitates adhesion to uroepithelial proteins (Dale & Woodford, 2005). Bloodstream infections usually occur as a complication of urinary tract infections caused by this factor (Laupland, 2013). Moreover, statistical analysis of the tested *E. coli* isolates showed that the numbers of the virulence gene *sfaD/E* increased from 2014 to 2018 ( $p < 0.05$ ), but the *papC* rate decreased ( $p < 0.05$ ).

The virulence genes related to toxin and haemolysin production observed in this study were *sat*, *ibeA*, *cvaC*, *hlyA*, and *cnf1*. The most common was *sat* (53.3% of all isolates), which encodes secreted autotransporter toxin. This toxin has proteolytic activity and influences vacuolisation of urinary epithelial cells (Sarowska et al., 2019). Consequently, it is mostly associated with bacteraemic urinary tract infection. The second-most common toxin-encoding gene was *hlyA* (40.3% of all *E. coli* isolates), which encodes  $\alpha$ -haemolysin, a pore-forming bacterial exotoxin that may contribute to the virulence of bacteria during bloodstream infections and sepsis (Sonnen & Henneke, 2013). Moreover, statistical analysis of the tested *E. coli* isolates showed that the virulence genes *hlyA* and *cnf1* increased from 2014 to 2018 ( $p < 0.05$ ), but *cvaC* and *ibeA* rates decreased ( $p < 0.05$ ).

According to the phylogenetic group classification of the *E. coli* isolates, group A was the most common (79.3%). In the literature, B2 has been reported to be the most common phylogenetic group of pathogenic *E. coli* (Koga et al., 2014; Micenková et al., 2017), and this was corroborated by the results obtained in previous studies in Lithuania (Giedraitienė et al., 2017; Prakapaite et al., 2019). However, in this study, the B2 phylogroup comprised only 15.6% of all isolates, mostly those collected in 2018 (10 isolates from 2014 and 30 isolates from 2018). The same phylogenetic group pattern was observed in Romania, where group A was the dominant group, and group B2 was less prevalent (Usein et al., 2016). According to these data, group A isolates are usually strictly commensal strains found in the intestinal microbiota. Another study conducted by Fratamico et al. (2016) reported that isolates of groups B2

and D have higher virulence in humans, allowing them to induce extraintestinal infections in both healthy and immunocompromised hosts. However, the old classification system established by Clermont et al. (2000) was used in that study, and there was no distinction between groups D, E, and F; all strains were classified as group D. Conversely, in this study, a new classification system (Clermont et al., 2013) was used, and group D isolates were absent. However, group F isolates comprised 4.3% of all isolates. They contain the virulence genes *fimH* and *traT*, which are responsible for effective *E. coli* adhesion and host serum resistance, respectively.

Based on the BOX-PCR genotyping results, *E. coli* isolates were divided into 14 clusters. The most dominant cluster was Cluster 9 (20.3%). Cluster analysis showed that all isolates were genetically similar, with no significant differences associated with the collection year or healthcare institution. Furthermore, the genetic profiles of the isolates in each cluster contained a variety of virulence and resistance genes, and the presence of certain genes was not restricted to any specific cluster. However, in Cluster 9, the isolates collected in 2018 were more prevalent than those collected in 2014. A possible explanation for these results could be the successful genetic adaptation of bacteria over time and the dissemination of resistance genes, which can occur through transmission via medical staff, contaminated equipment, or patient transfer between healthcare institutions (Gurieva et al., 2018). These data are similar to previously reported results, indicating that clinical isolates of *E. coli* are spread via intra- and/or interhospital dissemination among Lithuanian healthcare institutions (Kirtikliene et al., 2019). Moreover, 17 BOX-PCR profiles contained two or three isolates. Further analysis via (GTG)<sub>5</sub>-PCR showed that all analysed isolates were genetically very similar; only one isolate from hospital XII (2137) had a significantly different genetic profile. Moreover, a detailed analysis of the 17 BOX-PCR profiles showed that two virulence genes, *fimH* and *fyuA*, were present in almost all isolates. Resistance genes found in all isolates included *bla<sub>AIM</sub>*, *fosA*, *sul2*, *strA*, and *tetA*, which are responsible for different antibiotic resistance mechanisms.

Another genotyping method, MLVA, was used to characterise the collected *E. coli* isolates in greater detail. Analysis of the MLVA profiles showed that all studied *E. coli* isolates could be divided into 47 MLVA profiles according to VNTR markers. The most common MLVA type was A47, which was observed in 131 isolates of *E. coli* (51.2% of all isolates). It was found that MLVA types A23 and A35 had a statistically significant dependency on healthcare institution III, types A25 and A26 on institution XII, and type A45 on healthcare institution VII.

VNTR marker analysis showed that the highest polymorphism levels in all *E. coli* isolates belonged to markers VR4 and VR7, and the lowest levels belonged to markers VR1, VR2, VR3, and VR6. Minimum spanning tree (MST) analysis showed that all MLVA types originated from one type of A32, which had isolates from almost all tested healthcare institutions (except institution IX), and then separated into two branches with genetically similar MLVA types.

To summarise the *Acinetobacter* spp. and *E. coli* analysis results, it can be argued that all isolates had their own specific resistance and virulence determinant combinations, genetic profiles, and origins. These results can be explained by the migration of different mobile genetic elements and the potential inter- and intrahospital transmission of the isolates. The results showed that both studied bacteria developed different strategies of antibiotic resistance, adapting to healthcare institution treatment strategies and the potential migration of patients from one healthcare institution to another. All these data can help improve epidemiological treatment in healthcare institutions in Lithuania and help predict further antibiotic resistance and virulence development mechanisms in *Acinetobacter* spp. and *E. coli* clinical isolates.

## CONCLUSIONS

1. Statistically significant changes in the resistance determinants in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. and *E. coli* depended on the year of isolation and origin in Lithuanian hospitals.

2. 45.9% of all *Acinetobacter* spp. isolates exhibited an antibiotic resistance gene combination of *bla*<sub>OXA subgroup-3</sub>-*bla*<sub>OXA subgroup-1</sub>-*bla*<sub>OXA51</sub>-*bla*<sub>OXA subgroup-2</sub>-*bla*<sub>OXA-subgroup-4</sub>-*bla*<sub>VIM-1</sub>-*bla*<sub>TEM-92</sub>, which are responsible for resistance to β-lactams.

3. The most common resistance gene combination in *E. coli* isolates was *tetA-strB-sul2-bla*<sub>TEM</sub>-*bla*<sub>NDM</sub>-*strA-fosA-bla*<sub>AIM</sub>-*sul3-aadA-bla*<sub>CTX-M-9</sub>, detected in 67.2% of all collected isolates and coded antibiotic resistance to tetracyclines (gene *tetA*), aminoglycosides (genes *strB*, *strA* and *aadA*), fosfomycin (gene *fosA*), sulphonamides (*sul2* and *sul3*) and β-lactams (genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>AIM</sub> and *bla*<sub>CTX-M-9</sub>). The most common virulence genes combination was *fyuA-fimH-iroN* (58.6% of all *E. coli* isolates).

4. Statistically significant changes in virulence determinants in *E. coli* isolates depending on the year of isolation were detected, but not on the origin in Lithuanian hospitals.

5. The degree of pathogenicity of the *E. coli* isolates was determined based on the analysis of phylogenetic groups. The majority of isolates (79.3%, phylogenetic group A) showed low virulence because they originated from the strict commensals of *E. coli*; however, isolates from other phylogenetic groups (B1-0.8%, B2-15.6%, and F-4.3%) showed high virulence in hospitalised patients.

6. Rep-PCR genotyping profiles of the analysed isolates showed relatedness to genetic clusters. *Acinetobacter* spp. isolates were divided into 191 genetic profiles and six relatedness clusters; *E. coli* isolates were divided into 235 genetic profiles and 14 relatedness clusters.

7. The variability of VNTR profiles varied depending on the year of isolation: the largest polymorphisms in the *Acinetobacter* spp. isolates from 2014 belonged to the VNTR marker Abaum\_0826, from 2016 to Abaum\_2396, and from 2018 to the marker Abaum\_2396. The largest polymorphisms in *E. coli* isolates, from 2014 belonged to the VNTR locus VR5 and from 2018 to the locus VR7. In addition, *E. coli* isolates showed the highest allele polymorphism in different hospitals with VNTR loci VR4 (in hospitals I, III, VI, XI, and XII), VR5 (in hospital VII), and VR7 (in hospitals II, IV, V, VIII, IX, and X), while *Acinetobacter* spp. isolates showed VNTR markers Abaum\_2396 (in hospitals IV, VII, VIII, and XIII), Abaum\_3468 (in

hospital V), Abaum\_0826 (in hospitals I, II, and VI), and Abaum\_0845 (in hospitals I, III, V, VI, VIII, X, and XI).

8. Analysis of the MLVA profiles revealed a MLVA profile change dependency on isolate relatedness, where all *Acinetobacter* spp. MLVA types branched off from one MLVA type A70 and VNTR allele profile:6-7-9-3-24-17-12-14, and *E. coli* MLVA types branched off from the A32 and VNTR profiles:9-0-6-10-5-0-0-0.

## REZIUMĖ

Šis darbas yra pirmasis Lietuvoje molekulinis epidemiologinis tyrimas, apimantis *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* kamienų įvairių antibiotikų grupių atsparumo genų vertinimą, virulentiškumo genų nustatymą ir filogenetinių tirtų izoliatų išskirstymą. Darbe apibūdinti 194 *Acinetobacter* spp. ir 256 *E. coli* daugiavaistų atsparumą skirtingų grupių antibiotikams turintys izoliatai, išskirti iš skirtingų ligoninių pacientų, kuriems buvo diagnozuotas sepsis.

Darbe buvo ištirtos dar Lietuvoje netirtos atsparumo genų grupės (atsparumą aminoglikozidams ir chinolonams, polimiksinui, efliuksos pompos reguliatorių bei karbapenemazes koduojantys genai), taip pat ištirti virulentiškumo genai bei papildyti jau padaryti tyrimai apie filogenetinių grupių pasiskirstymą Lietuvos ligoninėse, papildant šiuos duomenis platesniu ligoninių skaičiumi bei didesne imtimi. Buvo nustatyta, kad *Acinetobacter* spp. izoliatuose dominavo atsparumo genų derinys *bla*<sub>OXA</sub> *subgrupė-3-bla*<sub>OXA</sub> *subgrupė-1-bla*<sub>OXA51-bla</sub><sub>OXA</sub> *subgrupė-2-bla*<sub>OXA</sub> *subgrupė-4-bla*<sub>VIM-1-bla</sub><sub>TEM-92</sub>, kuris kodavo β-laktaminių antibiotikų atsparumo mechanizmus. Tuo tarpu *E. coli* dominavo atsparumo genų derinys *tetA-strB-sul2-bla*<sub>TEM</sub> *bla*<sub>NDM-strA-fosA-bla</sub><sub>AIM-sul3-aadA-bla</sub><sub>CTX-M-9</sub>, kuris kodavo atsparumo tetraciklinams, β-laktaminams antibiotikams, aminoglikozidams ir fosfomicinui atsparumo mechanizmus. Be to, dažniausias virulentiškumo genų derinys *E. coli* izoliatuose buvo *fyuA-fimH-iroN*, kuris kodavo sideroforus (*fyuA* ir *iroN* genai) bei I tipo fimbriją (*fimH*), reikalingą patogeno adhezijai. *E. coli* izoliatuose, įvertinus filogenetinių grupių pasiskirstymą, buvo nustatyta, kad visus tirtus izoliatas buvo galima suskirstyti į keturias filogenetines grupes: A, B1, B2 ir F, kur daugiausiai izoliatų (79,3 % visų izoliatų) buvo priskirti iš griežtų komensalų kilusiai grupei A, ir labai patogeniškoms grupėms B2 (15,6 %), F (4,3 %) ir grupei B1 (0,8 %).

Iki šiol Lietuvoje nebuvo vertinamas *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* pasiskirstymas ligoninėse bei izoliatų genetiniai pokyčiai tarp skirtingų metų. Šio darbo rezultatai parodė faktinį tirtų izoliatų plitimą, galimą kilmę bei kamienų kaitą skirtingais metais. Remiantys rep-PGR rezultatais sudarytos dendrogramos parodė, kad visus tirtus *Acinetobacter* spp. izoliatas galima suskirstyti į 191 genetinius profilius, kurie priklauso 6 giminingiems klasteriams. Tirti *E. coli* izoliatai buvo suskirstyti į 235 genetinius profilius ir sugrupuoti į 14 giminingumo klasterių. Taip pat darbe buvo įvertinta atsparumo ir virulentiškumo genų priklausomybė nuo susidariusių genotipavimo profilių bei klasterių, kas leido stebėti galimą atsparumo ir virulentiškumo determinacijų kaitą. Šiame darbe buvo nustatyti ir apibūdinti MLVA genotipavime naudoti VNTR profiliai, kurie galėtų būti taikomi



vertinant potencialią daugiavaisčiu atsparumu pasižyminčių *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* kamienų kaitą ateityje, kas padėtų ligoninėms imtis tinkamų infekcijų prevencijos strategijų bei užkirsti kelią tolimesniai hospitalinių patogenų genetinei kaitai.

## REFERENCES

1. Aliakbarzade, K., Farajnia, S., Nik, A. K., Zarei, F., & Tanomand, A. (2014). Prevalence of aminoglycoside resistance genes in *Acinetobacter baumannii* isolates. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(10).
2. Alyamani, E. J., Khiyami, A. M., Booq, R. Y., Majrashi, M. A., Bahwerth, F. S., & Rechkina, E. (2017). The occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 1-13.
3. Amin, M., Navidifar, T., Shooshtari, F. S., & Goodarzi, H. (2019). Association of the genes encoding metallo- $\beta$ -lactamase with the presence of integrons among multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1171.
4. Ananias, M., & Yano, T. (2008). Serogroups and virulence genotypes of *Escherichia coli* isolated from patients with sepsis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(10), 877-883.
5. Benzerara, Y., Gallah, S., Hommeril, B., Genel, N., Decré, D., Rottman, M., & Arlet, G. (2017). Emergence of plasmid-mediated fosfomycin-resistance genes among *Escherichia coli* isolates, France. *Emerging Infectious Diseases*, 23(9), 1564.
6. Bergogne-Berezin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148-165.
7. Blake, D. P., Hillman, K., Fenlon, D. R., & Low, J. C. (2003). Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogenic members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 428-436.
8. Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C. L., Reid-Smith, R., Heather Lim, N. J., Nicholson, V., ... & Archambault, M. (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6753-6761.
9. Bozcal, E., Eldem, V., Aydemir, S., & Skurnik, M. (2018). The relationship between phylogenetic classification, virulence and antibiotic resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in İzmir province, Turkey. *PeerJ*, 6, e5470.
10. Cheon, S., Kim, M. J., Yun, S. J., Moon, J. Y., & Kim, Y. S. (2016). Controlling endemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units using antimicrobial stewardship and infection control. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 31(2), 367.

11. Cheung, T. K. M., Chu, Y. W., Chu, M. Y., Ma, C. H., Yung, R. W. H., & Kam, K. M. (2005). Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(3), 586-589.
12. Chmielarczyk, A., Pilarczyk-Żurek, M., Kamińska, W., Pobięga, M., Romaniszyn, D., Ziółkowski, G., ... & Bulanda, M. (2016). Molecular epidemiology and drug resistance of *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitals in southern Poland: ICU as a risk factor for XDR strains. *Microbial Drug Resistance*, 22(4), 328-335.
13. Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555-4558.
14. Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65.
15. Daga, A. P., Koga, V. L., Soncini, J. G. M., de Matos, C. M., Perugini, M. R. E., Pelisson, M., Kobayashi R. K. T., & Vespero, E. C. (2019). *Escherichia coli* bloodstream infections in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 191.
16. Daigle, F., Harel, J., Fairbrother, J. M., & Lebel, P. (1994). Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(4), 286-291.
17. Dale, A. P., & Woodford, N. (2015). Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6), 615-626.
18. Dijkshoorn, L. (2013). *Acinetobacter baumannii*. In *Molecular Typing in Bacterial Infections* (pp. 433-456). Humana Press, Totowa, NJ.
19. Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45(1), 88-94.
20. Dombek, P. E., Johnson, L. K., Zimmerley, S. T., & Sadowsky, M. J. (2000). Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2572-2577.
21. Domínguez, E., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Briñas, L., & Torres, C. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli*

- isolates obtained from healthy children in Spain. *Microbial Drug Resistance*, 8(4), 321-327.
22. ECDC. (2020). Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—Annual Epidemiological Report for 2019.
  23. Endimiani, A., Luzzaro, F., Migliavacca, R., Mantengoli, E., Hujer, A. M., Hujer, K. M., ... & Toniolo, A. (2007). Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2211-2214.
  24. Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Conejo, M. C., Ayala, J. A., Perea, E. J., & Pascual, A. (2003). Relationship between  $\beta$ -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 565-574.
  25. Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 644.
  26. Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S., & Sader, H. S. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 699-702.
  27. Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2565-2571.
  28. Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Pavilionis, A., Patamsytė, V., Genel, N., Decre, D., & Arlet, G. (2017). Prevalence of O25b-ST131 clone among *Escherichia coli* strains producing CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-92  $\beta$ -lactamases. *Infectious Diseases*, 49(2), 106-112.
  29. Gurieva, T., Dautzenberg, M. J., Gniadkowski, M., Derde, L. P., Bonten, M. J., & Bootsma, M. C. (2018). The transmissibility of antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in intensive care units. *Clinical Infectious Diseases*, 66(4), 489-493.
  30. Harris, A. M., & DeGiorgio, M. (2017). An unbiased estimator of gene diversity with improved variance for samples containing related and inbred individuals of any ploidy. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(2), 671-691.
  31. Héritier, C., Poirel, L., Lambert, T., & Nordmann, P. (2005). Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to

- carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3198-3202.
32. Hu, Y., Li, B., Jin, D., Cui, Z., Tao, X., Zhang, B., & Zhang, J. (2013). Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis typing of *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(4), 1263-1268.
  33. Hujer, K. M., Hujer, A. M., Hulten, E. A., Bajaksouzian, S., Adams, J. M., Donskey, C. J., ... & Bonomo, R. A. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(12), 4114-4123.
  34. Jauréguy, F., Carbonnelle, E., Bonacorsi, S., Clec'h, C., Casassus, P., Bingen, E., Picard, B., Nassif, X., & Lortholary, O. (2007). Host and bacterial determinants of initial severity and outcome of *Escherichia coli* sepsis. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(9), 854-862.
  35. Johnson, J. K., Robinson, G. L., Zhao, L., Harris, A. D., Stine, O. C., & Thom, K. A. (2016). Comparison of molecular typing methods for the analyses of *Acinetobacter baumannii* from ICU patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 86(4), 345-350.
  36. Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(1), 261-272.
  37. Kawamori, F., Hiroi, M., Harada, T., Ohata, K., Sugiyama, K., Masuda, T., & Ohashi, N. (2008). Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157: H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE. *Journal of Medical Microbiology*, 57(1), 58-63.
  38. Kirtikliene, T., Naugzemys, D., Steponkiene, A., Bogdevic, R., Vizuje, G., Zvingila, D., & Kuisiene, N. (2019). Evaluation of the Inter-and Intrahospital Spread of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Lithuanian Hospitals. *Microbial Drug Resistance*, 25(3), 326-335.
  39. Koczura, R., Przystlakowska, B., Mokracka, J., & Kaznowski, A. (2014). Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance of Clinical *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* Complex in Poznań, Poland. *Current Microbiology*, 69(3), 258-262.
  40. Koga, V. L., Tomazetto, G., Cyoia, P. S., Neves, M. S., Vidotto, M. C., Nakazato, G., & Kobayashi, R. K. (2014). Molecular screening of

- virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. *BioMed Research International*, 2014.
41. Laupland, K. B. (2013). Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6), 492-500.
  42. Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296.
  43. Li, Y., Li, Q., Du, Y., Jiang, X., Tang, J., Wang, J., Li, G., & Jiang, Y. (2008). Prevalence of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in a Chinese university hospital from 2003 to 2005: first report of CMY-2-type AmpC  $\beta$ -lactamase resistance in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1317-1321.
  44. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168.
  45. Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3375-3380.
  46. Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., & Lambert, T. (2004). Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3298-3304.
  47. Miajlovic, H., Mac Aogain, M., Collins, C. J., Rogers, T. R., & Smith, S. G. (2016). Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. *Journal of Medical Microbiology*, 65(1), 71-79.
  48. Micenková, L., Beňová, A., Frankovičová, L., Bosák, J., Vrba, M., Ševčíková, A., Kmeťová, M., & Šmajš, D. (2017). Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(3), 182-189.
  49. Moniri, R., Farahani, R. K., Shajari, G., Shirazi, M. N., & Ghasemi, A. (2010). Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance in

- Acinetobacter* spp. With emergence of multidrug-resistant strains. *Iranian Journal of Public Health*, 39(2), 63.
50. Mora-Rillo, M., Fernández-Romero, N., Navarro-San Francisco, C., Díez-Sebastián, J., Romero-Gómez, M. P., Arnalich Fernández, F., López, J. R. A., & Mingorance, J. (2015). Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence*, 6(1), 93-100.
  51. Moubareck, C., Brémont, S., Conroy, M. C., Courvalin, P., & Lambert, T. (2009). GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(8), 3579-3581.
  52. Najar-Peerayeh, S., & Karmostaji, A. (2019). Evaluation of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat (MLVA-8 Or-say) for Typing of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients in Tehran, Iran. *Arch. Clin. Infect. Dis*, 14, e64402.
  53. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.
  54. Nigro, S. J., & Hall, R. M. (2016). Loss and gain of aminoglycoside resistance in global clone 2 *Acinetobacter baumannii* in Australia via modification of genomic resistance islands and acquisition of plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(9), 2432-2440.
  55. Noori, M., Karimi, A., Fallah, F., Hashemi, A., Alimehr, S., Goudarzi, H., & Aghamohammad, S. (2014). High Prevalence of Metallo-beta-lactamase Producing *Acinetobacter*. *Arch Pediatr*, 2(3), e15439.
  56. Owrangi, B., Masters, N., Kuballa, A., O'Dea, C., Vollmerhausen, T. L., & Katouli, M. (2018). Invasion and translocation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(5), 833-839.
  57. Pasterán, F., Rapoport, M., Petroni, A., Faccone, D., Corso, A., Galas, M., Vázquez, M., Procopio, A., Tokumoto, M., & Cagnoni, V. (2006). Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* strains in the Americas. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3222-3224.
  58. Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 826-836.
  59. Poirel, L., Rodriguez-Martinez, J. M., Mammari, H., Liard, A., & Nordmann, P. (2005). Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3523-3525.

60. Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119-123.
61. Potron, A., Poirel, L., Croizé, J., Chantepedrix, V., & Nordmann, P. (2009). Genetic and biochemical characterization of the first extended-spectrum Carb-type ss-lactamase, RTG-4, from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 3010-3016.
62. Pourcel, C., Minandri, F., Hauck, Y., d'Arezzo, S., Imperi, F., Vergnaud, G., & Visca, P. (2011). Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 539-548.
63. 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(5), 1000-1006.
64. Prakapaite, R., Saab, F., Planciuniene, R., Petraitis, V., Walsh, T. J., Petraitiene, R., Semoskaite, R., Baneviciene, R., Kalediene, L., & Kavaliauskas, P. (2019). Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals emergence of drug resistant O15, O22 and O25 serogroups. *Medicina*, 55(11), 733.
65. Rafei, R., Osman, M., Dabboussi, F., & Hamze, M. (2019). Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiology*, 14(12), 1065-1080.
66. Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151-171.
67. Ribeiro-Gonçalves, B., Francisco, A. P., Vaz, C., Ramirez, M., & Carriço, J. A. (2016). PHYLOViZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W246-W251.
68. Romanin, P., Palermo, R. L., Cavalini, J. F., Favaro, L. D. S., De Paula-Petroli, S. B., Fernandes, E. V., ... & Yamauchi, L. M. (2019). Multidrug-and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary hospital from Brazil: The importance of carbapenemase encoding genes and epidemic clonal complexes in a 10-year study. *Microbial Drug Resistance*, 25(9), 1365-1373.



69. Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection*, 5(5), 449-456.
70. Saffari, F., Monsen, T., Karmostaji, A., Azimabad, F. B., & Widerström, M. (2017). Significant spread of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes of clonal complex 92 among intensive care unit patients in a university hospital in southern Iran. *Journal of Medical Microbiology*, 66(11), 1656-1662.
71. Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmieciak, A., Frej-Madrzak, M., Ksiaczczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens*, 11(1), 1-16.
72. Sepp, E., Andreson, R., Balode, A., Bilozor, A., Brauer, A., Egorova, S., ... & Naaber, P. (2019). Phenotypic and molecular epidemiology of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Escherichia coli* in Northern and Eastern Europe. *Frontiers in Microbiology*, 2465.
73. Shokri, D., Khorasgani, M. R., Fatemi, S. M., & Soleimani-Delfan, A. (2017). Resistotyping, phenotyping and genotyping of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) among Gram-negative bacilli from Iranian patients. *Journal of Medical Microbiology*, 66(4), 402-411.
74. Sonnen, A. F. P., & Henneke, P. (2013). Role of pore-forming toxins in neonatal sepsis. *Clinical and Developmental Immunology*.
75. Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J., & De Champs, C. (2008). First report of qnrB-producing *Enterobacter cloacae* and qnrA-producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(3), 287-290.
76. Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M. F. I., Babini, G. S., Douboyas, J., & Livermore, D. M. (2000). Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1290-1292.
77. Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., & Pitt, T. L. (2006). The role of IS Aba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 72-77.
78. Usein, C. R., Papagheorghe, R., Oprea, M., Condei, M., & Străuț, M. (2016). Molecular characterization of bacteremic *Escherichia coli* isolates in Romania. *Folia Microbiologica*, 61(3), 221-226.

79. Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), 25-40.
80. Wachino, J. I., & Arakawa, Y. (2012). Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resistance Updates*, 15(3), 133-148.
81. Xu, C. F., Bilya, S. R., & Xu, W. (2019). adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbes and New Infections*, 30, 100549.
82. Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(2), 85-90.
83. Yamane, K., Wachino, J. I., Suzuki, S., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Kimura, K., Kai, K., Ishikawa, S., Ozawa, Y., Konda, T., & Arakawa, Y. (2007). 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), 642.
84. Zhang, L. P., Xue, W. C., & Meng, D. Y. (2016). First report of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 5 (NDM-5)-producing *Escherichia coli* from blood cultures of three leukemia patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 42, 45-46.

## PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei prof. dr. Nomedai Kuisienei už suteiktą galimybę atlikti tyrimus laboratorijoje, taip pat už vertingas diskusijas ir pastabas rengiant straipsnius ir šį darbą, už kantrybę bei nuoširdžią pagalbą viso vadovavimo darbui metu.

Noriu padėkoti NVSPL Klinikinių tyrimų skyriaus Bakteriologinių tyrimų poskyrio kolektyvui už suteiktus klinikinius *Acinetobacter* spp. ir *E. coli* izoliatus bei už pagalbą kultivuojant tyriamuosius mikroorganizmus.

Dėkoju visam GMC Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedros kolektyvui už įvairiapusę pagalbą bei naudingas diskusijas darbo rengimo metu.

Galiausiai noriu padėkoti visai savo šeimai už rūpestį bei palaikymą. Ypatingai dėkoju savo vyrui Tautvydui Kirtikliui, kurio nuolatinis palaikymas suteikė jėgų viso darbo rengimo metu bei be kurio patarimų ir pagalbos šis darbas nebūtų pabaigtas.

## PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

- **Kirtikliene, T.**, Mierauskaitė, A., Razmienė, I., & Kuisiene, N. (2021). Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Genetic Characterization and Spread in Lithuania in 2014, 2016, and 2018, *Life (Basel)*, 11(2), 151.
- **Kirtikliene T.**, Mierauskaitė A., Razmienė I., Kuisiene N. (2022). Genetic Characterization of Multidrug-Resistant *E. coli* Isolates from Bloodstream Infections in Lithuania, *Microorganisms*, 10(2):449.

### Kitos publikacijos:

- **Kirtikliene, T.**, Naugzemys, D., Steponkiene, A., Bogdevic, R., Vizuje, G., Zvingila, D., & Kuisiene, N. (2019). Evaluation of the Inter-and Intrahospital Spread of Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria in Lithuanian Hospitals, *Microbial Drug Resistance*, 25(3), 326-335.

### Konferencijos tezės

#### Stendiniai pranešimai

- **Kirtikliene T.**, Kuisiene N. „*Antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria in Lithuanian healthcare institutions: analysis of clinical cases*“, 4<sup>th</sup> Congress of Baltic Microbiologists, 2018 09 10-12, Gdanskas, Lenkija.
- **Kirtikliene T.**, Kuisiene N. „*Acinetobacter spp. resistance to antimicrobial agents and genes distribution in Lithuanian healthcare institutions*“; Vita Scientia 2020, 2020 01 03, Vilnius, Lietuva.
- **Kirtikliene T.**, Kuisiene N. „*Multidrug resistant Acinetobacter spp.: clinical cases in Lithuania*“; 6th Young Microbiologists Symposium 2020, 2020 09 26-27, online režimu (originaliai konferencija turėjo vykti Didžiojoje Britanijoje).

#### Finansinė parama

Lietuvos mokslo tarybos Konkursinės doktorantūros projektas „Patogeninių mikroorganizmų virulentiškų kamienų charakteristikų ir plitimo dinamikos tyrimai molekulinės epidemiologijos aspektu“, Nr. KD-17072. Projekto vadovė prof. N. Kuisienė (2017–2021).

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 20 egz.