

VILNIAUS UNIVERSITETO  
MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

**Laboratorinės diagnostikos metodų, nustatančių *Enterobacteriaceae* šeimos plataus veikimo  $\beta$ -laktamazių fenotipą, palyginimas bei šių fermentų paplitimo analizė Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008 – 2010 metais**

Magistrantė SANDRA KAREIVIENĖ

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovė Dr. SILVIJA KIVERYTĖ

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja  
hab.dr.prof. Z.A. Kučinskienė

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data

Registracijos Nr.

Vilnius 2011

## TURINYS

|   |    |
|---|----|
| SANTRUMPOS .....  | 4  |
| ĮVADAS .....  | 5  |
| DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI .....   | 6  |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA .....   | 7  |
| 1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> šeima .....  | 7  |
| 1.1.1. Antigeninė struktūra ir virulentiškumas .....  | 8  |
| 1.1.2. Sukeliamos infekcijos .....  | 9  |
| 1.1.3. Diagnostika .....  | 10 |
| 1.1.4. Jautrumas antibiotikams .....  | 10 |
| 1.2. β-laktamazių tipai .....   | 11 |
| 1.2.1. Bush'o klasifikacija .....   | 12 |
| 1.2.2. β-laktamazių klasės .....  | 14 |
| 1.2.3. PVBLazių tipai .....   | 15 |
| 1.3. <i>Enterobacteriaceae</i> šeimos atsparumo beta-laktaminiams antibiotikams mechanizmai .....                                 | 16 |
| 1.3.1. Gramneigiamų bakterijų atsparumo mechanizmai .....   | 18 |
| 1.3.1.1. Atsparumas dėl PPB .....   | 18 |
| 1.3.1.2. Atsparumas β-laktamams dėl sumažėjusio išorinės membranos pralaidumo .....   | 19 |
| 1.3.1.3. Atsparumas dėl β-laktamazių .....  | 20 |
| 1.3.1.4. Aktyvaus transporto iš ląstelės sistema .....  | 21 |
| 1.3.1.5. Genetiniai atsparumo mechanizmai .....   | 22 |
| 1.4. Hospitalinių infekcijų, sukeltų gramneigiamų bakterijų, gaminančių plataus veikimo β-laktamazės (PVBLazės), paplitimas ..... | 22 |
| 1.5. Plataus veikimo β-laktamazių (PVBLazių) nustatymo metodai .....  | 24 |
| 1.5.1. Diskų difuzijos metodo charakteristikos .....  | 26 |
| 1.5.2. Dvigubos difuzijos metodas .....   | 27 |
| 1.5.3. Kombinuotas diskų difuzijos metodas .....  | 28 |
| 1.5.4. E testo metodas .....  | 29 |
| 1.5.5. Automatizuoti metodai .....  | 30 |
| 1.5.5.1. Phoenix automatizuota sistema .....  | 30 |
| 1.5.5.2. VITEK2 automatizuota sistema .....   | 31 |
| 1.5.5.3. Automatizuotų sistemų palyginamosios studijos .....  | 31 |
| 1.5.6. Dviejų etapų PVBL nustatymo metodas .....  | 32 |
| 2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI .....   | 34 |
| 2.1. Tyrimų medžiaga .....  | 34 |
| 2.2. Mitybinės terpės .....   | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3. Grynųjų mikroorganizmų kultūrų išskyrimas.....  | 36 |
| 2.4. Kultūros inokuliacija jautrumo antibiotikams tyrimui.....   | 37 |
| 2.5. Antibakterinės medžiagos diskai .....   | 37 |
| 2.6. Fenotipiniai PVBL nustatymo metodai .....   | 38 |
| 2.6.1. Kombinuotas diskų difuzijos metodas.....  | 38 |
| 2.6.2. Dvigubos difuzijos metodas .....  | 39 |
| 2.6.3. Bakterijų, gaminančių PVBL, identifikavimas automatizuota Phoenix sistema .....                       | 40 |
| 2.7. Palyginamasis diagnostinių metodų įvertinimas .....   | 42 |
| 2.8. Statistinė analizė.....   | 43 |
| 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....   | 44 |
| 3.1.1. PVBLazių gamybos fenotipo tyrimas diskų difuzijos metodais.....                                       | 44 |
| 3.1.2. PVBL fenotipą nustatančių diskų difuzijos metodų diagnostinės charakteristikos .....                  | 46 |
| 3.1.3. PVBLazių paplitimas Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008-2010 metais .....      | 47 |
| 3.2. Rezultatų aptarimas.....  | 50 |
| 3.2.1. Phoenix automatizuotos sistemos ir diskų difuzijos metodų palyginimas .....                           | 50 |
| 3.2.2. 2008-2010 metų PVBLazių paplitimo analizė Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose ..... | 53 |
| IŠVADOS .....  | 56 |
| SUMMARY.....   | 57 |
| PADĖKA.....  | 58 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS.....   | 59 |

## SANTRUMPOS

**µg/ml** – mikrogramai mililitre

**AMC** – amoksicilinas su klavulanine rūgštimi

**ATM** – aztreonamas

**BD** – Becton Dickenson

**CAZ** – ceftazidimas

**CAZ/CLA** – ceftazidimas su klavulanine rūgštimi

**CPD** – cefpodoksimas

**CRO** – cefriaksonas

**CTX** – cefotaksimas

**FEP** – cefepimas

**HI** – hospitalinės infekcijos

**HP** – hospitalinė pneumonija

**ID** – identifikavimas

**IMP** – imipenemas

**ITS** – intensyvios terapijos skyrius

**JAT** – jautrumo antibiotikams tyrimas

***K. pneumoniae*** – *Klebsiella pneumoniae*

**KLSI** – Klinikinių ir Laboratorinių Standartų institutas

**LPS** – lipopolisacharidai

**MBLs** – metalo-β-laktamazės

**MSK** – minimali slopinanti koncentracija

**NNIS** – (angl. *National Nosocomial Infections Surveillance System*) - nacionalinė hospitalinių infekcijų priežiūros sistema

**PPB** – peniciliną prijungiantis baltymas

**PVBL** – (angl. *Extended-spectrum beta-lactamases*) - plataus veikimo β-laktamazės

## IVADAS

Antibakterinių vaistų era prasidėjo praėjusio šimtmečio 3-iajame dešimtmetyje, Flemingui išskyrus peniciliną. Per kelis dešimtmečius buvo išskirta ir susintetinta daugiau kaip šimtas skirtingų antibakterinių vaistų, kurie išgelbėjo milijonus žmonių gyvybių. Bet pasirodė, kad mikroorganizmai geba prisitaikyti prie esamų sąlygų. Jų atsparumas antibakteriniams vaistams nuolat didėja ir tiesiogiai priklauso nuo vartojamų antibakterinių vaistų ir jų kiekio. Mikroorganizmai yra gyvi organizmai, kurie greitai prisitaiko prie naujų sąlygų, taigi mažai tikėtina, kad jų atsparumas nedidės. Tačiau šis procesas bus daug lėtesnis ir kontroliuojamas, jeigu antibakteriniai vaistai bus skiriami racionaliai – tik tada kai būtina, parenkant tinkamus antibakterinius vaistus, reikiamą jų dozę ir optimalią vartojimo trukmę [1].

Europos epidemiologijos priežiūros (EARS-Net) ir kitų pasaulio šalių duomenimis daugėja *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų, tokių kaip *Escherichia coli* ir *Klebsiella pneumoniae*, kurios yra atsparios antibiotikams. Šios bakterijos, kurios yra ir normali žmogaus žarnyno flora, dažnai sukelia šlapimo takų, kraujo ar kitas infekcijas. Tarp *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų stebimas padažnėjęs atsparumas cefalosporinams, kurių sukelia plataus veikimo beta-laktamazės (PVBL). Dėl šios priežasties tenka dažniau vartoti plataus spektro antibiotikus, tokius kaip karbapenemai. Tačiau bakterijoms įgijus naujų genų ir tapus atsparioms karbapenemams, šie antibiotikai irgi nebegali būti vartojami [24].

Taigi, labai svarbu parinkti tinkamą antibakterinį preparatą gydymui. Todėl svarbūs yra PVBLazių nustatymo metodai ir jų parinkimas. Pagrindinis bakterijų jautrumo antibakteriniams preparatams tyrimo tikslas – numatyti gydymo rezultatus.

Šis darbas yra skirtas palyginti laboratorinės diagnostikos metodus, nustatančius PVBL-azes gaminančių bakterijų fenotipą: kombinuotą diskų difuzijos ir dvigubos difuzijos metodus su automatizuota Phoenix sistema. Išanalizuoti PVBLazių paplitimą Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008 - 2010 metais.

Darbas atliktas Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Mikrobiologijos laboratorijoje.

## DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

**Darbo tikslas** - Palyginti antibiotikų diskų difuzijos ir automatizuotą metodus, nustatančius plataus veikimo  $\beta$ -laktamazes (PVBLazes) gaminančių bakterijų fenotipą ir įvertinti PVBL paplitimą Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008-2010 metais.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Nustatyti *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų PVBL gamybos fenotipą kombinuotu diskų difuzijos ir dvigubos difuzijos metodais.
2. Palyginti diskų difuzijos metodus, nustatančius PVBL fenotipą, su automatizuota Phoenix sistema.
3. Įvertinti ir išanalizuoti bakterijų gaminančių PVBLazes paplitimo svyravimus Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose (VUL SK) 2008-2010 metais.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. *Enterobacteriaceae* šeima

*Enterobacteriaceae* – heterogeniška gramneigiamų bakterijų grupė, kurių dauguma yra normalioji žmonių ir gyvūnų žarnyno mikroflora. Tam tikros jų rūšys yra antriniai nuosaikieji (opurtunistiniai) patogenai [44]. *Enterobacteriaceae* rūšių skaičius yra skaičiuojamas šimtais, galbūt net tūkstančiais. Jų nustatoma vis daugiau dėka DNR hibridizacijos ir 16S RNR sekvenavimo. Šie metodai yra naudojami išskiriant padermes iš žmogaus, gyvūnų ir augalų [40].

Daugumai *Enterobacteriaceae* šeimos genčių ir rūšių būdingi požymiai: tai gramneigiamos lazdelės, nesudaro sporų, yra judrios, turinčios žiuželius, arba nejudrios, auga peptono terpėje arba mėsos terpėje be priedų ir papildų arba be natrio chlorido. Nepalankiomis sąlygomis sudaro kapsules. *Klebsiella* genties bakterijų kapsulės didelės. Jos sudaromos organizme ir mitybinėse terpėse. Kitų genčių bakterijų kapsulės dažniausiai gaminamos tik organizme. Gerai auga Mac Conkey agare, auga aerobinėmis ir anaerobinėmis sąlygomis, dažnai yra biochemiškai aktyvios, fermentuoja D gliukozę ir kitus cukrus, dažnai produkuodamos dujas, yra katalazei teigiamos ir oksidazei neigiamos, redukuoja nitratų į nitritus, savo sudėtyje turi enterobakterijoms dažną antigeną ir DNR sudėtyje turi 39-59% guanino ir citozino. Tai yra prie šeimininko prisitaikančios rūšys, kurias yra sunku kultivuoti (dauginti), kai kurioms rūšims apskritai būdingas lėtas augimas. Evoliuciniu požiūriu rūšys ir gentys šeimoje yra labai susijusios su *E.coli* [40].

*Enterobacteriaceae* bakterijos gali keistis genetinė informacija konjugacijos būdu – perduodant tam tikrą plazmidę ir vykstant transdukcijai, ir transformacijai. Genetinis bakterijų panašumas lengvina šiuos vyksmus. Toks greitas genetinės informacijos kitimas paaiškina genų, koduojančių atsparumą antimikrobinėms medžiagoms, toksinų, kolonizavimo veiksnių, svarbių virulentiškumo veiksnių sintezę ir išplitimą. Virulentiškumo ir atsparumo antibiotikams genai gali būti perduoti normaliajai mikroflorai, kuri tokiu būdu tampa nepageidaujamos genetinės medžiagos šaltiniu [44].

Naujos rūšys priskiriamos *Enterobacteriaceae* šeimai: žmogui pavojingas patogenas - *Klebsiella granulomatis* sukelia kirkšninę granulomą, kitos naujai atrastos rūšys yra labiau susijusios su augalų infekcijomis. *Klebsiella granulomatis* neauga daugumoje bakteriologiniu terpių. Naujai atrasti organizmai yra beveik identiški senesniems pagal savo fenotipinius požymius: pvz: *Klebsiella varriicola* yra labai sunkiai diferencijuojama nuo *Kl. pneumoniae* ir

kitų *Klebsiella* spp. rūšių. Dauguma naujai aprašytų organizmų labai retai aptinkami žmonių klinikiniuose ėminiuose [40].

### 1.1.1. Antigeninė struktūra ir virulentiškumas

*Enterobacteriaceae* bakterijos turi kompleksą antigenų, kurie skirstomi į somatinius (O), kapsulės (K) ir žiuželių (H) antigenus. „O“ antigenai yra ląstelės sienelės išorinės membranos lipopolisacharidų (LPS) dalis, saviti tam tikrai rūšiai ir tam tikrai serogrupei. Juos sudaro pasikartojančios polisacharidinės grandinės [44]. LPS esantis lipidas A – gramneigiamųjų bakterijų endotoksinas. LPS toksiškumas priklauso nuo A lipido struktūros, kuri visose gramneigiamose bakterijose yra vienoda. LPS yra bakterijų sienelėje, ir tik jai suirus patenka į aplinką. Maži kiekiai nėra labai nuodingi, o dideli gali sukelti šoką [32]. Endotoksinai sukelia pirogeninę reakciją, hipotenziją, DIK sindromą, trombozę, kraujavimą, leukopeniją, leukocitozę. Patofiziologinis endotoksino veikimas susijęs su makrofagų ir kitų ląstelių, komplemento sistemos, Hagemano faktoriaus aktyvinimu, citokinų gamyba aktyvintose ląstelėse [44].

Enterobakterijos gamina ir egzotoksinius – enterotoksinius, hemolizinius toksinus, kurių sintezę kontroliuoja nuosaikieji fagai ar plazmidės. Kai kurios *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos gali turėti keletą „O“ antigenų frakcijų, bendrų skirtingoms gentims ir rūšims. K antigenų turi tik tos bakterijos, kurios sudaro kapsules – tai kapsulės antigenai, jie yra neatsparūs temperatūrai (termolabilūs) [44].

*K. pneumoniae* padermių patogeniškumą lemia polisacharidinė kapsulė [43]. Kapsulė atlieka adhezijos ir antifagocitines funkcijas ir jungiasi prie savitųjų ląstelių taikinių receptorių [44]. Storas kapsulės fibrininis pluoštas dengia bakterijos paviršių ir apsaugo *K.pneumoniae* nuo polimorfonuklearų fagocitozės ir serumo baktericidinio poveikio. *In vitro* įrodyta, kad kapsulės polisacharidai slopina makrofagų gebėjimą atpažinti sukėlėją. Tačiau nustatyta, kad kapsulę sintezuojančios *K.pneumoniae* padermės silpniau geba prisitvirtinti prie epitelio ląstelių [49]. *K. pneumoniae* virulentiškumas skiriasi dėka kapsulės tipų. Eksperimentiniame modelyje su pelėmis įrodyta, *K.pneumoniae* padermės, savo struktūroje turinčios kapsulės K1 ir K2 antigenus, yra virulentiškesnės nei kitų serotipų *K.pneumoniae* padermės [36]. H. Sahly studijų duomenimis patogeniškas *K.pneumoniae* K2 serotipas dažniau nustatytas tarp PVBL gaminančių padermių palyginti su PVBL negaminančiomis *K. pneumoniae* padermėmis [47]. Žmogaus kvėpavimo takų infekcijas dažniau sukelia K1 ir K2, o šlapimo takų – K8, K9, K10 ir K24 antigenus turinčios *Klebsiella* spp. [44].



Adhezijos ir kolonizavimo veiksniai svarbūs bakterijoms prisitvirtinant prie ląstelių ir audinių, taip pat konjugacijai. Pilės yra adhezijos veiksniai, kurie saviti žarnyno arba šlapimo takų ląstelių receptoriams. Be jų, adhezijai svarbūs ir O antigenai – išorinės membranos baltymai [44].

Daugelis gramneigiamų bakterijų sintetina bakteriocinus, žalingai veikiančius tos pačios ar giminingų rūšių bakterijas. Jų sintezę kontroliuoja plazmidės. Kolicinus gamina *E.coli*, marcescinius – seracijos. Bakteriocinus sintetinančios bakterijos atsparios savo pačių bakteriocinų poveikiui, o rūšies gaminami bakteriocinai turi daug tipų (cintipų) [44].

Enterobakterijų sekrecinės sistemos baltymai prisijungę prie eukariotinių ląstelių padeda bakterijoms įterpti virulentiškumo veiksnius į ląstelės vidų, tokiu būdu sustiprina sąveiką su jos membrana. Genai, koduojantys tokius baltymus, susitelkę „patogeniškumo salų“ regione, dažniau plazmidėje. Plazmidės gali būti perduotos kitoms bakterijoms [44].

### 1.1.2. Sukeliamos infekcijos

*Enterobacteriaceae* šeimos atstovai yra plačiai paplitę augaluose ir dirvožemyje, vandenyje, gyvūnų ir žmonių virškinimo trakte. Kai kurios rūšys paplitusios labai siaurose ekologinėse nišose. *Salmonella* serotipas *Typhi* sukelia tifoidinę karštinę ir randamas tik žmonėms, tuo tarpu *Klebsiella pneumoniae* yra plačiai paplitusi ir dalyvauja tiek biocheminiuose tiek geocheminiuose procesuose ir taip pat sukelia žmogaus infekcijas, nuo besimptomės kolonizacijos virškinimo trakte, kvėpavimo ir šlapimo takuose iki mirtinos pneumonijos, septicemijos ir meningito. Dauguma *Enterobacteriaceae* atstovų yra išskiriami iš pūlinių, sukelia pneumoniją, meningitą, septicemiją, žaizdų infekcijas, šlapimo takų ir žarnyno infekcijas. Tai taip yra viena pagrindinių normalios žmogaus žarnyno floros sudėtinių dalių, tačiau ši šeima yra reta tarp kitų kūno vietų normalios floros atstovų. Kelios *Enterobacteriaceae* šeimos rūšys yra svarbios sukeldamos ligoninėse plintančias hospitalines infekcijas (HI). *Enterobacteriaceae* sudaro 80% kliniškai išskiriamų gramneigiamų bakterijų ir 50% kliniškai svarbių patogeninių bakterijų, sukeldamių septiceminę infekciją, šios bakterijos taip pat sukelia daugiau nei 70% šlapimo takų infekcijų ir didelis procentas sukelia žarnyno infekcijas [40].

Išskyrus *Shigella* rūšį, kuri retai sukelia žmogaus infekcijas ne virškinimo trakte, dauguma *Enterobacteriaceae* šeimos rūšių dažnai sukelia ne žarnyno infekcijas, tačiau nedidelis šių rūšių: *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* kompleksas ir *Serratia marcescens* skaičius, sukelia daugumą ne žarnyno infekcijų: šlapimo takų infekcijas, dažniausiai cistitą, kvėpavimo takų, žaizdų, kraujo

ir nervų sistemos infekcijas. Dauguma šių infekcijų ypač sepsis ir meningitas yra gyvybei pavojingos ir dažnai pasitaiko ligoninėse. Dėl šių infekcijų sunkumo yra būtina visiška izoliacija, identifikacija ir privalomas įtariamųjų sergant ištyrimas dėl *Enterobacteriaceae* [40].

Keturios rūšys *Esheria*, *Salmonella*, *Shigella* ir *Yersinia* yra pagrindinės žarnyno infekcijų sukėlėjos, lemiančios viduriavimą. Kitų autorių duomenimis *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Morganella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ir *Serratia* taip pat yra galimai susijusios su viduriavimu [40].

### 1.1.3. Diagnostika

Yra daug būdų identifikuoti *Enterobacteriaceae* šeimą, tokie kaip įprastinis auginimas mitybinėse terpėse, taip pat įvairūs komerciniai rinkiniai, molekuliniai metodai: pavyzdžiui PGR tyrimas dėl *phoE* geno yra jautrus ir specifiškas, nustatant padermes, priklausančias *Esheria* - *Shigella* grupei. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų tapatumas nustatomas remiantis biocheminėmis savybėmis, nukleorūgščių hibridizacija ir jų sekų struktūra, o atsižvelgiant į antigenus – jos skirstomos į serogrupes ir serovarus [40].

Kai kurios padermės blogai auga kraujo agare, tačiau gerai auga šokoladiniame agare, esant specialioms inkubacijos sąlygoms. Tai patvirtina galimą mitybinių medžiagų poreikį arba mutacijas apimančias kvėpavimą. Pvz: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* auga lėtai ir joms reikalinga prailginta inkubacija. Pacientams gydytiems antimikrobiniais vaistais, pvz: gentamicinu, kartais išskiriami pleotropiniai (pasižymintys daugybine fenotipine ekspresija) *Serratia marcescens* ir *Salmonella mutantai*. *Salmonella* padermės produkuoja vandenilio sulfidą, gamina dujas iš gliukozės. *Salmonella* serotipas *Typhi*, po 24 valandų inkubacijos yra tik 0,2-0,3 mm skersmens [40].

### 1.1.4. Jautrumas antibiotikams

*Enterobacteriaceae* šeimos jautrumą antibiotikams galima nustatyti daugeliu metodų, tačiau dažniausiai naudojami yra diskų difuzijos ir praskiedimo metodai. Kuomet antibiotikai yra vartojami pirmą kartą, *Enterobacteriaceae* atsparumas yra labai nežymus. Būdingasis atsparumas yra daugumos padermių genetinė ypatybė, susijusi su ilgalaikiu antibiotikų vartojimu. Pvz: beveik visos *Serratia marcescens* padermės yra atsparios penicilinui G, colistinui ir cephatlotinui. Antibiotikograma taip pat gali būti vienas iš *Enterobacteriaceae* nustatymo metodų [40].

## 1.2. $\beta$ -laktamazių tipai

*Enterobacteriaceae* šeima daugiausia gamina plataus veikimo  $\beta$ -laktamazės (PVBL), lyginant su kitų šeimų bakterijomis. PVBL – tai fermentai, kurių dėka, išsivysto atsparumas daugeliui  $\beta$ -laktaminių antibiotikų (penicilinams, cefalosporinams, monobaktamams (aztreonamui)). Pasireiškus PVBL gaminančių bakterijų sukeliams infekcijoms, gydymui naudojami karbapenemai. Beta-laktamazių veikimo principas paremtas slopinimu antibiotikų, neutralizuojant  $\beta$ -laktaminį žiedą [53].

1960 m. Graikijoje, buvo nustatytas, plazmidžių koduojamas  $\beta$ -laktamazių tipas gramneigiamose bakterijose, kuris vadinamas TEM tipu [53]. Vėliau nustatė ir TEM-2, kuris identiškas TEM-1 tipui pagal savo biochemines savybes, išskyrus tai, kad skiriasi viena amino rūgštimi ties 37 pozicija. Šie du tipai turi panašius atsparumo fenotipus [41]. TEM-1 ir TEM-2 tipai dažniausiai aptinkami gramneigiamose bakterijose (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ir *Neisseria gonorrhoeae*). TEM-1 ir TEM-2 hidrolizuoja penicilinus ir siauro spektro cefalosporinus (cefalotiną, cefazoliną). TEM-1 ir TEM-2 pasižymi silpnesniu veikimu aukštesnės kartos cefalosporinams: cefotaksimui (CTX), ceftazidimui (CAZ), cefriaksonui (CRO), cefepimui (FEP). Pradėjus vartoti šiuos antibiotikus, jų veikimas buvo efektyvus prieš atsparias padermes. Kitas tipas, kuris taip pat priklauso išplėsto spektro  $\beta$ -laktamazėms yra SHV. Jis pasižymi mažesniu išskiriamų fermentų kiekiu [53].

Laikui bėgant, po įvairių  $\beta$ -laktamazių nustatymo įvedimo į klinikinę praktiką, sekė santykinai greitas TEM ir SHV tipo  $\beta$ -laktamazių mutantų atsiradimas. Šie mutantai gebėjo hidrolizuoti daugelį cefalosporinų ir monobaktamų (tačiau paprastai ne cefamicinus ar karbapenemus). Šios PVBL pirmą kartą buvo rastos *K. pneumoniae*, o vėliau ir tarp visų kitų *Enterobacteriaceae* šeimos narių. Tačiau šiandien dauguma PVBL yra dažniausiai randami *Klebsiella* spp. ir *E. coli*. Dabartiniu metu PVBL išlieka jautrūs  $\beta$ -laktamazių inhibitoriams, tokiems kaip klavulaninė rūgštis, sulbaktamas, tazobaktamas, tačiau tai greitai gali pasikeisti. Įdomu yra tai, jog mutacija, kuri išplėtė TEM ir SHV tipo  $\beta$ -laktamazių spektrą, paprastai sustiprina jų atsparumą  $\beta$ -laktamazių slopinimui. Galiausiai, PVBL gaminančios padermės drauge gali gaminti pernelyg daug TEM-1 ir SHV tipo fermentų, kurie gali lemti atsparumą  $\beta$ -penicilino- $\beta$ -laktamazės deriniams [41].

PVBL pirmiausia buvo atrastos gramneigiamose bakterijose, tai *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* padermėse, taip pat išaiškintos ir *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* ir *Shigella* gentyse [53].

Antibiotikų efektyvus poveikis greitai išnyko atsiradus atsparioms padermėms. *Kl. pneumoniae* buvo iširta Vokietijoje su naujai įgytu atsparumo mechanizmu, kuris priklausė SHV tipui ir buvo pavadintas SHV-2. Šios padermės tapo atsparios cefalosporinams (CTX, CAZ, CRO). Visi kiti TEM tipai gaminantys plataus veikimo  $\beta$ -laktamazes buvo išaiškinti 1984 m. Prancūzijoje ir 1988 m. JAV [53].

Nors ir atsiradus įvairiems pasikeitimams, PVBL nevienodai gali hidrolizuoti substratus. Pavyzdžiui TEM-7 hidrolizuoja CAZ ir CTX apytiksliai tokiu pat intervalu, o tuo tarpu SHV-2 hidrolizuoja CTX apie 10 kartų greičiau nei CAZ. Kitais atvejais TEM ir SHV šeimų nariai, koduojami genais su įvairiomis mutacijomis, kurios buvo įgytos palaipsniui. Papildomas pasikeitimų kompleksas, apimantis Glu-102 pasikeitimą TEM-2 į Lys TEM-9 atveju arba Glu-237 pasikeitimą SHV-2 į Lys SHV-4 ir SHV-5 atvejais, vėliau padidino CAZ hidrolizės lygį. Panašūs amino rūgščių pasikeitimai buvo aprašyti kituose TEM, SHV spektruose bei susijusiuose fermentuose. Nors kai kurie fermentai gali hidrolizuoti CTX greičiau nei CAZ, labai svarbu yra tai, jog jautrumo tyrimas *in vitro* dažnai rodo, jog CAZ pasižymi aukštesne MSK. Šis reiškinys gali vykti dėl sumažėjusio CAZ įsiskverbimo į periplazminę erdvę. Iš esmės, naudojant standartinę inokuliacijos medžiagą, tam tikros *K. pneumoniae* padermės yra atsparios visiems cefalosporinams, išskyrus cefamicinus. PVBL mutantai TEM ir SHV fermentų šeimose nėra apriboti. *P. aeruginosa* atveju buvo nustatyti įvairūs D, OXA (oksaciliną-hidrolizuojančių fermentų klasių mutantai). Atmainos, koduojančios šiuos variantus, yra atsparios cefalosporinams [41]. Kita PVBL šeima CTX-M yra įgijusi plazmidės su pilnu spektru  $\beta$ -laktamazių, kurios pagal kilmę nulemtos chromosomų genų [53].

PVBL gaminančios bakterijos pasižymi nevienodu atsparumu beta laktaminiams substratams, bet jų siejamas bendrumas yra tas, kad jos negali neutralizuoti cefamicinų (cefoksitino, cefotetano, cefmetazolio) ir karbapenemų (imipenemo, meropenemo, ertapenemo). Beta-laktamazių inhibitoriams priskiriama klavulaninė rūgštis, sulbaktamas, tazobaktamas. Šie inhibitoriai gali būti viename antibiotiko diske su kitais beta-laktaminiais antibiotikais. Inhibitorių veikimas yra efektyvus, nes PVBL jautrios jų poveikiui [53].

### 1.2.1. Bush'o klasifikacija

Kadangi  $\beta$ -laktamazės sudaro itin įvairią šeimą, buvo pasiūlyta jas suklasifikuoti. 1989 m. Bush'o sudaryta klasifikacija (1 lentelė) paremta substrato bei inhibitoriaus profiliu ir molekuline struktūra. Šioje klasifikacijoje išskiriamos keturios  $\beta$ -laktamazių grupės: 1 grupė apima cefalosporinazes, kurios nėra slopinamos klavulaninės rūgšties; 2 grupė yra slopinama  $\beta$ -laktamazių inhibitorių ir ji apima A ir D molekulinės klases; 3 grupė priskiriama metalo  $\beta$ -

laktamazėms, kurios atsparios klasikiniams  $\beta$ -laktamazių inhibitoriams, išskyrus EDTA ir p-chloromercuribenzoatui (pCMB) ir 4 grupė – penicilnazės (atsparios klavulaninei rūgščiai). Didėjant TEM ir SHV išskiriamų tipų skaičiui keitėsi klasifikacijos schema. Norėdami išsaugoti Bush'o pateiktą klasifikaciją, atliko keletą pakeitimų. 2b grupėje, prasiplėtus fermentų skaičiui, buvo įvardinta nauja 2be grupė, kuri atsakinga už plataus veikimo  $\beta$ -laktamazės. Šis skirstymas rodo, kad 2be grupė yra kilusi iš 2b. Taip atsitiko ir su 2br  $\beta$ -laktamazių grupe, kuri pasižymėjo ribotu afinitetu inhibitoriams (ji kilo iš 2b grupės). Ir antra grupė buvo papildyta 2f grupe, kuri išskiriama kaip karbapenemus skaldančios  $\beta$ -laktamazės, išskyrus tai, kad silpnai veikia klavulaninę rūgštį [4].

Daugelio  $\beta$ -laktamazių amino rūgšties sekų žinojimas leidžia jas priskirti vienai iš keturių evoliucinių molekulinų klasių (A, B, C arba D) [41]. A, C ir D klasių aktyvusis centras nustatomas serino vietoje, o tuo tarpu B klasės fermentų aktyvumui reikalingas cinkas. Dėl šios priežasties B klasės fermentai ir buvo pavadinti metalo- $\beta$ -laktamazėmis. A, B ir D klasės išskiriamos kaip reikšmingiausios tarp hospitalinių patogenų klinikinėje praktikoje [27].

1 LENTELE.  $\beta$ -laktamazių klasifikacijos schema [4].

| Grupė | Molekulinė klasė | Ardomas substratas  | Atstovaujantys fermentai                                   |
|-------|------------------|---|--|
| 1     | C                | Cefalosporinai  | AmpC fermentai iš gramneigiamų bakterijų                   |
| 2a    | A                | Penicilinai   | Penicilnazės iš gramteigiamų bakterijų                     |
| 2b    | A                | Penicilinai, cefalosporinai   | TEM-1, TEM-2, SHV-1  |
| 2be   | A                | Penicilinai, monobaktamai, siauro ir plataus spektro cefalosporinai | TEM-3 iki TEM-26, SHV-2 iki SHV-6                          |
| 2br   | A                | Penicilinai   | TEM-30 iki TEM-36  |
| 2c    | A                | Penicilinai, karbencilinas  | PSE-1, PSE-3, PSE-4  |
| 2d    | D                | Penicilinai, kloksacilinas  | OXA-1 iki OXA-11, PSE-2 (OXA-2)                            |
| 2e    | A                | Cefalosporinai  | Sužadintos cefalosporinazės iš <i>Proteus vulgaris</i>     |
| 2f    | A                | Penicilinai, cefalosporinai, karbapenemai                           | NMC-A iš <i>E. cloacae</i> , Sem-1 iš <i>S. marcescens</i> |
| 3     | B                | Dauguma beta-laktamų, įskaitant karbapenemus                        | L1 iš <i>S. maltophilia</i> , CcrA iš <i>B. Fragilis</i>   |
| 4     | ND               | Penicilinai   | Penicilnazė iš <i>B. Cepacia</i>                           |

## 1.2.2. $\beta$ -laktamazių klasės

### A klasės $\beta$ -laktamazės

Molekulinė klasė A apima penicilinazes, cefalosporinazes bei platų  $\beta$ -laktamazių spektrą, kuris yra slopinamas aktyvių į vietą nukreiptų  $\beta$ -laktamazių inhibitorių, tokių kaip klavulaninė rūgštis, sulbaktamas bei tazobaktamas [41]. Šios klasės išskiriami tipai TEM, SHV, CTX-M negali suardyti karbapenemų, kuriuos gali veikti išskiriamos karbapenemazės. O tuo tarpu, chromosomų koduojami SME (*Serratia marcescens* fermentai), NMC ir IMI tipai (tarp *Enterobacter* padermių) gali veikti karbapenemus. Plazmidžių koduojamos karbapenemazės priskiriamos KPC (*Kl. pneumoniae*) ir GES tipui (*Kl. pneumoniae* ir *P.aeruginosa* padermėse) [27].

### B klasės $\beta$ -laktamazės

B klasė apima metalo- $\beta$ -laktamazes (MBLs), kurioms kaip papildomo faktoriaus reikia cinko jonų [27]. Šie fermentai, kurie rasti *B. Fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium* spp., ir *Legionella* spp., hidrolizuoja visas penicilino klases, įskaitant karbapenemus (pvz: imipenemą, meropenemą), bei nėra slopinami penicilazės inhibitorių [41]. MBLs neveikia  $\beta$ -laktamazių inhibitoriai, tokie kaip klavulaninė rūgštis, sulbaktamas, tazobaktamas, šių fermentų jautrumas pasireiškia su EDTA . Pirmas metalo- $\beta$ -laktamazių IPM-1 tipas buvo nustatytas Japonijoje 1991m.. Vėliau nustatė ir kitus tipus: IPM, VIM, GIM, SPM ir SIM [27].

### C klasės $\beta$ -laktamazės

Gramneigiamų bakterijų atveju, molekulinės C klasės  $\beta$ -laktamazės apima chromosominės cefalosporinazes (AmpC fermentus). Beveik visi *Enterobacteriaceae* šeimos nariai (išskyrus *Salmonella* spp. ir *Klebsiella* spp.) bei *P. aeruginosa* padermės paprastai gamina chromosomų koduojamą cefalosporinazę. Šie fermentai priskiriami C molekulinei klasei bei yra pakankamai biochemiškai skirtingi, kad būtų galima juos laikyti specifiniais tam tikroms rūšims. Daugelyje enterobakterijų, tokių kaip *Enterobacter cloacae* ir *Citrobacter freundii*,  $\beta$ -laktamai (ypač cefoksitinai, imipenemai bei klavulaninė rūgštis) gali sukelti chromosominės Amp C  $\beta$ -laktamazės gamybą. Nors dabar manoma, jog  $\beta$ -laktamazės indukcija nėra klinikinė problema,  $\beta$ -laktamazės produkcijos reguliavimas yra svarbus dėl jos mutacijos lygio, dažnai lemiančio tai, jog padermės turi aukšto lygio pastovų atsparumą daugeliui naujesnių  $\beta$ -laktamų antibiotikų [41].

### **D klasės β-laktamazės:**

D klasė apima oksaciliną-hidrolizuojančius fermentus (OXA). Fermentai, esantys šioje grupėje skirtingai veikia β-laktamazių inhibitorius: klavulaninę rūgštį, sulbaktamą, tazobaktamą. OXA karbapenemazių tipas daugiausia randamas *Acinetobacter baumannii* padermėse, kuris paplitęs visame pasaulyje. Šiam tipui priskiriama daugiau nei 100 fermentų, kurie įeina į suklasifikuotus pošeimius. Išskiriamos keturios pošeimių grupės: OXA-23, OXA-24, OXA-58 ir OXA-51. Pirmos trys grupės yra plazmidžių koduojamos, o OXA-51 chromosomų koduojama β-laktamazių grupė, kuri randama *A. baumannii* padermėse. OXA-23, OXA-24, OXA-58 tipai, esantys *A. Baumannii*, atsparūs karbapenemams [27].

### **1.2.3. PVBLazių tipai**

#### **TEM tipas**

Amino rūgščių išsidėstymas, aktyviuose fermentų centruose, atsakingas už plataus veikimo β-laktamazių (PVBL) fenotipą. Jų dėka, kinta fermentų kofigūracija, leidžianti patekti β-laktaminiams substratams. Amino rūgšties pakeitimas 104, 164, 238 ir 240 pozicijoje, formuoja PVBL fenotipą. Bet, kaip taisyklė, PVBL dažnai turi daugiau nei vienos amino rūgšties pakeitimus. Toks atvejis yra išskiriamas TEM-160 tipui, kuris susiformavęs dėl keleto genetinių pakitimų. TEM-10, TEM-12 ir TEM-26 tipai dažniausiai aptinkami JAV [53].

#### **SHV tipas**

Šiam tipui priklausančios PVBL taip pat turi amino rūgščių pakeitimus. Susiformavusios mutacijos aptinkamos 238 arba 238 ir 240 pozicijose. Šiuo metu žinoma daugiau nei 100 fermentų, priklausančių SHV tipui. Šis tipas randamas visame pasaulyje, o JAV buvo dažniausiai nustatomas. SHV-5 ir SHV-12 yra priskiriami tarp dažniausiai nustatomų SHV tipų [53].

#### **CTX-M tipas**

CTX-M tipo mutacija atsiradusi dėl plazmidėse įgijamų genų, kurie randami *Kluyvera* genties chromosomose. Šis tipas pasižymi didesniu aktyvumu CTX nei kitiems β-laktamams (CAZ, CRO, FEP). Nors dauguma atvejų nustatoma, kad CTX-M tipas aktyvesnis prieš CTX, yra pažymėti atvejai, kuomet stipresnis aktyvumas išreiškiamas CAZ. Tai tipas, kuris aptinkamas *Enterobacteriaceae* šeimoje ir paplitęs visame pasaulyje kaip gaminantis PVBL. Šiuo metu yra aprašyta daugiau nei 60 CTX-M tipų [53].

#### **OXA tipas**

OXA – tai plazmidžių koduojamos β-laktamazės, kurios gali hidrolizuoti oksaciliną ir prieš *Staphylococcus* skiriamus penicilinus. Šių fermentų aminorūgščių pakitimai formuoja

PVBL fenotipą. OXA tipo PVBL daugiausia buvo nustatyta *Pseudomonas aeruginosa* padermėse, kurias išskyrė Turkijoje ir Prancūzijoje [53].

### **Kiti PVBL tipai**

Plazmidžių koduojami PVBL tipai: PER-1, VEB-1, GES-1/2 nedažni ir dažniausiai aptinkami *P. Aeruginosa padermėse*. *Enterobacteriaceae* šeimoje išskiriami šių tipų variantai: BES, SFO, TLA [53].

## **1.3. *Enterobacteriaceae* šeimos atsparumo beta-laktaminiams antibiotikams mechanizmai**

Mikroorganizmų įtakojami atsparumo kitimai remiasi antimikrobinio atsparumu, kuris yra dėl genetiškai užkoduotų mikroorganizmų savybių. Atsparumas pasižymi dviem papildomomis kategorijomis: vidinis arba būdingas atsparumas ir įgytas atsparumas. Atsparumas, kurį lemia normali genetinė, struktūrinė ar fiziologinė mikroorganizmo būseną yra vadinamas būdingu. Būdingas atsparumas yra prognozuojamas, nes žinant organizmo tapatumą, drauge žinomi tam tikri jo antimikrobinio atsparumo profilio aspektai (pvz., atsparumas vankomicinui tarp daugelio gramneigiamų bakterijų ar gramteigiamų kokių atsparumas aztreonamui) [41].

Antibiotinis atsparumas, kurį lemia pakitusi ląstelės fiziologija bei struktūra dėl paprasto genetinio mikroorganizmų sudėties pasikeitimo, yra vadinamas įgytu atsparumu. Šio tipo atsparumo buvimas bet kokioje klinikinėje padermėje laikomas neprognozuojamu. Atpažinimo metodai yra tokie, kurie patvirtina genų pasikeitimą arba mainus: genetines mutacijas, genų atpažinimas iš kitų mikroorganizmų per genų pernešimo mechanizmus, arba mutacijų bei genų pernešimų derinius [53].

Atlikus įvairias studijas buvo atrasti genetiniai lokusai atsakingi už antibiotikų atsparumą. Genetinis atsparumas gali būti paveldimas (įgimtas) ar įgytas dėl mutacijų. Įgytas atsparumas vienam (rezistentiškumas) ar keliems (polirezistentiškumas) antibakteriniams vaistams yra savybė, būdinga tam tikrai padermei, pasikeitus jos genomui. Galimi genų pokyčių variantai [16]:

- Vienas iš jų susijęs su mikroorganizmų tam tikrų genų bakterijos chromosomoje mutacijomis, dėl kurių atakuojamojo geno produktas nustoja buvęs to antibiotiko „taikiniu“. Taip atsitinka arba dėl „taikinio“ baltymo struktūros pokyčio, arba dėl to, kad „taikinio“ antibiotikas nepasiekia.



- Antras iš jų susijęs su tuo, kad atsparumą vienam ar keliems antibiotikams mikroorganizmas įgyja, kai jame atsiranda papildomų genų, dažniausiai R (rezistentiškumo) plazmidžių.

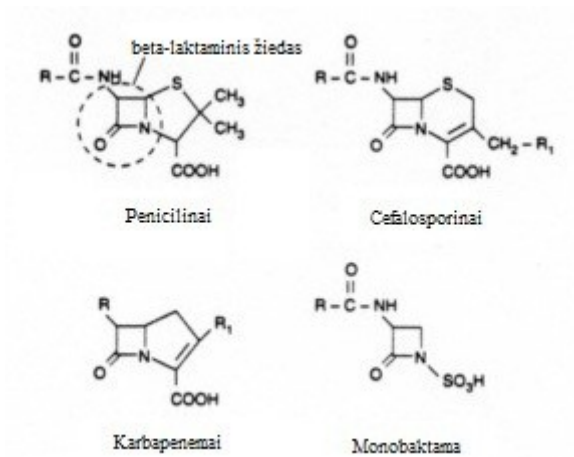
- Taip pat gali būti kombinuotas mutacinis atsparumas, kuomet įvyksta mutacija chromosomose ir plazmidėse.

Genai, kladuojantys beta-laktamazes [16].:

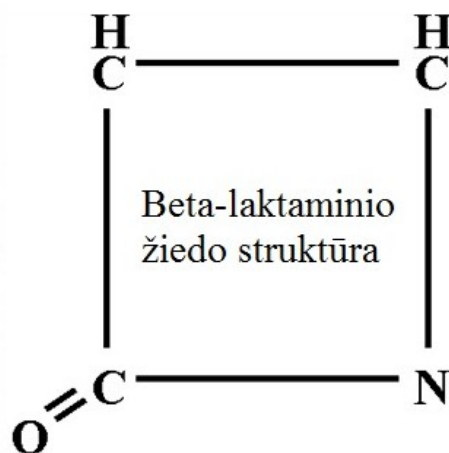
- Chromosomos
- Plazmidės
- Transpozonai

Betalaktaminiai antibiotikai (1 pav.) dažniausiai skiriami vaistai, pasižymintys bendra biochemine stuktūra, tai –  $\beta$  laktaminis žiedas (2 pav.). Beta-laktaminiams antibiotikams priskiriamos šios vaistų grupės [55]:

- Penicilina;
- Cefalosporinai;
- Cefamicinai;
- Karbapenemai;
- Monobaktamai;
- Beta-laktamazių inhibitoriai.



1 pav. Beta-laktaminiai antibiotikai



2 pav. Beta-laktaminis žiedas

Betalaktaminiai antibiotikai yra skirstomi pagal jų atliekamas funkcijas. Kiekviena antibiotikų grupė pagrįsta tam tikro spektro veikimu ir savo sudėtyje turi tik jiems būdingą veikliąją medžiagą [55].

### 1.3.1. Gramneigiamų bakterijų atsparumo mechanizmai

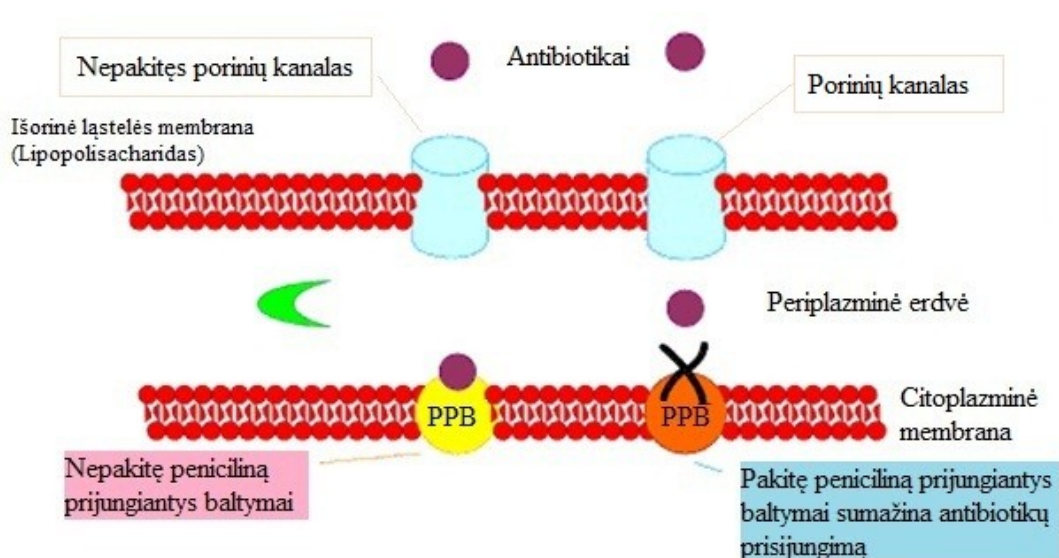
Atsparumo mechanizmai yra paremti dviem pagrindiniais aspektais, tai biocheminiai ir genetiniai. Biocheminiai atsparumo, beta-laktaminiams antibiotikams, mechanizmai skirstomi į keturias grupes [16, 55, 20]:

1. Atsparumas dėl PPB,
2. Atsparumas  $\beta$ -laktamams dėl sumažėjusio išorinės membranos pralaidumo,
3. Atsparumas dėl  $\beta$ -laktamazių,
4. Aktyvaus transporto iš ląstelės sistema.

#### 1.3.1.1. Atsparumas dėl PPB

Peniciliną prijungiančių baltymų – transpeptidazių (PPB) struktūros pokyčiai formuoja atsparumą  $\beta$ -laktamams. Labiausiai tinkantys sąveikai su šiais antibiotikais didelės molekulinės masės peniciliną jungiantys baltymai (PPB1, PPB2, PPB3). Atsparios šiems antibiotikams bakterijos tampa šiais atvejais [31]:

- Pakinta normalūs PPB;
- Bakterijos ima sintetinti papildomus PPB, kurie menkai tinka sąveikai su  $\beta$ -laktamais;
- Bakterijos sintetina perteklinį kiekį normalių PPB (PPB4 ir PPB5), kurie menkiau tinka sąveikai su  $\beta$ -laktamais nei PPB1, PPB2 ar PPB3.



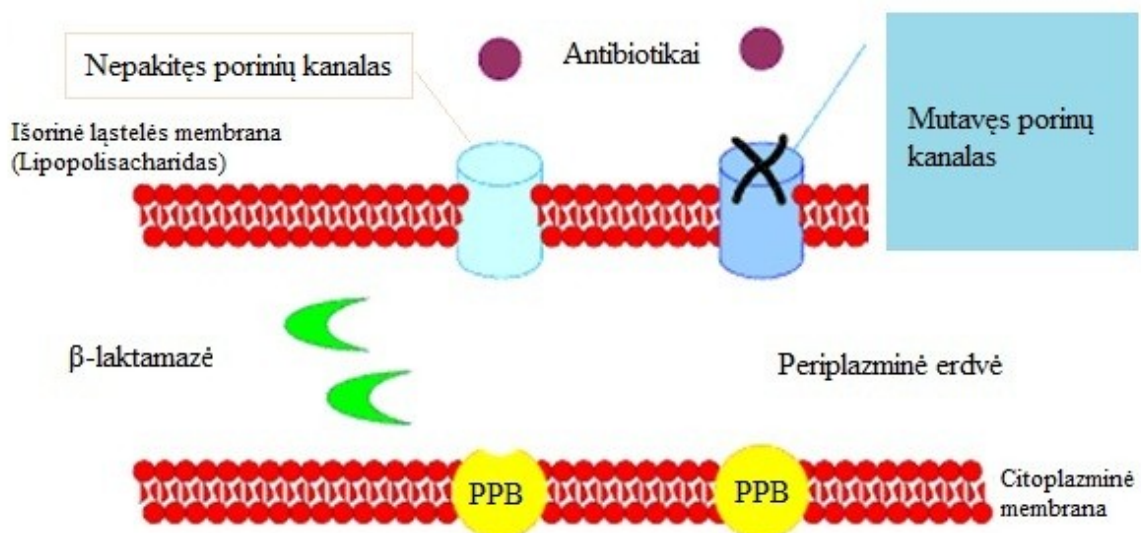
3 pav. Atsparumo mechanizmo schema dėl PPB

Tikslios veikimo vietos (PPB) pakitimas (3 pav.) sutrikdo  $\beta$ -laktaminių antibiotikų prisijungimą citoplazminėje membranoje. Pakitus PPB pasikeičia afinitetas  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams. Dėl šio veikimo mechanizmo, atsparumu pasižymi tokios padermės kaip: *Gonococcus*, *H. Influenzae* ( $\beta$ -laktaminiams antibiotikams) [55].

### 1.3.1.2. Atsparumas $\beta$ -laktamams dėl sumažėjusio išorinės membranos pralaidumo

Priešingai nei gramteigiamų mikroorganizmų atveju (juose  $\beta$ -laktamai turi laisvą priėjimą prie jų PPB) gramneigiamų bakterijų išorinė membrana yra kliūtis neleidžianti pasiekti tų junginių [41].

Gramneigiamuose mikroorganizmuose šiuos baltymus (PPB) dengia tarytum užtvara išorinė fosfolipidinė membrana. Difuzijos būdu  $\beta$ -laktamai patenka į ląstelės vidų per šias akeles – „poras“, todėl jie vadinami baltymais poriniais [31]. Beta-laktaminiai antibiotikai, praėję hidrofilių porinių baltymų kanalą, pasiekia periplazminę erdvę ir citoplazminę membraną, kurioje yra išsidėstę PPB. Sumažėjus akelių skersmeniui arba jų skaičiui, sumažėja bakterijos jautrumas, t.y. padidėja atsparumas antibiotikui. Mutacijos porinių kanalų (4 pav.) sumažina daugelio  $\beta$ -laktaminių antibiotikų gebėjimą kirsti išorinę membraną gramneigiamose bakterijose [55].

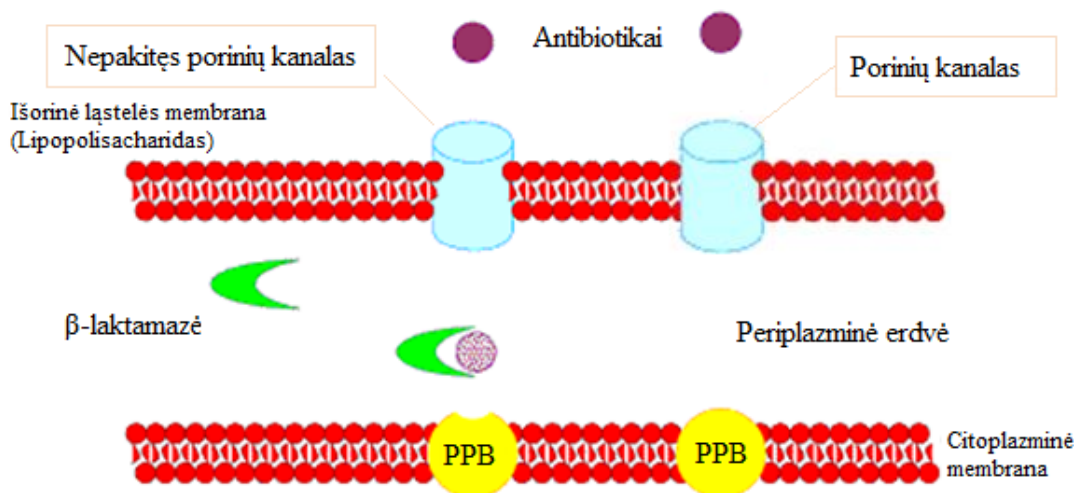


4 pav. Atsparumo mechanizmo schema dėl mutacijos porinių kanalų

Porinų kanalai yra specifiški tam tikriems antibiotikams. Pavyzdžiui, sumažėjus baltymo OprD (D2) tam tikrų *P. aeruginosa* padermių ląstelių paviršiuje, jos tampa atsparios imipenemui. *P. aeruginosa* atsparumo imipenemui atsiradimas siejamas su specifinio kanalo OprD praradimu. *E. coli* gamina bent dviejų tipų poriną: OmpF ir OmpC. Mutacijos, kurios lemia sumažėjusią OmpF ir/arba OmpC raišką arba jų pakitimus, lemia sumažėjusį jautrumą daugeliui  $\beta$ -laktamų. Su porinų stoka susijęs įgytasis enterobakterijų atsparumas antibiotikams siejamas dėl gydymo cefotaksimu (CTX), ko pasekoje, atsirado atsparių padermių cefalosporinams [55, 20, 31].

### 1.3.1.3. Atsparumas dėl $\beta$ -laktamazių

Tai labiausiai paplitęs kai kurių gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų atsparumo mechanizmas  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams [41]. Beta-laktamazės – tam tikras tipas fermentų, ardančių  $\beta$ -laktaminis antibiotikus hidrolizuodami  $\beta$ -laktaminį žiedą (5 pav.). Šie fermentai skaldo penicilinus (penicilinizės), cefalosporinus (cefalosporinizės) ar abiejų grupių antibiotikus ( $\beta$ -laktamazės) [55]. Gramteigiamos bakterijos  $\beta$ -laktamazės išskiria į augimo terpę, o tuo tarpu gramneigiamos bakterijos jas išskiria į periplazminę erdvę [41]. Šie fermentai gali būti koduojami bakterijų chromosomų, plazmidžių ar transpozonų igijamų genų. Fermentų sintezė dažnai pasireiškia dėl plazmidžių veiklos ar kaip atsakas į antibiotikų vartojimą. Plataus veikimo  $\beta$ -laktamazės (PVBL) dažniausiai aptinkamos *K. pneumonia*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae* padermėse [55, 20].



5 pav. Atsparumo mechanizmo schema dėl  $\beta$ -laktamazių

Beta-laktamazės – skirtingi cheminiai junginiai, kuriuos galima skirstyti į tam tikras grupes [31]:

- Veikiamą substratą: juo vadinamas savitas gebėjimas hidrolizuoti  $\beta$ -laktaminius antibiotikus, tai rodo fermentų pavadinimas (pvz.: penicilinizės, cefalosporinizės);
- Poveikio spektrą: plataus veikimo  $\beta$ -laktamazės geba ardyti ne tik penicilinus ar I kartos cefalosporinus, bet ir II bei III kartos cefalosporinus, jos dažniausiai yra gerai žinomų plazmidžių  $\beta$ -laktamazių mutantai (pvz.: TEM-1, TEM-2, SHV-1 ir kt.);
- Aktyviojo centro, sąveikaujančio su antibiotiku, struktūra;
- Koduojančių genų vietą ir ekspresijos tipą: jei genai, koduojantys  $\beta$ -laktamazių sintezę, yra chromosomose, prasideda atsparių atitinkamam antibiotikui mikroorganizmų klonų plitimas. Jei genai, koduojantys  $\beta$ -laktamazių sintezę, yra plazmidėse, vidurūšinis ir tarprūšinis rezistentiškumas plinta greičiau. Ribos tarp genų chromosominės ir plazmidinės vietos vis mažiau pastebimos, nes genai, determinuojantys  $\beta$ -laktamazių sintezę, gali virsti mobiliais (paslankiais) DNR fragmentais ir persikelti į plazmides. Beta-laktamazės gali sintetinti beveik visos gramneigiamosios bakterijos, t.y. vyrauja atitinkamų genų vieta chromosomose;
- Jautrumą inhibitoriams: dalis  $\beta$ -laktamazių (pvz.; gramneigiamų bakterijų plazmidinės  $\beta$ -laktamazės) gali būti jautrios, dalis (pvz.; chromosominės) – atsparios atitinkantiems savitiems slopintojams ( $\beta$ -laktamazių inhibitoriams).

#### 1.3.1.4. Aktyvaus transporto iš ląstelės sistema

Susiformuoja aktyvaus antibiotiko pašalinimo iš ląstelės mechanizmas, todėl jo veiksminga koncentracija nespėja pasiekti savąjį taikinį. Aktyvaus transporto iš ląstelės sistema yra vadinama ištekėjimo sistema, esanti gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų citoplazminėje membranoje. Tripusės energijos „varoma“ ištekėjimo sistema (MexAB-OprM) gali būti specifiška vienam substratui arba gali transportuoti keletą struktūriškai skirtingų junginių (daugelio klasių antibiotikus). Pompos siurbliai – tai membranos baltymai, kurių dėka pašalinami antibiotikai iš ląstelės ir tokiu būdu lieka žema antibiotikų koncentracija pačioje ląstelėje. Anksčiau aptartam atsparumo mechanizmui, kuris siejamas su išorinės membranos pralaidumu taip pat būdinga žema antibiotiko koncentracija, kuri patenka į ląstelę. Todėl veikiant abiems atsparumo mechanizmams, kliniškai reikšmingos bakterijos tampa atsparios daugumai antibiotikų. Buvo atskleista, jog MexAB-OprM tiesiogiai prisideda prie atsparumo penicilinui per šios antibiotikų klasės ištekėjimą. Taip pat pateikiamas dar vienas pavyzdys, kad įvykus reguliatoriaus mexR mutacijai *Pseudomonas aeruginosa* padermėse sutrinkdoma MexAB-OprM ištekėjimo sistema dėl kurios išvystomas atsparumas  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams [16, 20].

Todėl šios sistemos veikimas kartu su išorinės membranos sumažėjusiu pralaidumu yra reikšmingas daugumai antibiotikų, tai apima ne tik  $\beta$ -laktamus, o ir chinolonus, tetraciklinus, chloramfenikolius [16, 20].

### 1.3.1.5. Genetiniai atsparumo mechanizmai

#### Chromosomų koduojamos $\beta$ -laktamazės

Nežiūrint tai, kad gramneigiamos bakterijos turi chromosomų  $\beta$ -laktamazės geną, plazmidžių perduodamos  $\beta$ -laktamazės atlieka svarbesnį vaidmenį antibiotikų ( $\beta$ -laktamų) jautrumo nustatyme (tokių padermių kaip: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella* ir *H. Influenzae*). Chromosomų koduojamos  $\beta$ -laktamazės išskiriamos *Kl. Pneumoniae* padermėse, iš jų svarbiausios yra penicilinazės, todėl šios rūšys dažnai jautrios cefalosporinams. *Enterobacteriaceae* šeimai priskiriamos gentys, tokios kaip *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, gamina chromosomų  $\beta$ -laktamazes, kurios gali būti įgiję atsparumą daugeliui  $\beta$ -laktaminių antibiotikų, išskyrus karbapenemus. Dėl šios priežasties, tokių padermių fenotipo identifikavimas pakankamai sudėtingas naudojant pradinis nustatymo metodus. Įvykus chromosomų genų mutacijoms, prasideda "nenormali" fermentų, vadinamų plataus veikimo  $\beta$ -laktamazės (PVBL), gamyba [55].

#### Plazmidžių koduojamos $\beta$ -laktamazės

Plazmidžių perduodamos  $\beta$ -laktamazės dažniausiai aptinkamos gramneigiamų bakterijų TEM-1, TEM-2, SHV-1 tipuose. Bakterijų atsparumo mechanizmas pasireiškia penicilinams, pirmos ir antros kartos cefalosporinams, išskyrus cefuroksimui, cefamicinui, trečios ir ketvirtos kartos cefalosporinams, karbapenemams, aztreonamui [55].

## 1.4. Hospitalinių infekcijų, sukeltų gramneigiamų bakterijų, gaminančių plataus veikimo $\beta$ -laktamazes (PVBLazes), paplitimas

1980 m. pirmą kartą nustačius PVBL gaminančias mikroorganizmų padermes, dėl PVBL paplitimo, *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų atsparumas dabar didėja ir tapo pasauline problema [63, 19, 38]. *Enterobacteriaceae* šeima, gaminanti PVBL, tapo aktuali tema hospitalizuotiems ligoniams. Šios šeimos bakterijos gali sukelti kraujo, šlapimo takų infekcijas, hospitalines pneumonijas (HP), pilvo, smegenų abscesus. Visame pasaulyje, tarp visų hospitalinių infekcijų, didžiausias dėmesys skiriamas kraujo sukeltoms infekcijoms. *E.coli* ir *K.*

*pneumoniae* yra išskiriami kaip pagrindiniai HI patogenai, sukeltys pilvo ertmės, šlapimo takų ir kraujo infekcijas [28].

Kiekvienais metais JAV yra užfiksuojama apie 250 tūkst. atvejų susijusių su kraujo hospitalinėmis infekcijomis. Nustatyta šių infekcijų išsivystymo kilmė, kuri siejama su kraujagyslių kateteriais, tai labai svarbus susirgimas, kuris dažnai baigiasi mirties priežastimi. Kraujo infekcija gali būti pirminė arba antrinė. Antrinė infekcija yra siejama su kitų vietų infekcija, tai šlapimo takų, plaučių, pooperacinės žaizdos ir odos. CDC's Nacionalinė hospitalinės infekcijos stebėjimo sistema (NNIS) pranešė, kad pirminės kraujo infekcijos sudaro 64% visų hospitalinių kraujo infekcijų, t.y. išsivysto dėl centrinės venos kateterių [46].

Nustatyta, kad daugelį kraujo infekcijų sukelia *K. pneumoniae* padermės. Todėl buvo atliktas tyrimas, kuriame dalyvavo 147 ligoniai ir nustatyta, kad 48 atvejai išskirta *K. pneumoniae* su PVBL ir 99 atvejai su *K. pneumoniae* negaminančiomis PVBL [46].

Infekcijos įgyjamos intensyvios terapijos skyriuose (ITS) turi įtakos ligonių esamai būklei ir tampa rimta mirties priežastimi [15, 28]. Visame pasaulyje buvo atliktas tyrimas, kuriame dalyvavo 13 tūkst. ligonių iš intensyvios terapijos skyrių. Buvo užregistruota, jog 51% sirgo infekcine liga, o 71% skiriami antimikrobiniai vaistai, gramneigiamų bakterijų sukeltos infekcijos sudarė 63% [15].

Infekcijos, išsivysčiusios dėl *K. pneumoniae* bakterijų, dažniausiai yra hospitalinės ir suserga imunosupresinės būklės ligoniai. Buvo atliktos studijos, kurios apėmė 12 ligoninių iš viso pasaulio nuo 1996 – 1997 m.. Tyrimuose naudoti duomenys, tai pačiam imami ligoniai, kuriems nustatyta bakteriemija sukelta *K. pneumoniae* bakterijų. Išvadose buvo pateikta, jog 31% sudarė PVBL gaminančios *K. pneumoniae* padermės ir 44% įgytų infekcijų pasitaiko intensyvios terapijos skyriuose [61].

2003 m. Nacionalinė hospitalinių infekcijų priežiūros sistema (NNIS) pranešė, kad gramneigiamų bakterijų sukelta bakteriemija sudaro 24% infekcijų įgytų intensyvios terapijos skyriuje (ITS) lyginant su visomis hospitalinėmis kraujo infekcijomis [45].

Pagal NNIS 2004 m. ataskaitą buvo ištirtas bakterijų jautrumas trečios kartos cefalosporinams ITS-se JAV valstijoje. Tyrimų rezultatai pateikti nurodant dažniausiai nustatomą atsparumą trečios kartos cefalosporinams šių bakterijų [45]:

- *K. pneumoniae* padermės sudarė – 20,6%
- *Enterobacter* spp. – 31,1%
- *E. coli* – 5,8%

Hospitalinė pneumonija yra pirmaujanti mirties priežastis tarp hospitalinių infekcijų ir priskiriama apie 33% šios infekcijos mirties atvejų [57].

Daugiau kaip 75% sunkios būklės hospitalizuotų ligonių yra kolonizuojami mikroorganizmais iš ligoninės aplinkos per 48 val.. Dažniausi infekcijos šaltiniai, tai dirbtinė plaučių ventiliacija, įskaitant kvėpavimo įtaisus ir vandens rezervuarus. Toks užterštumas dažnai pasitaiko nepaisant griežtų valymo taisyklių, nes vienkartiniai tracheotomijos ar trachėjos vamzdeliai gali būti užteršti per slaugos personalo rankas [57].

PVBL gaminančios *K. pneumoniae* padermės sukelia ligas pacientams, turintiems rizikos veiksnių: ilgai gydyti stacionare, atliktos medicininės intervencijos, dirbtinė plaučių ventiliacija ar įstatyti kateteriai, ilgai gydyti antibiotikais. B.R. Panhotra su kolegomis nustatė, kad bakteriemija, sukelta PVBL gaminančių *K. pneumoniae* padermių, prailgina gydymo stacionare trukmę ir didina pacientų mirštamumą [39].

Nustatyta, kad PVBL gaminančios *K. pneumoniae* padermės yra virulentiškesnės, t. y. atsparesnės fagocitozei ar serumo baktericidiniam poveikiui, geba geriau prisitvirtinti prie epitelinių ląstelių [48]. Di Martino duomenimis, *K. pneumoniae* rūšys gaminančios R plazmidžių koduotas PVBL, susijusios su didesne adhezija prie epitelinių ląstelių ir gali sukelti HI [12, 13].

Didėjantis sukėlėjų atsparumas antibiotikams dažnai susijęs su pradinio empirinio gydymo neveiksmingumu gydant hospitalinę pneumoniją [26, 59]. Plataus veikimo spektro antibiotikų netinkamas vartojimas hospitalizuotiems pacientams didina daugelio hospitalinių sukėlėjų atsparių padermių vystymąsi [3, 42, 18].

Sėkmingas pradinis empirinis gydymas mažina mikroorganizmų atsparumo vystymąsi ligoninėje bei leidžia sutrumpinti gydymo antibiotikais trukmę [30, 35].

## **1.5. Plataus veikimo $\beta$ -laktamazių (PVBLazių) nustatymo metodai**

*Enterobacteriaceae* padermės, gaminančios plataus veikimo  $\beta$ -laktamazes (PVBL), tapo aktualia tema medicinos mikrobiologijoje dėl antibakterinio gydymo ir infekcijų plitimo ligoninėse. PVBL nustatymo metodai turi tiksliai atskirti bakterijas, gaminančias šiuos fermentus, ir nustatyti jų atsparumą  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams. Yra keletas fenotipinių aptikimo metodų, pagrįstų trečios kartos cefalosporino ir klavulininės rūgšties tyrimu, tai dvigubos difuzijos, kombinuotas diskų difuzijos ir E-testas PVBL nustatymui. Šie nustatymo metodai dažnai reikalauja tikslaus išdėstymo norint išaiškinti bakterijas, gaminančias plataus veikimo  $\beta$ -laktamazes, tokias kaip cefalosporinazes [14].



Naudojant cefepimą (FEP), ketvirtos kartos cefalosporiną, su klavulanine rūgštimi cefalosporinazių inaktyvacija yra veiksmingesnė, negu vien tik su FEP. Kitas būdas gali būti, kai naudojamas kloksacilinu prisotintas agaras [14].

Beta-laktamazės, kurios geba hidrolizuoti trečios kartos cefalosporinus ir karbapenemus (pvz.: metalo-beta-laktamazės), nėra inhibuojamos su klavulanine rūgštimi. Metalo- $\beta$ -laktamazių inhibicijai yra naudojama EDTA. Tam tikrais atvejais, metalo- $\beta$ -laktamazės gali slėpti PVBL gamybą, todėl labai svarbu atlikti fenotipo nustatymą, naudojant kelis inhibitorius (EDTA ir klavulaninę rūgštį). Dar vienas atvejis, kuomet sunku nustatyti PVBL, kai D klasės gaminamos oksacilinazės yra silpnai veikiamos klavulaninės rūgšties, o su EDTA visiškai nėra inhibuojamos [14].

Svarbu, tai, kad nustačius bakterijas, gaminančias PVBL, galima imtis veiksmų, kurie gali padėti sustabdyti jų plitimą. Taip pat reikia atkreipti dėmesį į gydymą trečios kartos cefalosporiniais ar aztreonamu, nes PVBL gaminančios enterobakterijos atsparios šiems antibiotikams [14].

PVBL nustatymo metodai yra svarbūs, kai norima išsiaiškinti atsparumo mechanizmus  $\beta$ -laktaminiams antibiotikams. Šiais metodais galima nustatyti ar atsparumas yra įgytas dėl PVBL ar dėka kitų  $\beta$ -laktamazių. Tarp *Enterobacteriaceae* šeimos narių yra trys pagrindiniai atsparumo mechanizmai, kurie nesusiję su PVBL gaminančiomis padermėmis [14]:

- Atsparumas dėl  $\beta$ -laktamazių (TEM-1, TEM-2, SHV-1 ir kt.), amino ir karboksi-penicilinams. Šis atsparumo mechanizmas yra pastebimas tyrimuose naudojant peniciliną ir  $\beta$ -laktamazių inhibitorius (klavulaninę rūgštį, sulbaktamą). Rezultate matoma inhibicinė zona, veikiant ankščiau išvardintiems antibiotikams.
- TEM tipo  $\beta$ -laktamazių atsparumas, kuris patebimas tarp amoksicilino-klavulaninės rūgšties, ampicilino-sulbaktamo, tikarcilino-klavulaninės rūgšties, išryškėja inhibicinė zona tarp šių antibiotikų.
- Atsparumas dėl cefalosporinazių gamybos amino ir karboksi penicilinams, antros ir trečios kartos cefalosporinams, ir aztreonamui. Susiformuoja neaiški inhibicinė zona tarp minėtų antibiotikų ir inhibitorių.

1980 m. buvo sukurti PVBL nustatymo metodai. Visų metodų panašumas yra tas, kad naudojami trečios kartos cefalosporinai (cefotaksimas, ceftazidimas) ir  $\beta$ -laktamazių inhibitoriai (klavulaninė rūgštis). Esant teigiamam rezultatui stebima inhibicinė zona susiformavusi aplink antibiotikų diskus. *Enterobacteriaceae*, gaminančios PVBL yra apibūdinamos remiantis [14]:

- Atsparumu amino ir karboksi-penicilinams, antros kartos cefalosporinams ir bent vienam iš kelių trečios ar ketvirtos kartos cefalosporinų.
- Susiformavusia inhibicine zona tarp anksčiau minėtų antibiotikų ir  $\beta$ -laktamazių inhibitorių (dažniausiai klavulaninės rūgšties).

PVBL gaminančių bakterijų nustatymas yra svarbus užkertant kryžminio perdavimo kelius tarp ligoninėse hospitalizuotų ligonių. Aprašyti nustatymo metodai padės suvokti PVBL nustatymo būdus, gautų rezultatų interpretaciją, privalumus ir trūkumus taikant skirtingus metodų variantus [14].

### 1.5.1. Diskų difuzijos metodo charakteristikos

Jautrumo tyrimas naudojant diskų difuzijos metodą, leidžia suskirstyti bakterijų padermes į – jautrias, vidutiniškai jautrias ir atsparias, apibrėžiant jautrumą antimikrobinių medžiagų įvairovei [8]. Ant sustingusios standžios mitybinės terpės, tinkamos tiriamųjų mikroorganizmų dauginimuisi, petri lėkštelėje tolygiai pasėjama tam tikras tiriamųjų mikroorganizmų suspencijos (nustatoma atitinkamai McFarlando drumstumo standarto rodmeniui 0,5) tūris [44]. Popieriniai diskiniai filtrai, persisunkę nurodytu kiekiu antimikrobinės medžiagos, dedami ant agaro paviršiaus, kuris buvo inokuliuotas tiriamuoju mikroorganizmu [8]. Petri lėkštelės inkubuojamos tinkamomis tiriamiesiems mikroorganizmams kultivuoti sąlygomis, dažniausiai 35 – 37 °C temperatūroje, vieną parą. Iš indikatorinio disko antibiotikas skverbiasi į mitybinę terpę ir nustelbia mikroorganizmų dauginimąsi aplink diską [44]. Antimikrobinė medžiaga, esanti diske, paplinta į agarą. Atstumui nuo disko didėjant, logaritmiškai mažėja antimikrobinės medžiagos koncentracija. Tokiu būdu agare aplink kiekvieną diską sukuriama jos koncentracijos gradientas. Bakterijos, inokuliuotos ant agaro paviršiaus, toliau dauginasi kol nėra slopinamos antimikrobinės medžiagos koncentracijos ir augimo zona yra matoma. Vietose, kur preparato koncentracija yra slopinanti dauginimasis nevyksta, todėl aplink kiekvieną diską formuojasi bakterijų augimo slopinimo zona. Augimo slopinimo zonos skersmenį įtakoja antimikrobinės medžiagos difuzija agare. Zonos dydis yra atvirkščiai proporcingas MSK. Kriterijai, kurie yra rekomenduojami interpretuojant zonos skersmenį ir MSK reikšmės atskiroms antimikrobinėms medžiagoms yra nustatyti KLSI [8].

### 1.5.2. Dvigubos difuzijos metodas

A klasės PVBL galima aptikti naudojant klavulaninę rūgštį. Šių mikroorganizmų nustatymas atliekamas su trečios kartos cefalosporiniais ir klavulaninės rūgšties diskais. Medžiagos naudojamos tyrimui atlikti [58]:

- Mueller-Hinton (MH) agaras;
- 20/10 mg amoksicilino-klavulaninės rūgšties diskas;
- 30 mg ceftazidimo diskas;
- 30 mg ceftriaksono arba cefotaksimo diskas;
- 30 mg aztreonamo diskas;
- 10 mg cefpodoksimo diskas;

Paruoštos bakterijų suspencijos tolygiai pasėjamos į Petri lėkštelę. Suspencija nustatoma atitinkamai McFarlando drumstumo standarto rodmeniui 0,5. Centre Petri lėkštelės patalpinamas AMC diskas. Nuo centrinio disko (AMC) yra nustatomi 90° kampai į keturias skirtingas puses ir 15 mm atstumu išdėstomi antibiotikų diskai (CAZ, CTX ar CRO, ATM ir CPD). Petri lėkštelės yra inkubuojamos 35°C temperatūroje 18-24 valandas [58].



6 pav. Dvigubos difuzijos metodas PVBL nustatymui

Teigiamų rezultatų interpretavimas [58]:

- Susidariusi inhibicinė zona aplink visus antibiotikų diskus, esančius petri lėkštelėje;

- Susidariusi inhibicinė zona aplink AMC ir bent vieną iš šių antibiotikų – cefpodoksimo, ceftazidimo, cefriaksono, aztreonamo diską;

Pastaba: cefpodoksimumi nejautrios *E. coli*, *Klebsiella* spp. ir *Proteus* spp. padermės [58].

Dvigubos difuzijos metodas – pirmas tyrimas, kuris buvo atliktas norint nustatyti enterobakterijas, gaminančias plataus veikimo beta laktamazes (PVBL). Šio metodo esmė: diferencijuoti atsparias padermes, t.y. tas, kurios viršija cefalosporinazių gamybą, tokių kaip PVBL. Testas taip pat gali būti atliekamas tokiu būdu: ant agaro terpės Petri lėkštelėse išdėliojami antibiotikų diskai su 30- $\mu$ g CTX (arba su cefriaksonu, ceftazidimu, aztreonamu) ir amoksicilino/klavulaninės rūgšties (AMC) diskais (10  $\mu$ g klavulinato). CTX ir AMC diskai yra uždedami ant agaro terpės 30 mm atstumu. Rezultatas vertinamas kaip teigiamas, kada sumažėja jautrumas cefotaksimui ir aplink CTX susiformuoja aiški inhibicijos zona priešais AMC diską. Aplink CTX diską susiformavusi inhibicijos zona panaši į „šampano kamštį“ [14].

Dvigubos difuzijos metodas buvo pirmas, kurį panaudojo atliekant epidemiologines studijas. Tyrimo tikslas – įvertinti *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų, gaminančių PVBL, paplitimą Prancūzijos ligoninėse. Šis metodas laikomas kaip patikimas, kuris padeda nustatyti bakterijas, gaminančias plataus veikimo  $\beta$ -laktamazes. Vertinant atliktus tyrimus buvo pažymėta, kad būtina koreguoti tarpus tarp dviejų diskų, nes sumažinus atstumą tarp klavulaninės rūgšties ir trečios kartos cefalosporino diskų (pvz., 20 mm atstumu) labai sustiprėja testo jautrumas. 30 mm atstumas tarp antibiotikų diskų yra pertvarkomas atsižvelgiant į gautus rezultatus. Jei rezultatai abejotini, t.y. sumažėjęs jautrumas trečios kartos cefalosporinams, tuomet atliekamas papildomas tyrimas, išdėsčius antibiotikų diskus trumpesniu atstumu [14].

### 1.5.3. Kombinuotas diskų difuzijos metodas

Remiantis diskų metodu buvo sukurtas PVBL nustatymo būdas, kurį pavadino kombinuotu diskų metodu. Šio metodo esmė – nustatyti inhibicinės zonos diametrą, susidariusį aplink diską. Tyrimui naudojami cefalosporino ir cefalosporino-klavulaninės rūgšties diskai. Priklausomai nuo disko tipo, rezultatas vertinamas kaip teigiamas, jei slopinančios zonos diametro skirtumas yra  $\geq 5$  mm. Šį testą lengva atlikti ir paprasta interpretuoti. Kombinuotas diskų metodas pasižymi 96% jautrumu ir 100% specifiskumu [5, 33, 34].

Carter su kolegomis atliko tyrimus naudodami kombinuotą diskų metodą. Jų tikslas – nustatyti cefpodoksimo su klavulanine rūgštimi veikimą, išskiriant PVBL, AmpC ir *K. oxytoca*

padermes, gaminančias K1 fermentą. Rezultatai parodė, jog esant klavulaninei rūgščiai inhibicinė zona nustatoma  $\geq 5$  mm visiems PVBL gaminantiems mikroorganizmams. Tuo tarpu, AmpC ir *K. oxytoca* inhibicinė zona buvo nustatyta  $\leq 1$  mm [5, 33, 34].

#### 1.5.4. E testo metodas

Mikroorganizmų atsparumo/jautrumo antibiotikams nustatymas E-testo metodu yra indikatorinių diskų metodo atitikmuo. Esminis skirtumas - tyrimas atliekamas ne naudojant indikatorinius diskus, turinčius tam tikrą antibiotiko kiekį, bet naudojant E-testus, t.y. juosteles, kuriose yra antibiotiko kiekio gradientas – nuo didžiausio iki mažiausio (atitinkamai numatomiems tyrimo rezultatams). Po tiriamųjų mikroorganizmų pasėlių inkubacijos tinkamomis jų dauginimuisi sąlygomis matoma elipsoidinės išvaizdos jų dauginimosi slopinamoji sritis. Atsižvelgiant į tą vietą, kur nėra mikroorganizmų dauginimosi, nustatoma tiriamųjų mikroorganizmų atitinkamo antibiotiko MSK [44].

Cefalosporinų ir klavulaninės rūgšties inhibicinės zonos nustatymui buvo sukurtas PVBL E-testas. Tai dvipusė juostelė, kurią sudaro atitinkami antibiotikų gradientai CT/CTL, TZ/TZL, PM/PML. PVBL E-testo juostelę iš vieno galo sudaro cefotaksimas (CT), ceftazidimas (TZ) arba cefepimas (PM), o kitame juostelės gale yra tas pats antibiotikas su klavulanine rūgštimi 4 mg/L. Rezultatas vertinamas kaip teigiamas kai MSK yra  $\geq 8$ . PVBL E-testas taip pat vertinamas teigiamas, jeigu [14]:

- Susidariusi fantominė zona žemiau CTL, TZL ar PML antibiotikų gradientų.
- Susidariusi deformacija po elipsės, esančios CT, TZ ar PM.

Pamačius fantominę zoną ar deformaciją po elipsės zona, rezultatą vertiname teigiamu, t.y. bakterijos gaminančios PVBL [14].

Neseniai atliktose studijose paaiškėjo, kad laboratorijose atliktus tyrimus, su PVBL E-testo juostelėmis, gali būti sunku interpretuoti. Tikimybė pasitaikyti tokiems tyrimams, kuriuos galima neteisingai interpretuoti yra ~30%. Ši klaida gali atsirasti dėl cefalosporinų, kurių MSK nepatenka į nustatytą diapozono reikšmę [14].

Buvo atliekami tyrimai, kuriuose naudojo E-testų metodą  $\beta$ -laktamazių nustatymui. Šio darbo tikslas – palyginti klavulaninės rūgšties veikimą su cefepimu, cefotaksimu ir ceftazidimu, tiriant enterobakterijų padermes. Tyrimams išskyrė 54 PVBL gaminančias enterobakterijas: *Enterobacter aerogenes* ( $n=3$ ), *Enterobacter cloacae* ( $n=10$ ), *Escherichia coli* ( $n=10$ ), *Klebsiella oxytoca* ( $n=3$ ), *Klebsiella pneumoniae* ( $n=25$ ) ir *Proteus mirabilis* ( $n=3$ ). Rezultatai parodė

PVBL E-testo jautrumą, kuri išskirstė taip: 98% cefepimui su klavulanine rūgštimi, 83% cefotaksimui su klavulanine rūgštimi ir 74% ceftazidimui su klavulanine. E-test juostelės, kurių sudėtyje yra cefepimas su klavulanine rūgštimi yra jautrus PVBL aptikimo metodas [56].

### **1.5.5. Automatizuoti metodai**

#### **1.5.5.1. Phoenix automatizuota sistema**

Viena iš automatizuotų MSK nustatymo sistemų yra Becton Dickinson (JAV) Phoenix™ Automatinė Mikrobiologinė Sistema. Ji yra skirta kliniškai reikšmingų bakterijų greitam identifikavimui (ID) ir jų jautrumo antibiotikams nustatymui. Phoenix sistema leidžia greitai nustatyti daugumą aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių gramteigiamų bei gramneigiamų bakterijų [8].

Phoenix sistemoje įdiegtas pasaulyje pripažintos Bactec™ sistemos automatizuoto identifikavimo ir jautrumo tyrimo efektyvumas. Sandari plokštelė dedama į analizatorių yra stacionariai įtvirtinama, todėl ji visuomet lieka savo vietoje, neužstringa, nelūžta ir yra hermetiška. Phoenix sistemos našumas leidžia vienu metu atlikti nuo 1 iki 100 ID/JAT procedūrų. Integruotos programinės įrangos su BD EpiCenter™ dėka, Phoenix sistema padidina pacientų analizavimo efektyvumą [23].

Dauguma Phoenix ID paneliuose naudojamų reakcijų yra klasikinių metodų (įvairių substratų fermentacijos, oksidacijos, degradacijos ir hidrolizės) modifikacijos. Be to, mikroorganizmų identifikavimui Phoenix sistemoje naudojami chromogeniniai ir fluorogeniniai substratai bei vieną anglies molekulę turintys substratai [8].

Šiuo metu naudojamas modernus buljono mikropraskiedimų testas. Buljono praskiedimo metodikos esmę sudaro bakterijų augimo nustatymas skystoje mitybinėje terpėje, kurioje antimikrobinės medžiagos koncentracija mažinama, kaskart praskiedžiant dvigubai. Mažiausia antimikrobinės medžiagos koncentracija, kuriai esant nematoma bakterijų augimo, vadinama minimalia slopinančia koncentracija (MSK). Phoenix sistema atliekamas jautrumo antibiotikams tyrimas yra pagrįstas bakterijų augimo antimikrobinių medžiagų įvairių koncentracijų poveikyje nustatymu, panaudojant jautrumo antibiotikams indikatorius, nuolatos inkubuojant ir nuskaitant Phoenix panelių mikrošulinėlius [8].

Phoenix'o automatizuotas PVBL tyrimas (Becton Dickinson, Sparks, MD, JAV) priklauso nuo augimo, pasirenkant plataus spektro cefalosporinus. Šiam metodui naudojami penki šulinėliai, kuriuose yra cefalosporinai arba cefalosporinai su klavulanine rūgštimi (cefpodoksimas, ceftazidimas, ceftazidimas su klavulanine rūgštimi, cefotaksimas su klavulanine

rūgštimi ir ceftriaksonas su klavulanine rūgštimi). Gauti tyrimų rezultatai perkeliama į kompiuterinę sistemą [14].

Sanguinetti su kolegomis atliko tyrimus su Phoenix automatizuota sistema. Naudodami šią sistemą identifikavo 510 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų. Gavus tyrimų rezultatus buvo nustatyta, jog 319, tai PVBL gaminančiosios padermės, kurios priklausė įvairioms rūšims, o tarp šių PVBL buvo išskirtos 59 AmpC tipo bakterijos, tokios kaip *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* ir *Providencia stuartii*. Tyrimų rezultatai rodė 100% jautrumą ir 98,9% specifiškumą [14].

#### 1.5.5.2. VITEK2 automatizuota sistema

Atliekant PVBL tyrimus, VITEK2 (BioMerieux) analizatoriumi, nustatomas antibakterinis veikimas. Kortelės, kurios dedamos į analizatorių, yra užpildytos 1,0 mg/L cefepimu, 0,5 mg/L cefotaksimu ar ceftazidimu, arba kartu su 10-4 mg/L klavulanine rūgštimi. Šias korteles įdėjus į VITEK2 analizatorių, atliekamas antibiotikų testavimas ir matuojamas drumstumas. Proporcingai sumažėjęs augimas, veikiant cefalosporinams su klavulanine rūgštimi, yra lyginamas su vienu cefalosporinų veikimu ir tokiu būdu rezultatas vertinamas kaip teigiamas ar neigiamas, kuris siunčiamas į kompiuterinę sistemą (Advanced Expert System) [14].

#### 1.5.5.3. Automatizuotų sistemų palyginamosios studijos

Buvo atliekamos studijos, norint įvertinti automatizuotų sistemų gebėjimą nustatyti enterobakterijas, gaminančias PVBL. Sanders su kolegomis atliko tyrimus su VITEK2 automatizuota sistema ir dvigubos difuzijos metodu. Tyrimams pasirinko dvi bakterijų rūšis, kurios gamino plataus veikimo  $\beta$ -laktamazes: *E. coli* (n=176) ir *K. pneumoniae* (n=153). Gauti tyrimų rezultatai parodė, jog abu metodai yra geri, tiek dėl jautrumo, tiek dėl specifiškumo. Su VITEK2 automatizuota sistema jautrumas – 99,5%, specifiškumas - 100%, o dvigubos difuzijos metodu jautrumas - 98%, specifikuamas – 99,5% [14].

Schwaber su kitais mokslininkais įvertino VITEK2 automatizuotos sistemos veikimą. Šiam tyrimui pasirinko 40 *Enterobacter* spp., gaminančių PVBL. Sistemos dėka, jie identifikavo tik 25 padermes iš 40 (62,5%), kaip PVBL. Taip pat nurodė, jog šis metodas yra mažiau jautrus AmpC tipo išskiriamoms bakterijoms nei *E. coli* ar *K. pneumoniae* [14].

Wiegand su kolegomis atliko tyrimą, kuriame naudojo dvi automatizuotas sistemas (VITEK2 ir Phoenix) ir palygino su kitais metodais [62]:

- Automatizuota sistema (Microscan WalkAway-96);

- Dvigubos difuzijos metodu (naudojo keturis cefalosporinų diskus: cefotaksimą, ceftazidimą, cefpodoksimą ir cefepimą);
- Kombinuotu diskų difuzijos metodu (cefotaksimu, ceftazidimu ir cefpodoksimu, kurių sudėtyje nebuvo klavulaninės rūgšties);
- Taip pat kaip palyginimui įtraukė ir E-testą.

Tyrimams buvo naudojamos 144 izoliuotos *Enterobacteriaceae* rūšys, iš kurių 85 gaminančios PVBL. Atliktos studijos parodė, jog bendras tyrimų jautrumas ~90% su Phoenix automatizuota sistema ir agarų difuzijos metodais, o atskiroms padermėms jautrumas siekė iki 94% (t.y. *E. coli* ir *Klebsiella* spp.). Reikėtų pažymėti, kad MicroScan sistema PVBL aptikimui buvo jautri tik *E. coli* ir *Klebsiella* spp. padermėms, o VITEK2 sistemoje buvo naudojamos paprastos kortelės, kurios nėra skirtos PVBL aptikimui (nebuvo cefalosporinų su klavulanine rūgštimi). AmpC tipo fermentus, gaminančių bakterijų (*Enterobacter* spp., *C. freundii*, *Serratia marcescens*) jautrumas siekė virš 90% su Phoenix, VITEK2 sistemomis ir dvigubos difuzijos metodu. Vertinant specifiskumą, geriausiai pasižymėjo kombinuotas diskų difuzijos metodas, kuris siekė daugiau nei 90%. Dvigubos difuzijos metodas ir E testas pasižymėjo 90% specifiskumu tik AmpC tipo išskiriamomis bakterijomis. VITEK2 ir Phoenix sistema pasiekė anksčiau pažymėtus specifiskumo lygius tik su *E. coli* ir *Klebsiella* spp.. VITEK2 ir Phoenix sistemų specifiskumas, AmpC gaminančioms padermėms, buvo mažiau nei 40% [62].

Thomsom su kolegomis palygino dvi automatizuotas sistemas (VITEK2 ir Phoenix), kurios buvo su specialiomis kortelėmis PVBL nustatymui. Tyrimui naudojo 102 padermes (*E. coli*, *K. pneumoniae* ir *K. oxytoca*), tarp kurų buvo 76, gaminančios PVBL. Gauti rezultatai parodė, jog su VITEK2 automatizuota sistema jautrumas - 89%, specifiskumas - 85%, o su Phoenix automatizuota sistema jautrumas - 96%, specifiskumas - 81% [14].

#### **1.5.6. Dviejų etapų PVBL nustatymo metodas**

Pagal CLSI yra rekomenduojamas dviejų etapų PVBL nustatymo metodas. Pirmas žingsnis, kuris reikalingas norint nustatyti PVBL, tai daugiau nei vieno iš šių cefalosporinų (cefotaksimo, cefriaksono, ceftazidimo, cefpodoksimo, aztreonamo) jautrumo nustatymas. Antras etapas vykdomas tuomet, jei nustatomas sumažėjęs jautrumas cefalosporinams. Norint patvirtinti PVBL gamybą atliekamas kombinuotas diskų difuzijos metodas, pasirenkant ceftazidimą ar cefotaksimą su klavulanine rūgštimi. PVBL aptikimas patvirtinamas *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* padermėse, jeigu [7]:



- MSK matoma ir tuomet, kai klavulaninė rūgštis yra praskiedžiama du-tris kartus.
- MSK zonų diametro skirtumas yra  $\geq 5$  mm, atliekant tyrimą cefalosporinų su klavulanine rūgštimi.

Šis atrankinis metodas pagal CLSI rekomendacijas netinkamas nustatyti PVBL gaminančias padermes, kurios išskiria ir AmpC tipo fermentus. Tai *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos tokios kaip *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *P. stuartii* ir *Serratia* spp. [7].

## 2. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

### 2.1. Tyrimų medžiaga

Palyginamiesiems tyrimams buvo naudojamos 2009-2011 metais iš įvairių klinikinių medžiagų išskirtos *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos. Analizuotos kultūros, išskirtos ligoniams besigydantiems įvairiuose Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų skyriuose. Iš viso tirtos 58 padermės, iš kurių 31 (53,4%) buvo padermės, gaminančios plataus veikimo beta-laktamazės (PVBL).

Visos *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos buvo identifikuotos nustatant biochemines savybes. Taikant fenotipinius plataus veikimo beta-laktamazių nustatymo metodus: kombinuotą diskų difuzijos ir dvigubos difuzijos metodą, atrinktos bakterijos, gaminančios PVBL. Remiantis pusiau automatine identifikavimo sistema Phoenix buvo nustatyta bakterijų rūšis ir patvirtinta PVBLazių gamyba.

Vėliau diskų difuzijos metodai lyginti su automatizuotu PVBL nustatymo metodu ir nustatyti šių metodų jautrumas, specifiskumas, teigiama prognostinė vertė ir neigiama prognostinė vertė. Kultūros augintos mikrobiologinėse terpėse: kraujo agare, McConkey ir Muller-Hinton.

Taip pat išnagrinėtas bakterijų, gaminančių PVBL paplitimas 2008-2010 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose. Tyrimų analizei buvo pasirinkti šie skyriai:

- I Reanimacijos ir intensyvios terapijos skyrius (I RITS),
- II Reanimacijos ir intensyvios terapijos skyrius (II RITS),
- I Pilvo chirurgijos skyrius,
- II Pilvo chirurgijos skyrius,
- Hematologijos skyrius,
- Kaulų čiulpų transplantacijos ir intensyvios chemoterapijos skyrius.

### 2.2. Mitybinės terpės

Tyrimuose buvo naudotos kelios mitybinės terpės:

#### **Kraujo agarizuota terpė**

1996 m. Ellner ir kt. paskelbė apie sukurtą naują kraujo agaro receptūrą, pavadintą Columbijos agaru. Geresnes BD Columbijos agaro su 5% avies krauju augimą skatinančias

savybes lemia dviejų peptonų derinys bei mielių ekstraktas, kuris yra B grupės vitaminų šaltinis. Į sudėtį įeina kukurūzų krakmolos, kuris mėginyje adsorbuoja toksiškus šalutinius produktus ir teikia energiją alfa amilazių turintiems mikroorganizmams. Avies kraujas leidžia aptikti hemolizines reakcijas bei aprūpina X faktoriumi (hemu), kuris būtinas daugelio patogeninių rūšių augimui [21].

BD Columbijos agaras su 5% avies krauju yra pirminė terpė grynosioms kultūroms išskirti, kurioje auga dauguma mikroorganizmų, pvz., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* bei kitos nefermentuojančios gramneigiamos lazdelės, streptokokai, enterokokai, stafilokokai, *Candida* rūšys ir daugelis kitų. Terpės pH –  $7,3 \pm 0,2$  [21].

*Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos šioje terpėje yra vidutinio dydžio ar didelės pilkos kolonijos, galima hemolizė [21].

### **Mueller-Hinton agarizuota terpė**

Diskų difuzijos metodu nustatant mikroorganizmo jautrumą antibiotikams rekomenduojamas Mueller–Hinton agaras. Šis agaras KLSI pasirinktas dėl tam tikrų priežasčių [8]:

1. Jis pasižymi geru rezultatų atkartojamumu atliekant jautrumo tyrimus.
2. Neturi sulfonamido, trimetoprino ir tetraciklino inhibitorių.
3. Jame auga daugelis bakterijų padermių.
4. Remiantis tyrimais, atliekamais naudojant šį agarą, buvo sukaupti daugelio metų duomenys bei klinikinė patirtis.

Mueller–Hinton agaras gaminamas iš dehidratuotos bazės remiantis gamintojo nurodymais. Pagamintas agaras autoklavuojamas, ataušinamas ir supilamas į stiklinius ar plastmasinius indus plokščiu dugnu ant tolygaus paviršiaus, tokiu būdu gaunamas apie 4 mm gylio vienodas terpės pasiskirstymas. Agaro sluoksnis gilesnis nei 4 mm gali lemti klaidingus rezultatus (labai mažos zonos), o tuo atveju, jei agaro sluoksnis mažesnis nei 4 mm gylio, tai gali būti labai didelės augimo slopinimo zonos, lemiančios klaidingus jautrumo tyrimo rezultatus [41].

Siekiant užtikrinti, jog agaro pH kambario temperatūroje būtų tarp 7,2 ir 7,4, kiekviena Mueller–Hinton agaro partija turi būti patikrinta. pH nepatenkantis į 7,2 - 7,4 intervalą gali pakenkti jautrumo tyrimo rezultatams [41].

### **McConkey agarizuota terpė**

Enterobakterijų atrinkimui ir diferencijavimui galima naudoti McConkey agarizuotą terpę su laktoze. Į šią terpę įeina kristalvioletas, tulžies druskos (slopinančios gramteigiamųjų

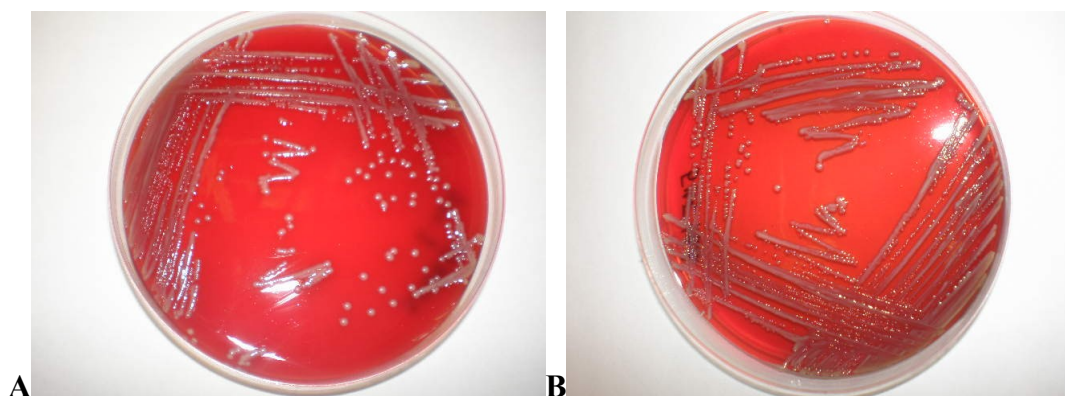
bakterijų augimą) bei laktozę. Jei organizmas fermentuoja laktozę, į terpę yra išskiriami rūgštiniai produktai, kurie pakeičia pH indikatoriaus (neutraliojo raudonio) spalvą.

McConkey agaras gali būti įvairiai modifikuojamas, pvz.: laktozę pakeičiant kitais cukrumis (nustatoma kitų cukrų fermentacija), ar į ją nededant kristalo violeto (gaunama mažiau selektyvi terpė) [41].

### 2.3. Grynujų mikroorganizmų kultūrų išskyrimas

Grynoji mikroorganizmų kultūra yra vienos rūšies ląstelių populiacija, išaugusi mitybinėje terpėje. Grynoji kultūra gaunama pasėjus tiriamosios medžiagos bandinių į standžiasias mitybines terpes, kuriose išauga pavienės kolonijos. Kolonija yra ribotas akimis matomas mikroorganizmų telkinys, išaugintas iš vienos ląstelės (rečiau iš kelių). Gryninant kultūras galima naudoti štrichavimo metodą [44].

Štrichavimas padeda atskirti mikroorganizmus ant agarizuoto paviršiaus, taip, kad viena ląstelė formuotų vieną koloniją. Tai greitas bei paprastas būdas mechaniškam atskyrimui. Kilpele yra paimamas tam tikras biomasės kiekis, pernešamas ant agarą ir štrichuojamas ant jo. Svarbu paimti tokį biomasės kiekį, kad štrichavimo pabaigoje viena ląstelė formuotų vieną koloniją (8 pav.) [64].



8 pav. *E.coli* (A); *K. pneumoniae* (B) kolonijos ant Columbijos agarą su 5% avies krauju  
(Nuotraukų autorius: Sandra Kareivienė)

Bandinys sėjamas sterilia kilpele nuo Petri lėkštelės krašto, nubrėžiant 3-5 brūkšnius. Vėliau daromos 3-5 pasėlių linijos, statmenai kertančios ankstesnių pasėlių brūkšnius. Tokiu pačiu principu pasėliai pakartojami dar ir trečią, o vėliau - ir ketvirtą kartą po visą laisvą terpės paviršių. Terpės su išsėta medžiaga inkubuojamos 18-24 val. 35-37° C temperatūroje termostate [44].

## 2.4. Kultūros inokuliacija jautrumo antibiotikams tyrimui

Siekiant užtikrinti diskų difuzijos tyrimo rezultatų atkartojamumą, inokuliacija turi būti standartizuota. Inokuliuojama kultūra gali būti paruošiama auginimo būdu arba tiesiogiai iš kolonijų agarų lėkštelėse [8].

**Inokuliacijos paruošimas.** Iš 1–2 kolonijų kultūros pagaminama 0,5 McFarlando drumstumo suspensija 0,9% NaCl tirpale. Spektrofotometrijos būdu nustatomas inokuliacijos kiekis bakterinėje suspensijoje. 0,5 McFarlando standartas – apie  $1,5 \times 10^8$  bakterijų mL [8].

**Inokuliacija.** Plokštelė su Mueller–Hinton agaru turi būti inokuliuota per 15 minučių nuo inokuliacijos paruošimo. Bakterijų suspensija inokuliacijai ruošama steriliuose mėgintuvėliuose. Į suspensiją įmerkiamas sterilus medvilninis tamponas, jis apšukamas kelis kartus, ir švelniai paspaudžiamas ant vidinės mėgintuvėlio sienelės, esančios aukščiau skystojo lygio, siekiant nuo tampono pašalinti inokuliacijos perteklių. Tada agarų lėkštelės paviršius tamponu ištepamas tris kartus, kaskart plokštelę sukant apytiksliai 90 laipsnių kampais, tokiu būdu siekiant užtikrinti geresnę inokuliacijos pasiskirstymą. Agarų lėkštelės dangtis gali būti atidarytas nuo trijų iki penkių minučių, bet ne ilgiau 15 minučių, nes tada bet kokia kita drėgmė gali įsigerti greičiau, nei antimikrobine medžiaga prisotinti diskai [29].

## 2.5. Antibakterinės medžiagos diskai

Antibakterinės medžiagos kiekis diske yra standartizuotas. Rekomenduojama, kad viename diske būtų viena antibakterinė medžiaga [8].

Komerciškai pagaminti antibiotikų diskai dažniausiai tiekiami skirtinguose konteneriuose, kiekvienas iš jų su sausikliu. Tol kol diskai nenaudojami, jie turi būti laikomi vėsioje vietoje (nuo 2 iki 8°C) arba užšaldyti šalnų nesudarančiame šaldytuve - 20°C arba šaltesnėje temperatūroje. Diskai, kurių sudėtyje yra  $\beta$ -laktaminės medžiagos, turi būti saugomi užšaldyti, siekiant užtikrinti, jog jie išsaugos savo potencialą, tačiau nedidelis kiekis gali būti laikomas paprastame šaldytuve apie vieną savaitę. Neatidaryti diskiniai konteneriai turi būti išimti iš šaldytuvo vieną–dvi valandas prieš juos panaudojant. Tai leidžia diskams, prieš juos atidarant, atšilti iki kambario temperatūros, ir tokiu būdu iki minimumo sumažinama kondensacija, kuri susidaro, kada diskas sušyla iki kambario temperatūros. Gali būti naudojamas

mechaninis diskų paskirstymo aparatas. Kol jis nenaudojamas, turi būti saugomas šaldytuve, o prieš atidarant turėtų būti atšildomas iki kambario temperatūros [41].

Po to kai agarą lėkštelės yra inokuliuotos bakterijų suspensija, per 15 minučių ant paviršiaus tolygiai uždedami pasirinkti antibakterinių medžiagų diskai. Kiekvienas diskas uždedamas naudojant sterilias žnyples arba mechaninį paskirstymo aparatą. Diskai švelniai paspaudžiami ant agarų paviršiaus, siekiant užtikrinti vienalytį kontaktą. Dalis antibakterinės medžiagos esančios diske, išplinta tuoj pat. Po to, kai diskas susiliečia su agarų paviršiumi, diskai neturėtų būti judinami [41].

Uždėjus antibiotikų diskus, ne vėliau kaip po 15 minučių, lėkštelės yra apverčiamos ir inkubuojamos 36°C temperatūroje [41].

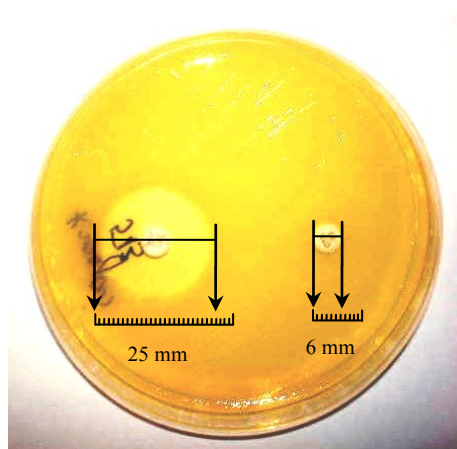
## 2.6. Fenotipiniai PVBL nustatymo metodai

### 2.6.1. Kombinuotas diskų difuzijos metodas

Mueller-Hinton agarą lėkštelės inokuliuotos bakterijų suspensija, per 15 minučių ant paviršiaus tolygiai uždėti antibakterinių medžiagų diskai. PVBLazių nustatymui naudoti antibiotikų diskai (Becton Dickenson, JAV):

- cefotaksimas (CTX);
- cefotaksimas su klavulanine rūgštimi (CTX/CLA).

Uždėjus diskus, lėkštelės apverstos ir inkubuotos 36°C temperatūroje. Kiekviena agarų lėkštelė tirta po 18-24 val. Visas augimo slopinimo zonos skersmuo, įskaitant disko skersmenį, matuotas naudojant liniuotę (9 pav.).



9 pav. *E. coli* ant Muller-Hinton agarizuotos terpės su CTX/CLA ir CTX antibiotikų diskais  
(Nuotraukų autorius: Sandra Kareivienė)

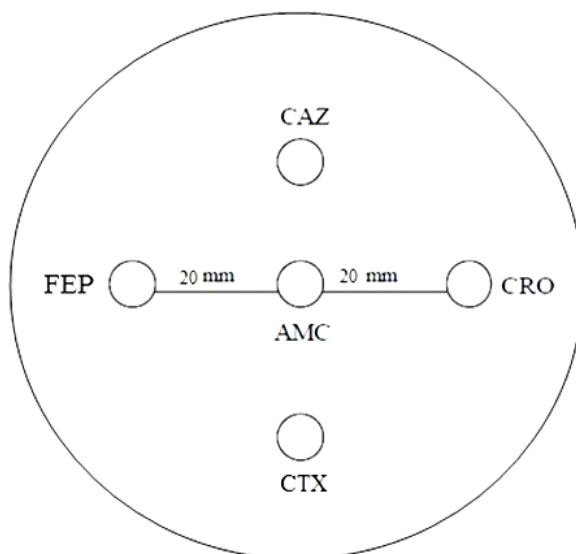
Augimo slopinimo zonų skersmenys, išmatuoti aplink kiekvieną diską ir interpretuoti remiantis nurodymais, kuriuos nurodo KLSI. Rezultatas vertinamas kaip teigiamas, jei slopinančių zonų diametrų skirtumas yra  $\geq 5$  mm. Pvz.: CTX/CLA – 25 mm, CTX – 6 mm. Tuomet  $25 - 6 = \geq 5$  mm = PVBL [6, 52].

### 2.6.2. Dvigubos difuzijos metodas

Mueller-Hinton agarą lėkštelės inokuliuojamos bakterijų suspensija, per 15 minučių ant paviršiaus tolygiai uždedami antibakterinių medžiagų diskai. Tyrimuose naudojama kontrolinė padermė *K. pneumoniae* ATCC 70063 (11 pav.) PVBLazių nustatymui naudoti antibiotikų diskai (Becton Dickenson, JAV) [52, 68]:

- amoksicilino-klavulaninės rūgšties diskas (AMC);
- ceftazidimo diskas (CAZ);
- ceftriaksono diskas (CRO);
- cefepimo diskas (FEP);
- cefotaksimo diskas (CTX);

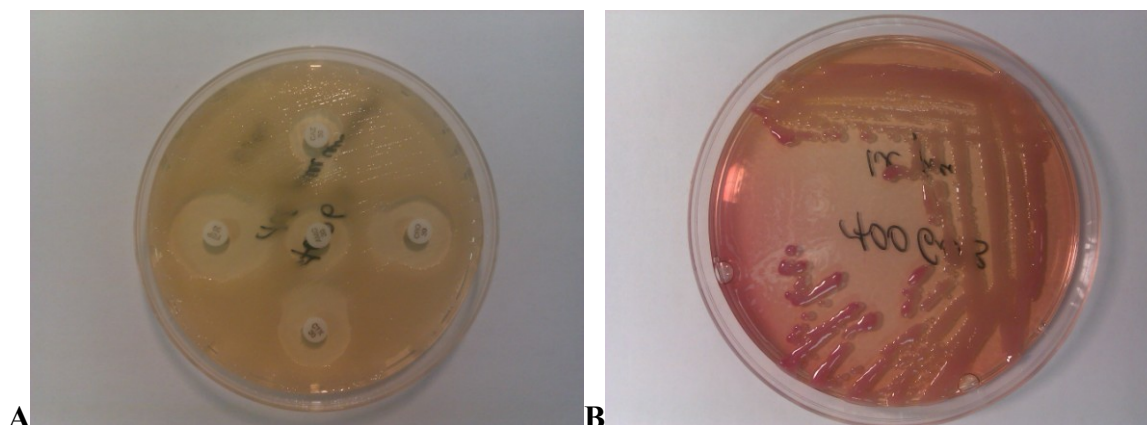
Centre Petri lėkštelės uždedamas AMC diskas. Nuo centrinio disko (AMC) yra nustatomi  $90^\circ$  kampai į keturias skirtingas puses ir 20 mm atstumu išdėstomi antibiotikų diskai (CAZ, CRO, CTX, FEP) (10 pav.). Petri lėkštelės yra inkubuojamos  $36^\circ\text{C}$  temperatūroje 18-24 valandas [52, 68].



10 pav. Dvigubos difuzijos metodas PVBL nustatymui [58]

Bakterijoms gaminant PVBLazes išryškėja specifinis fenotipas: (11 pav.) [58]:

- Susiformuoja susiliejanti (dobilo lapą primenanti) inhibicinė zona aplink visus antibiotikų diskus, esančius Petri lėkštelėje;
- Susiformavusi susiliejanti inhibicinė zona aplink AMC ir bent vieną iš šių antibiotikų diskų - CAZ, CRO, CTX, FEP;



**11 pav.** Kontrolinė padermė: *K. pneumoniae* ATCC 70063: **A.** Dobilo lapo inhibicinė zona ant Muller-Hinton agarizuotos terpės; **B.** *K. pneumoniae* ATCC 70063 kultūra ant McConkey terpės

(Nuotraukų autorius: Sandra Kareivienė)

### 2.6.3. Bakterijų, gaminančių PVBL, identifikavimas automatizuota Phoenix sistema

Tai modernus buljono mikropraskiedimų testas. Buljono praskiedimo metodikos esmę sudaro bakterijų augimo nustatymas skystoje mitybinėje terpėje, kurioje antimikrobinės medžiagos koncentracija mažinama, kaskart praskiedžiant dvigubai. Mažiausia antimikrobinės medžiagos koncentracija, kuriai esant nematoma bakterijų augimo, vadinama minimalia slopinančia koncentracija (MSK) [8].

#### Procedūros principai

Phoenix NMIC/ID-88 plokštelės (Becton Dickenson, Sparks, MD, JAV) skirtos greitai identifikuoti daugelį išskirtų iš žmogaus aerobinių ir fakultatyvinių anaerobinių gramneigiamų bakterijų ir nustatyti jautrumą antibiotikams su pasirinktomis antibakterinėmis medžiagomis. Ši plokštelė skirta naudoti tik su automatizuotos mikrobiologinės sistemos prietaisu Phoenix. Iš maišelio išimtas plokštelės būtina pradėti naudoti per 2 val [22].



Naudojant Phoenix kombinuotas plokšteles, vienu metu Phoenix aparatu galima atlikti ir identifikacijos, ir jautrumo antibiotikams tyrimus. Hermetizuotas ir automatiškai inokuliuojamas presuotas polistireno skydelis su 136 mikrošulinėliais, padengtais išdžiovintu reagentu, naudojamas vienkartinai. Kombinuota plokštelė turi identifikacijos (ID) dalį, kurioje yra išdžiovintas substratas bakterijų identifikacijai, ir JAT dalį, kurioje yra įvairių koncentracijų antimikrobinės medžiagos, augimo ir fluorescencinės kontrolinės medžiagos. Jautrumo antibiotikams tyrimui Phoenix sistemoje naudojamas optimizuotas (maksimaliai efektyvus) kolorimetrinis redokso indikatorius, o identifikacijai – keletas kolorimetrinių ir fluorometrinių indikatorių [2].

Phoenix plokštelę sudaro identifikacijos dalis su 51 šulinėliu ir JAT dalis su 85 šulinėliais. ID dalyje yra 45 šulinėliai su išdžiovintu biocheminiu substratu ir 2 šulinėliai su fluorescencine kontroline medžiaga. JAT dalyje yra 84 šulinėliai su išdžiovintomis antimikrobinėmis medžiagomis ir 1 šulinėlis augimo kontrolei [2].

Phoenix sistemoje naudojamas JAT metodas yra pagrįstas buljono kartotiniaus mikropraskiedimais. Naudojant redokso indikatorių, nustatomas mikroorganizmų augimas buljone su antimikrobine medžiaga periodiškai vertinant indikatoriaus pasikeitimus ir bakterijų sukeltą drumstumą. Kiekvienoje JAT plokštelėje yra keli antibiotikai, kurių koncentracijos kinta plačiame diapazone dvigubai mažėjančia seka. Remiantis MSK nustatomas mikroorganizmo jautrumas. [2].

## **Tyrimo eiga**

Tyrimui atlikti reikalingi komponentai: Mc Farlandometras suspencijos drumstumui matuoti, 25  $\mu$ L automatinė pipetė, automatinės pipetės antgaliai, Phoenix plokštelė su dangteliu, Phoenix ID buljonas, Phoenix JAT buljonas, Phoenix JAT indikatorinis tirpalas, Phoenix inokuliacijos stovas, Phoenix plokštelių konteineris [23].

Phoenix'o plokštelių šulinėliai yra užpildyti antibiotikais IVBL nustatymui: cefotaksimas/klavulaninė rūgštis, ceftazidimas/klavulaninė rūgštis, cefpodoksimas-proksetilis, ceftazidimas, cefriaksonas/klavulaninė rūgštis [22].

Su automatine pipete pritraukiama 25  $\mu$ l paruošto 0,5 Mc Farlando drumstumo inokulianto ir suleidžiama į JAT buljoną. Prieš tai į JAT yra įlašinamas vienas lašas JAT indikatoriaus [2].

Visas inokulianto turinys įpilamas į numatytą sritį Phoenix panelėje. Inokuliatas sklinda plokšte žemyn ir užpildo šulinėlius nuo viršaus į apačią. Inokuliacijos angos uždengiamos

dangteliais. Plokštelės dangtelio skiriamojėje dalyje yra oro tiekimo anga pro kurią tyrimo metu patenka reikalingas deguonis kiekis [2].

Paruoštos plokštelės įdedamos į Phoenix analizatorių ir kompiuterinė analizės sistema identifikuoja bakteriją (iki rūšies), nustatydamą jautrumą antibakterinėms medžiagoms [2].

## 2.7. Palyginamasis diagnostinių metodų įvertinimas

Tinkama laboratorinė diagnostika yra pagrindinė sąlyga kontroliuoti ir užkirsti kelią bakterijų, gaminančių PVBL, plitimui. Norėdami nustatyti diskų difuzijos metodų rezultatų patikimumą, atlikome kombinuoto diskų difuzijos ir dvigubos difuzijos metodų palyginimą su automatizuota PVBL nustatymo sistema Phoenix. Palyginamas atliktas kiekvienu metodu išaiškinant bakterijas, gaminančias PVBL.

Duomenys, gauti skirtingais tyrimų metodais (kombinuotu diskų difuzijos metodu, dvigubos difuzijos metodu ir Phoenix automatizuota sistema), buvo lyginami įvertinant metodų jautrumą ir specifiškumą. Diskų difuzijos metodų jautrumas ir specifiškumas buvo apskaičiuotas lyginant su Phoenix'o automatizuota sistema, kuri PVBL-azių nustatymui naudoja specialias plokšteles (NMIC/ID-88). Automatizuota sistema naudota kaip patvirtinantis metodas, kuriuo remiantis buvo diferencijuojamos bakterijos į PVBL gaminančias ir negaminančias.

Laboratorinio metodo jautrumas parodo testo gebėjimą aptikti tikrai teigiamą atvejį (t.y. PVBLazių nustatymą), jei bakterija iš tikrųjų gamina PVBL. Jis parodo, kokia yra tikimybė, kad PVBL gamybos atveju testo rezultatas bus teigiamas. Laboratorinio metodo specifiškumas parodo testo gebėjimą nustatyti tikrai neigiamą atvejį (t.y. kai PVBL negaminamos) [37, 60].

$$\text{Diagnostinis jautrumas} = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\% [37];$$

$$\text{Diagnostinis specifiškumas} = \frac{TN}{TN + FP} \times 100\% [37];$$

Čia TP (angl. *true positive*) – tikrai teigiamų mėginių skaičius, gautas automatizuota Phoenix sistema. FN (angl. *false-negative error rate*) – klaidingai neigiamų mėginių skaičius, gautas diskų difuzijos metodu, bet kurie buvo teigiami tiriant automatizuota Phoenix sistema [37, 60].

Čia TN (angl. *true negative*) – tikrai neigiamų mėginių skaičius, gautas automatizuota Phoenix sistema. FP (angl. *false-positive error rate*) – klaidingai teigiamų mėginių skaičius,

t.y. mėginiai buvę teigiami tiriant diskų difuzijos metodu, bet neigiami tiriant automatizuota Phoenix sistema [37, 60].

Jautrumas ir specifiškumas neatsako į du kliniciškai svarbius klausimus: jei bakterijos tyrimo rezultatas teigiamas, kokia tikimybė, kad ji tikrai gamina PVBL? Ir analogiškai – jei bakterijos tyrimo rezultatai neigiami, kokia tikimybė, kad ji negamina PVBL? Jautrumas ir specifiškumas į šiuos klausimus atsakymo nepateikia. Todėl skaičiuojama teigiama prognostinė vertė (angl. PPV – *positive prognostic value*) – tai sąlyginė tikimybė, kad bakterija, kurios testo rezultatas teigiamas, iš tikrųjų gamina PVBL. Analogiškai skaičiuojama neigiama prognostinė vertė (angl. NPV – *negative prognostic value*) – sąlyginė tikimybė, kad bakterija, kurios testo rezultatas neigiamas, iš tikrųjų negamina PVBL [60].

$$\text{Teigiama prognostinė vertė} = \frac{TP}{TP + FP} \times 100\% [60];$$

$$\text{Neigiama prognostinė vertė} = \frac{TN}{TN + FN} \times 100\% [60];$$

## 2.8. Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta taikant kompiuterinės statistikos SPSS-17 ir Microsoft OFFICE EXCEL 2003 programas. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .

### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Tyrimo rezultatai

##### 3.1.1. PVBLazių gamybos fenotipo tyrimas diskų difuzijos metodais

Tyrimų analizei buvo pasirinktos 58 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos, išskirtos 2009 - 2011 metais ligoniams, besigydžiusiems Vilniaus Universiteto ligoninės Santariškių klinikose. Visos tiriamos bakterijos ištirtos trimis metodais: automatizuota Phoenix sistema, kombinuotu diskų difuzijos metodu ir dvigubos difuzijos metodu. Automatizuota Phoenix sistema atliktame tyrime yra laikoma kaip patvirtinantis metodas identifikuojant bakterijas ir nustatant PVBLazių gamybą. Ištyrus 58 bakterijas patvirtinačiu metodu nustatėme, kad 31 iš jų gamina plataus veikimo beta-laktamazės. Tiriamojame grupėje buvo šios bakterijų rūšys: *K. pneumoniae*, *E.coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp. ir *Providencia* spp..

Ištyrus *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų PVBL fenotipą diskų difuzijos metodais, gavome tyrimų rezultatus, kurie nurodo PVBL gaminančias ir negaminančias bakterijas. Gauti tyrimų rezultatai yra apibendrinti 2 lentelėje.

2 LENTELE. PVBLazių nustatymas diskų difuzijos metodais

| <i>Enterobacteriaceae</i> n=58 (PVBL=31) |                  |                  |                      |                      |
|--|------------------|------------------|----------------------|----------------------|
| Metodas                                  | Tikrai teigiamas | Tikrai neigiamas | Klaidingai teigiamas | Klaidingai neigiamas |
| <b>Kombinuotas diskų difuzijos</b>       | 31               | 27               | 0                    | 0                    |
| <b>Dvigubos difuzijos</b>                | 31               | 24               | 3                    | 0                    |

Kombinuotu diskų difuzijos metodu nustatyta 31 bakterija, gaminančių PVBL, o dvigubos difuzijos metodu – 34 bakterijos, gaminančios PVBL.

Tiriant PVBL gamybą diskų difuzijos metodais gauti teigiami, PVBL gamybą nurodantys fenomenai 12 ir 13 pav.



**12 pav. *K. pneumoniae*, gaminanti PVBL – fenotipo tyrimas diskų difuzijos metodais** (kairėje-kombinuotas diskų difuzijos metodas; dešinėje-dvigubos difuzijos metodas)

(Nuotraukos autorius: Sandra Kareivienė)



**13 pav. *E. coli*, gaminanti PVBL – fenotipo tyrimas diskų difuzijos metodais** (kairėje-kombinuotas diskų difuzijos metodas; dešinėje-dvigubos difuzijos metodas)

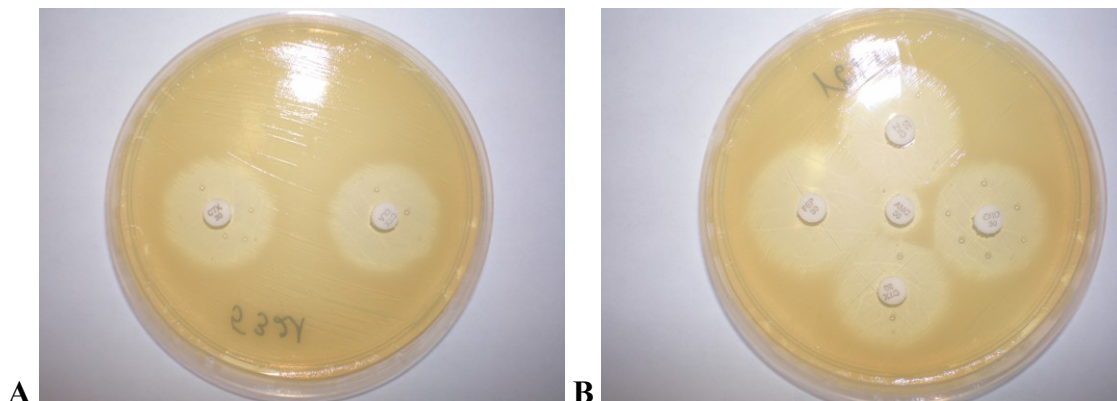
(Nuotraukos autorius: Sandra Kareivienė)

Tiriant kombinuotu diskų difuzijos metodu PVBL gamybą rodo augimo slopinimo zonų diametrų skirtumas  $\geq 5$  mm (12 pav. 17 mm; 13 pav. 19 mm). Tiriant dvigubos difuzijos metodu PVBL gamybos atveju susiformuoja susiliejanti (dobilo lapą primenanti) augimo slopinimo zona aplink visus antibiotikų diskus (12 ir 13 pav.) arba susiliejanti augimo slopinimo zona susidaro aplink amoksicilino/klavulaninės rūgšties (AMC) ir bent vieną iš antibiotikų diskų, esančių Petri lėkštelėje (cefotaksimo, cefriaksono, cefepimo).

Nesant PVBLazių gamybos gaunami neigiami fenotipo tyrimo rezultatai:

1) Atlikus tyrimą kombinuotu diskų difuzijos metodu ir esant zonų skirtumui  $\leq 5$  mm, rezultatas vertinamas, kaip neigiamas (pvz.: 14. A pav. inhibicinė zona 0 mm).

2) Dvigubos difuzijos metodu neigiamais tyrimų rezultatai yra laikomi, kai nėra susiliejiimo tarp augimo slopinimo zonų (14. B pav.).



14 pav. *Enterobacter cloacae*, negaminanti PVBL – fenotipo tyrimas diskų difuzijos metodais (A. Kombinuotas diskų difuzijos metodas; B. Dvigubos difuzijos metodas)

(Nuotraukų autorius: Sandra Kareivienė)

### 3.1.2. PVBL fenotipą nustatančių diskų difuzijos metodų diagnostinės charakteristikos

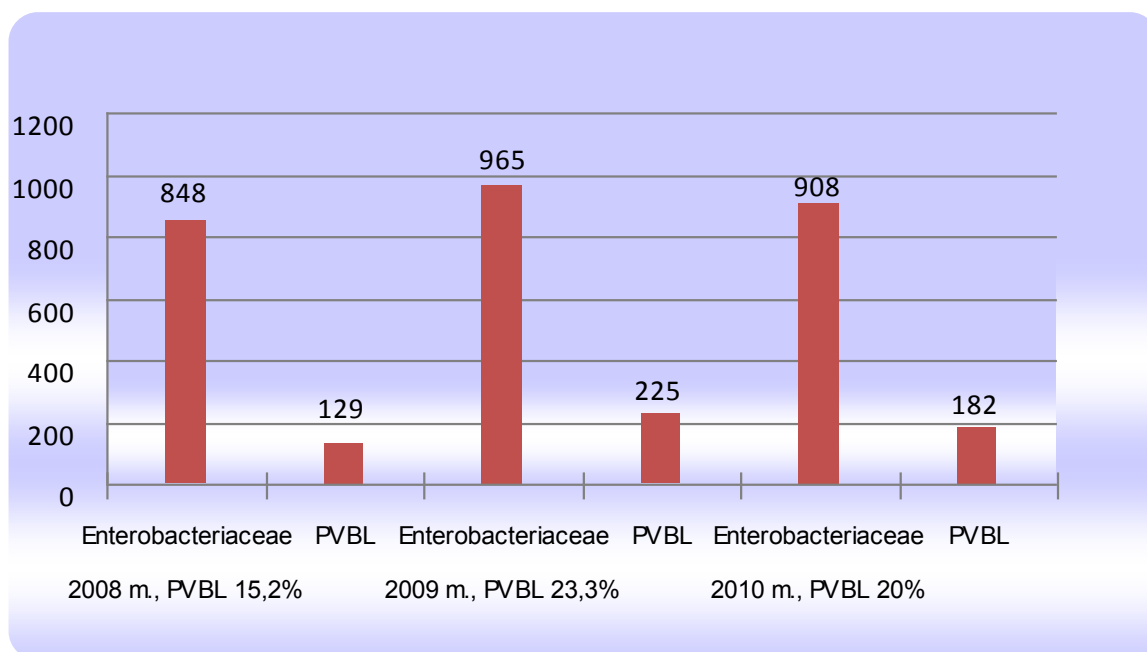
Atlikus tyrimus kombinuotu diskų difuzijos ir dvigubos difuzijos metodais, buvo įvertintas šių metodų jautrumas ir specifiškumas, taip pat apskaičiuota teigiama prognostinė vertė ir neigiama prognostinė vertė. Phoenix automatizuota sistema laikyta patvirtinančiu metodu, tyrimui naudotos specialios NMIC/ID-88 plokštelės, skirtos bakterijų identifikacijai ir PVBL nustatymui.

3 LENTELĖ. Fenotipinių diskų difuzijos metodų įvertinimas, nustatant PVBL

| <i>Enterobacteriaceae</i> n=58 (PVBL=31) |               |                   |                                |                                |
|--|---------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Metodas                                  | Jautrumas (%) | Specifiškumas (%) | Teigiama prognostinė vertė (%) | Neigiama prognostinė vertė (%) |
| <b>Kombinuotas diskų difuzijos</b>       | 100           | 100               | 100                            | 100                            |
| <b>Dvigubos difuzijos</b>                | 100           | 88,9              | 91,2                           | 100                            |

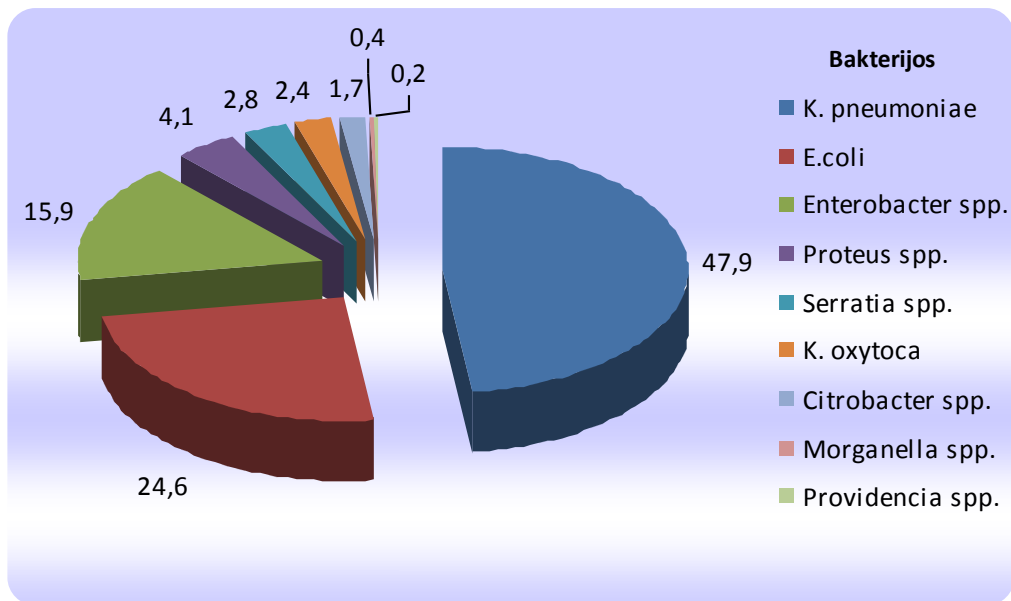
### 3.1.3. PVBLazių paplitimas Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008-2010 metais

Tiriant *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijas, buvo analizuojamas jų paplitimas 2008-2010 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose pasirinktuose skyriuose. 2008 m. buvo išskirta 848 enterobakterijų, iš kurių 129 (15,2%) sudarė PVBL gaminančios, 2009 m. – 965 enterobakterijos iš jų 225 (23,3%) PVBL gaminančios, o 2010 m. – 908, iš kurių 182 (20%) PVBL gaminančios. PVBL gaminančių padermių pagausėjimas 2009 metais yra statistiškai reikšmingas ( $p < 0,05$ ). *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų paplitimas pavaizduotas 16 pav. diagramoje.



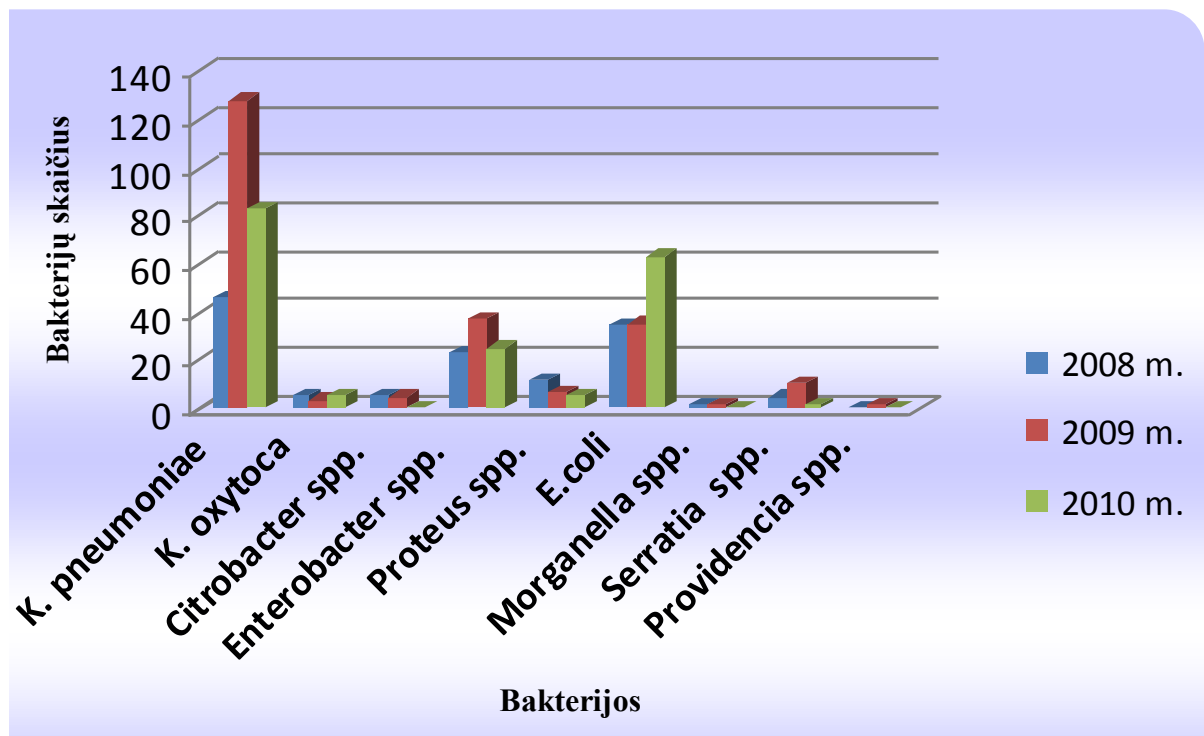
16 pav. *Enterobacteriaceae* ir PVBL paplitimas 2008-2010 metais

Iš 2008-2010 m. išskirtų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų PVBL gamino 536 (19,7%), iš kurių *K. pneumoniae* buvo išskirta 257 (47,9%), *E. coli* – 132 (24,6%), *Enterobacter* spp. – 85 (15,9%), *Proteus* spp. – 22 (4,1%), *Serratia* spp. – 15 (2,8%), *K. oxytoca* – 13 (2,4%), *Citrobacter* spp. – 9 (1,7%), *Morganella* spp. – 2 (0,4%) ir *Providencia* spp. – 1 (0,2%). Diagramoje (17 pav.) pateiktas bakterijų, gaminančių PVBL pasiskirstymas.



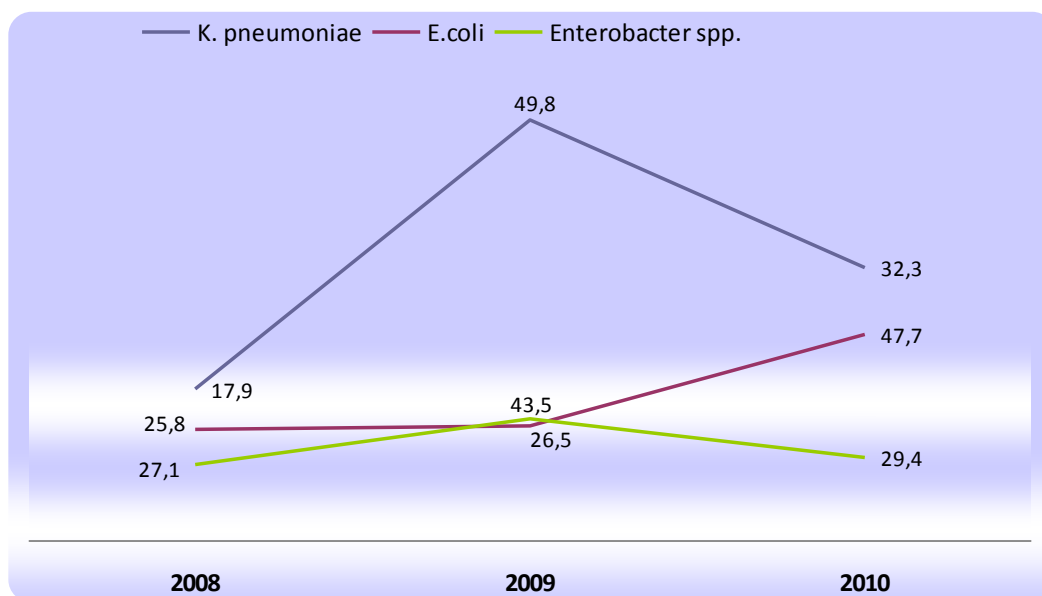
17 pav. Bakterijų, gaminančių PVBL paplitimas %, 2008-2010 metais

Tiriant bakterijų, gaminančių PVBL pasiskirstymą pagal metus, rasta, kad *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. ir *Serratia* spp. daugiausiai išskirta 2009 m., *E. coli* – 2010 m., o *Proteus* spp. – 2008 metais. Visos kitos bakterijos, gaminančios PVBL užima tik nedidelę dalį (18 ir 19 pav.).



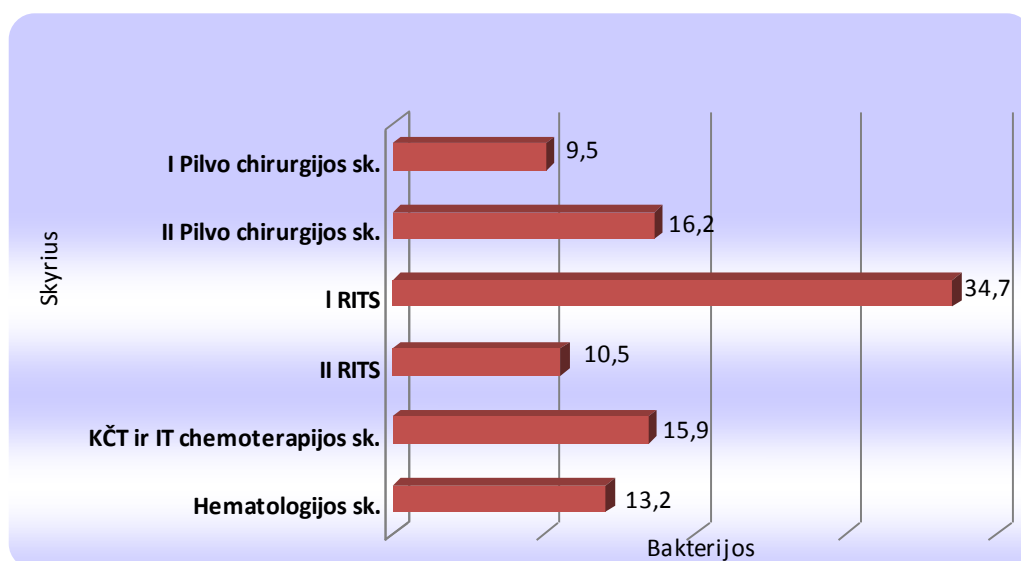
18 pav. Bakterijų, gaminančių PVBL paplitimas 2008-2010 metais





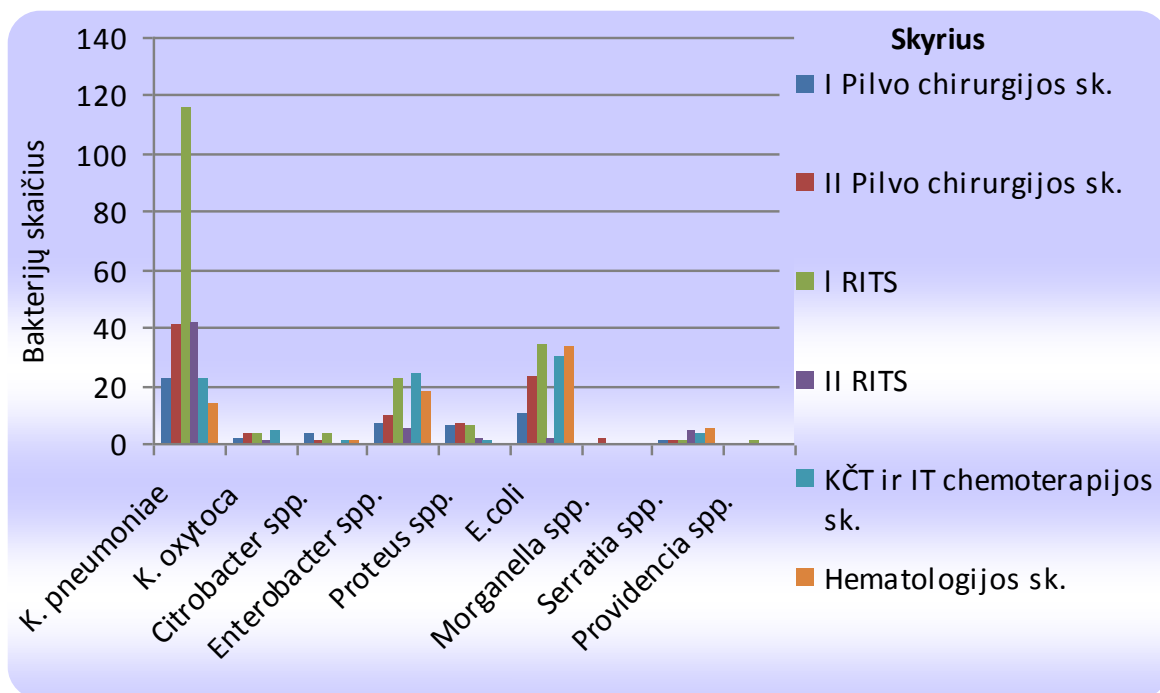
19 pav. *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, gaminančių PVBL paplitimas %, 2008-2010 metais

Norėdami įvertinti PVBLazių paplitimą 2008-2010 metais pasirinktuose Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų skyriuose, atlikome tyrimų analizę ir nagrinėjome, kuriame skyriuje šių bakterijų yra daugiausia (20 pav.). Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad I Pilvo chirurgijos skyriuje buvo išskirta – 51 (9,5%) bakterija, gaminanti PVBL, II Pilvo chirurgijos skyriuje – 87 (16,2%), I RITS – 186 (34,7%), II RITS – 56 (10,5%), Kaulų čiulpų transplantacijos ir intensyvios chemoterapijos skyriuje – 85 (15,9%), o Hematologijos – 71 (13,2%) bakterija, gaminanti PVBL. Didžiausias išskiriamų bakterijų (gaminančių PVBL) skaičius yra nustatytas I Renimacijos ir intensyvios terapijos skyriuje.



20 pav. PVBLazių paplitimas %, Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008-2010 metais

Atlikus detalesnę PVBL gaminančių bakterijų analizę buvo ištirtas jų pasiskirstymas pagal rūšį pasirinktuose Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų skyriuose (21 pav.).



21 pav. Bakterijų, gaminančių PVBL paplitimas pagal skyrius 2008-2010 metais

Pateiktoje diagramoje matyti, kad 2008-2010 metais I Reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriuje dažniausiai išskiriamos PVBLazių gamintojos buvo *K. pneumoniae*, kuri sudarė 116 (62,4%), *E. coli* – 34 (18,3%) ir *Enterobacter spp.* - 22 (11,9%). Iš diagramos matyti, kad 2008-2010 metais ir visuose kituose nagrinėjamuose skyriuose dažniausiai PVBL gamino *K. pneumoniae*, *E. coli* ir *Enterobacter spp.*

## 3.2. Rezultatų aptarimas

### 3.2.1. Phoenix automatizuotos sistemos ir diskų difuzijos metodų palyginimas

Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose mikrobiologijos laboratorijoje buvo atliktas diagnostinių metodų palyginimas, nustatant plataus veikimo beta-laktamazės (PVBL). Palyginamiesiems tyrimams pasirinkta automatizuota Phoenix sistema (Becton Dickenson, Sparks, MD, JAV), kuri buvo laikoma kaip patvirtinantis metodas PVBLazių nustatymui ir diskų difuzijos metodai: kombinuotas ir dvigubos difuzijos metodas. Atliekant diskų difuzijos metodus buvo naudojami antibiotikų diskai (Becton Dickenson, JAV) kuriais nustatytas PVBL gaminančių bakterijų fenotipas.

2008 metais atlikti PVBL tyrimai Carpermor Meksikos Mikrobiologijos laboratorijoje su Phoenix automatizuota sistema. Tyrimams naudotos *Escherichia coli* ir *Klebsiella pneumoniae* padermės, kurios buvo iširtos molekulinio ir diskų difuzijos metodais pagal KLSI rekomendacijas. Tyrimas nustatė, kad Phoenix automatizuotos sistemos jautrumas PVBL nustatymui yra 99%, tiriant *Escherichia coli* ir *Klebsiella pneumoniae* padermes [17].

Atlikus tyrimus nustatėme, kad **kombinuoto diskų difuzijos metodo** jautrumas - 100%, specifiskumas - 100%, teigiamas prognostinis dydis - 100% ir neigiamas prognostinis dydis - 100%. Vertinant šias tyrimo charakteristikas, galima teigti, kad šis metodas yra greitas ir 100% patikimas PVBLazių nustatymui. Rezultatai, gauti mūsų tyrime, atitinka daugelio pasaulio laboratorijų paskelbtus tyrimų rezultatus.

Jungtinėse Amerikos valstijose Detroito mikrobiologijos laboratorijoje buvo vertinamas kombinuotas diskų difuzijos metodas PVBL nustatymui. Tyrimams naudojo CAZ; CAZ/CLA ir CTX; CTX/CLA antibakterinių medžiagų diskus. Vėliau nustačius inhibicines zonas pagal KLSI rekomendacijas vertinama PVBL gamyba, jei zonų dydžio skirtumas  $\geq 5$  mm, tai patvirtinama PVBL gamyba. Šis tyrimas nustatė, kad šio metodo jautrumas, tiriant PVBL yra 100%, o specifiskumas 98%. [33].

Remiantis Amerikos Nacionalinio komiteto klinikiniais laboratoriniais standartais (NCCLS), Amerikoje buvo atliktas PVBLazių metodų palyginimas. Tyrimams naudotos padermės iširtos trimis metodais: automatizuota Vitek ir Microscan sistema, taip pat E-testu (AB Biodisk). Visų tiriamų metodų jautrumas buvo virš 90%. Vėliau Vitek automatizuotos sistemos PVBLazių aptikimas buvo palygintas su kombinuotu diskų difuzijos metodu. Rezultatai parodė, kad šių dviejų metodų jautrumas buvo panašus (98,6% kombinuotu diskų difuzijos metodu ir 99,7% su Vitek sistema), o specifiskumas kombinuotu diskų difuzijos metodu – 99,4% ir 100% su Vitek automatizuota sistema [25].

Meksikoje, tretinio lygio priežiūros centre, buvo atlikti tyrimai, naudojant kraujo pasėlius. Bakteriemijai nustatyti naudota BACTEC automatizuota sistema (Becton Diskinson, MD, JAV), o bakterijų identifikacijos ir jautrumo tyrimai atlikti Vitek automatizuota sistema (bioMerieux, Lyon, Prancūzija), kuri šiame tyrime buvo įvardinta kaip "aukso standartu". Tyrimo tikslas: palyginti automatizuotą sistemą su kombinuotu diskų difuzijos metodu. Tyrimų rezultatai parodė, kad kombinuotas diskų difuzijos metodas yra 100% patikimas, nes atliktame tyrime, buvo išskirta 113 bakterijų, iš kurių 25 gamino PVBL, šio tyrimo jautrumas - 100%, specifiskumas 100%, PPV - 100%, NPV - 100%. Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad tiriant kraujo mėginius kombinuotu diskų difuzijos metodu rezultatai yra 100% tikslūs ir patikimi [10].

Atlikus tyrimus naudojant **dvigubos difuzijos metodą** nustatėme, kad šio tyrimo jautrumas - 100%, specifiškumas – 88,9%. Taip pat įvertinus prognostinę vertę gavome, jog teigiama prognostinė vertė yra 91,2%, o neigiama prognostinė vertė – 100%.

Italijoje 2002 metais atliktame tyrime buvo atlikti PVBL nustatymo tyrimai su Phoenix automatizuota sistema. Phoenix'o plokštelės užpildytos CAZ/CLA, CAZ, CTX/CLA, CPD, CRO/CLA antibakterinėmis medžiagomis. Tyrimams buvo naudojama 510 kultūrų iš *Enterobacteriaceae* šeimos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* ir *Citrobacter koser*. Visos bakterijų padermės buvo iširtos molekulinio ir dvigubos difuzijos metodais. Pastarojo metodo atveju buvo naudoti aztreonamo, ceftazidimo, cefepimo, ceftriaksono ir cefotaksimo antibiotikų diskai, o centre Petri lėkštelės - amoksicilino/klavulaninės rūgšties (AMC) diskas. Rezultatai parodė, kad iš 510 tiriamų bakterijų 319 buvo PVBL gaminančios ir 191 neišskiriančios PVBLazių. Ištyrus su Phoenix automatizuota sistema, nustatytas dvigubos difuzijos tyrimo jautrumas PVBL aptikimui,(100%) ir specifiškumas (98,9%). Dvi bakterijų padermės Phoenix automatizuota sistema nustatė kaip klaidingai teigiamas, tai buvo *K. oxytoca*, gaminanti K1 fermentą. Šis tyrimas teigė, kad Phoenix automatizuota sistema yra greitas ir gan patikimas būdas nustatyti gramneigiamas bakterijas, gaminančias PVBL [51].

JAV atlikti tyrimai su Vitek automatizuota sistema ir dvigubos difuzijos metodu parodė, kad dvigubos difuzijos metodas yra patikimas norint nustatyti PVBL. Buvo tiriamos 364 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos dvigubos difuzijos metodu ir šio metodo jautrumą įvertino 98,1%, specifiškumą 99,4%. [50].

Indijos sostinėje Delyje, medicinos fakultete buvo atliekami tyrimai, kuriuose nurodoma, kad dvigubos difuzijos metodo jautrumas gali svyruoti nuo 79%-97%, o specifiškumas nuo 94%-100%. Teigiama, kad sumažėjęs metodo jautrumas PVBLazių aptikimui gali būti dėl silpnesnio plataus veikimo beta-laktamazių aktyvumo, kuris dažnai pasireiškia *Proteus mirabilis* padermėse [11].

Vokietijoje atlikti palyginamieji Phoenix automatizuotos sistemos (su paprastomis plokštelėmis, kurios nėra specialiai skirtos PVBL nustatymui) ir diskų difuzijos metodų tyrimai *Enterobacteriaceae* šeimos, gaminančios plataus veikimo beta-laktamazes parodė, kad Phoenix automatizuota sistema yra jautriausias būdas nustatyti PVBL. Molekulinio metodu, kuris buvo laikomas kaip patvirtinantis PVBLazių gamybą, iširtos 144 padermės, iš kurių 85, gaminačios PVBL. Apibendrinti tyrimų duomenys parodė, kad Phoenix automatizuotos sistemos jautrumas

siekė 98,8%, dvigubos difuzijos metodo – 94,1% ir kombinuoto diskų difuzijos metodo – 92,9%. [62].

Apibendrinus palyginamųjų tyrimų duomenis buvo nustatyta, kad diskų difuzijos metodai yra jautrūs ir patikimi, nustatant bakterijų, gaminančių PVBL, fenotipą. Palyginus mūsų tyrime gautas dvigubos difuzijos metodo diagnostines charakteristikas su kombinuoto diskų difuzijos metodo charakteristikomis, galime teigti, kad tiriant bakterijų PVBL fenotipą kombinuotas diskų difuzijos metodas yra specifiškesnis nei dvigubos difuzijos metodas.

### **3.2.2. 2008-2010 metų PVBLazių paplitimo analizė Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose**

Buvo išanalizuotas *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų, gaminančių PVBL paplitimas Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008 - 2010 metais.

Nustatyta, kad 2008-2010 metais PVBL gaminačių padermių paplitimas siekė 19,7%. Šis paplitimas panašus į kitų Europos šalių paplitimo rodiklius: straipsnyje, kuriame nagrinėtas PVBL paplitimas Europoje yra nurodoma, kad PVBL paplitimas sudaro virš 10% Vengrijoje, Lenkijoje, Rumunijoje, Rusijoje ir Turkijoje [9]. Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad daugiausia PVBLazių nustatyta 2009 metais (16 pav.), o 2010 metais jų vėl sumažėjo. Todėl galime teigti, kad PVBL, gaminančioms bakterijoms būdingi pagausėjimai.

Ivairiuose moksliniuose straipsniuose yra teigiama, jog PVBLazių vystymuisi turi įtakos dirbančio personalo higiena, todėl būtina mūvėti pirštines ir dėvėti chalatus, reguliariai dezinfekuoti rankas, norint išvengti plintančios infekcijos, taip pat labai svarbu apriboti cefalosporinų vartojimą, ko pasekoje taip pat išsivysto atsparios padermės. Buvo atlikti tyrimai Ispanijoje dėl PVBLazių paplitimo, kurių metu laikėsi higienos reikalavimų ir teisingo antibiotikų vartojimo. Tyrimo eigoje pastebėta, kad PVBLazes gaminančių bakterijų ženkliai sumažėjo. Tokie pat tyrimai buvo atlikti ir Niujorke, kurių metu taip gautas PVBLazes gaminančių padermių sumažėjimas. O Prancūzijos ligoninėje atlikti tyrimai patvirtino, kad norint sustabdyti PVBL paplitimą labai svarbu dėvėti chalatus ir mūvėti pirštines, nes nuo 1992 iki 1995 metų, laikantis higienos reikalavimų, PVBL gaminančių bakterijų sumažėjo nuo 172 iki 19 atvejų, nekontroliuojant cefalosporinų vartojimo. Norint išvengti PVBLazių kolonizacijos taip pat siūloma vienai personalo darbuotojai slaugyti tik vieną ligonį, dažnai plauti rankas, tokiu būdu galima išvengti PVBLazių plitimo nuo vieno ligonio kitam. Ir, jeigu yra galimybė, atskirti ligonius, paguldžius juos į skirtingas palatas [53, 27, 15].

Atliktų tyrimų duomenimis, 2008-2010 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose iš *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų, gaminančios PVBL dažniausiai yra *K. pneumoniae*, *E. coli* ir *Enterobacter* spp. (17 pav.). Lyginant su kitomis PVBL gaminančiomis bakterijų rūšimis *K. pneumoniae* sudarė 257 (47,9%), *E. coli* – 132 (24,6%), o *Enterobacter* spp. – 85 (15,9%). Minėtos bakterijos ir kitose šalyse yra įvardijamos kaip dažniausiai sutinkamos tarp hospitalinių infekcijų sukėlėjų. Pagal JAV Nacionalinės hospitalinių infekcijų priežiūros (NNIS) sistemos 2004 m. ataskaitą buvo ištirtas bakterijų jautrumas trečios kartos cefalosporinams intensyvios terapijos skyriuose JAV valstijoje. Tyrimų rezultatai pateikti nurodant dažniausiai nustatomą atsparumą trečios kartos cefalosporinams šių bakterijų: *K. pneumoniae* padermės sudarė – 20,6%; *Enterobacter* spp. – 31,1%; *E. coli* – 5,8% [50]. Kitame straipsnyje teigiama, jog dažniausiai pasitaikančios infekcijos, kurias sukelia PVBL yra dėl *K. pneumoniae* ir *E. coli* mutuojančių bakterijų. JAV atliktame tyrime paaiškėjo, jog iš 63 gramneigiamų bakterijų 3,2% sudarė PVBL gaminančios, o 40 buvo *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos tarp kurių *K. pneumoniae* ir *E. coli* buvo įvardintos kaip dažniausiai sutinkamos tarp PVBL [54].

Diagramoje (18 pav.), kurioje bakterijos gaminančios PVBL, išskirstytos pagal metus, matyti, jog 2008 metais daugiausia išskirta *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., 2009 metais – *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., o 2010 metais – *E. coli*. *K. oxytoca* buvo išskirtas vienodas skaičius 2008 ir 2010 metais. Taip pat ir *Morganella* spp. Padermėmių buvo aptiktas vienodas skaičius 2008 ir 2009 metais. Atliktų tyrimų duomenimis paaiškėjo, kad dažniausiai sutinkamos, gaminančios PVBL bakterijos Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose, yra *K. pneumoniae*, *E. coli* ir *Enterobacter* spp.

Infekcijos pasireiškusios dėl *K. pneumoniae* ir *E. coli* bakterijų dažnai yra siejamos su dirbtine plaučių ventiliacija ir kateterių naudojimu [39, 28]. *E. coli* ir *K. pneumoniae* yra išskiriamos kaip pagrindiniai HI patogenai, sukeliančios pilvo ertmės, šlapimo takų ir kraujo infekcijas [28]. Prieš tai pateiktoje diagramoje (18 pav.) matyti, kad 2009 metais PVBL pagausėjimas yra siejamas su įvykusiu *K. pneumoniae* pagausėjimu. Viename literatūros šaltinyje yra pateikiama, jog *K. pneumoniae* gali sukelti HI protrūkius, o *E. coli* vis dažniau yra sutinkama [9]. Tai matyti ir mūsų pateiktoje diagramoje (19 pav), kur *E. coli* skaičius yra didėjantis kiekvienais metais. *Enterobacter* spp. skaičius kinta taip pat kaip ir *K. pneumoniae*, t.y. 2009 metais padidėja, po to ima palaipsniui mažėti.

Buvo atlikta tiriamų bakterijų analizė pagal pasirinktus skyrius 2008-2010 m.: I Reanimacijos ir intensyvios terapijos skyrius (RITS), II Reanimacijos ir intensyvios terapijos

skyrius (RITS), I Pilvo chirurgijos skyrius, II Pilvo chirurgijos skyrius, Hematologijos skyrius, Kaulų čiulpų transplantacijos ir intensyvios chemoterapijos skyrius. Gautų tyrimų rezultatų duomenimis, nustatyta, kad daugiausia PVBLazes gaminančių bakterijų yra išskiriama I RITS-iuje. Panašus PVBL gaminančių bakterijų skaičius aptinkamas II Pilvo chirurgijos ir Kaulų čiulpų transplantacijos ir intensyvios chemoterapijos skyriuje. Mažiausiai jų buvo išskirta II RITS ir I Pilvo chirurgijos skyriuje (20 pav.).

I Reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriuje dažniausiai PVBL gamino *K. pneumoniae* padermės. *K. pneumoniae* pagausėjimas buvo būdingas visiems skyriams, pasirinktiems tyrimų analizei (21 pav.).

## IŠVADOS

1. Ištyrus 58 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijas diskų difuzijos metodais, nustatytos bakterijos, gaminančios plataus veikimo beta-laktamazes (PVBL). Kombinuotu diskų difuzijos metodu rasta 31 bakterija, gaminanti PVBL, o dvigubos difuzijos metodu – 34 bakterijos, gaminančios PVBL. Trys klaidingai teigiami rezultatai buvo gauti dvigubos difuzijos metodu.
2. Atlikus diagnostinių metodų palyginamuosius tyrimus, nustatyta, kad kombinuoto diskų difuzijos metodo jautrumas 100%, specifiškumas 100%, teigiama prognostinė vertė 100% ir neigiama prognostinė vertė 100%. Dvigubos difuzijos metodo jautrumas 100%, specifiškumas 88,9%, teigiama prognostinė vertė 91,2% ir neigiama prognostinė vertė 100%. Remiantis tyrimų rezultatais galima teigti, kad diskų difuzijos metodai yra greiti ir tikslūs, norint nustatyti PVBL gaminančių bakterijų fenotipą.
3. Įvertinus PVBLazes gaminančių bakterijų paplitimą Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose 2008-2010 metais, nustatyta, kad *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijoms, gaminančioms PVBL, būdingi augimo padažnėjimai. Bakterijų, gaminančių PVBLazes daugiausiai išskirta 2009 metais, o 2010 metais jų vėl sumažėjo. Didžiausias PVBL gaminančių bakterijų pagausėjimas buvo I Reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriuje. Dažniausiai išskiriama PVBL gaminanti bakterija yra *K. pneumoniae*.



## SUMMARY

### **Comparison of laboratory methods determining extended spectrum $\beta$ -lactamase phenotype of *Enterobacteriaceae* and the prevalence analysis of these enzymes in Vilnius university hospital Santariskiu clinic in 2008 - 2010 years.**

The aim of this study is to compare disk diffusion and automated methods for determining the *Enterobacteriaceae* extended spectrum- $\beta$ -lactamases (ESBL) phenotype and to assess the prevalence of (ESBL) at University Hospital Clinics in 2008-2010.

For the study were chosen 58 bacteria from the Enterobacteriaceae family that were isolated in 2009-2011 in patients that were treated at Vilnius University Hospital Clinic. The bacteria studied using phenotypic methods ESBL: Phoenix automated system (Becton Dickenson, Sparks, MD, USA) combined disc diffusion method and the double-diffusion method. Automated system of Phoenix for the study was considered as a method of confirming the identification of bacteria and determination of (ESBL) production phenotype. The studied group consisted of the following bacterial species: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp. and *Providencia* spp. The examination with the validated method of 58 bacteria showed that 31 of them produce an extended spectrum beta lactamases. A performed comparative disc diffusion method was made and the evaluation of the sensitivity, specificity, positive prognostic value (PPV) and negative prognostic value (NPV) was identified.

The evaluation of the data from studies showed that the combined disc diffusion method for sensitivity - 100% and specificity - 100%, PPV - 100%, NPV - 100%. Double-diffusion method for sensitivity - 100% and specificity - 88.9%, PPV - 91.2%, NPV - 100%. The obtained results show that disk diffusion methods are sensitive and reliable for determination of bacteria producing ESBL phenotype.

The analysis of the *Enterobacteriaceae* producing ESBL prevalence in 2008-2010 in selected sections showed that within three years, there have been isolated in 2721 *Enterobacteriaceae*, of which 536 (19.7%) were strain produces of an extended spectrum beta lactamases. It was found that in 2008 848 *Enterobacteriaceae* isolated, of which 129 (15.2%) were producing ESBL, 2009 -965 Enterobacteriaceae from 225 (23.3%) producing ESBL in 2010 - 908, of whom 182 (20%) producing ESBL. ESBL are mostly produced by *K. pneumoniae*, 257 (47.9%), *E. coli* 132 (24.6%) and *Enterobacter* spp. 85 (15.9%). Maximum producing of ESBL bacteria was in the I reanimation the intensive care room.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju VU, Medicinos fakulteto, fiziologijos, biochemijos ir laboratorinės medicinos katedros Dr. Silvijai Kiverytei už visapusišką pagalbą ir vertingus patarimus viso darbo metu.

Taip pat esu dėkinga Vilniaus Universiteto Santariškių klinikų, Laboratorinės diagnostikos centro, klinikinės mikrobiologijos laboratorijos darbuotojai Astai Mačionienei už pagalbą įsisavinant tyrimo metodus, taip pat ačiū kitoms laboratorijos darbuotojoms.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ambrozaitis A., Gulbinovič J., Marcinbutė A. Infekcijos ir priešinfekciniai vaistai. Vilnius, 2004. – 13-15p.
2. BD Phoenix™ sistemos vartotojo vadovas.
3. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2001;32(7):1085-1089.
4. Bush K., George A. Jacoby and Antone A. Medeiros. A Functional Classification Scheme for b-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1995 (June); p. 1211-1233.
5. Carter MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore DM. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. J Clin Microbiol 2000; 38: 4228–4232.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: CLSI, 2005.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth informational Supplement. CLSI document M100 – S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 – 1898 USA, 2007.
9. Coque TM., F Baquero, R Canton. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. Eurosurveillance 2008; 20 November.
10. Cuellar-Rodriguez Jennifer M., Ponce-de-Leon A., Quiroz-Mejia R., Galindo-Fraga A., Sifuentes-Osornio J. et al.. Rapid detection of ESBL-producing gram-negative bacteria isolated from blood: a reasonable and reliable tool for middle and low resource countries. Revista de Investigación Clínica; 2009; 61 (4): 306-312.
11. Deepti Rawat and Deepti Nair. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram Negative Bacteria. J Glob Infect Dis. 2010 Sep–Dec; 2(3): 263–274.

12. Di Martino P, Livrelli V, Sirot D, Joly B, Darfenille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. 1996;64(6):2266-2273.
13. Di Martino P, Sirot D, Joly B, Rich C, Darfenille-Michaud A. Relationship between adhesion to intestinal Caro-2 cells and multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. J Clin Microbiol. 1997;35(6):1499-1503.
14. Drieux L., Brossier F., Sougakoff W. and Jarlier V.. Phenotypic detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (Suppl. 1): 90-103.
15. Dror Marchaim, MD. Infections in the intensive care unit. UpToDate. 2010.
16. Džidic Senka, Šuškovac Jagoda, Kos Blaženka. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. Biotechnology 2008; 46 (1): 11-21.
17. Fagundo-Sierra R., Cerros-Santos MA., Pérez-Jáuregui J., García-López ES., Mata-Rocha M., Andrade-Almaraz V. Evaluación del equipo automatizado Phoenix para la detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Bioquímica; Volumen 33 No. 3 Julio-Septiembre 2008. p. 94-102.
18. Ferrara AM. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int J Antimicrob Agents. 2006;27(3):183-195.
19. Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL producing microorganisms. Clin Microbiol Infect. 2001;7:597-608.
20. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. Chest. 2000;118(1):146-155.
21. John Quale MD, Denis Spelman. Carbapenemases. UpToDate. 2010.
22. Juhi Taneja, Bibhabati Mishra, Archana Thakur, Vinita Dogra, Poonam Loomba Nosocomial blood-stream infections from extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from GB Pant Hospital, New Delhi. J Infect Dev Ctries 2010; 4(8): 517-520.

23. Kauno medicinos universiteto klinikinės mikrobiologijos centras. Lietuvos Respublikos Sveikatos apsaugos ministerija Higienos institutas. Klinikiniai mikrobiologiniai tyrimai (metodinės rekomendacijos). Vilnius, 1999.
24. Kollef HM. Appropriate Empiric Antimicrobial Therapy of Nosocomial pneumonia: The Role of the Carbapenems. *Respir Care*. 2004;49(12):1530-1541.
25. Lasinskaitė-Čerkašina A, Pavilionis A, Vaičiuvėnas V. Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai. Kaunas, 2005.
26. Lasinskaitė-Čerkašina A, Pavilionis A, Vaičiuvėnas V. Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai. Kaunas, 2003.
27. Linscott AJ, Brown WJ. Evaluation of four commercially available extended-spectrum beta-lactamase phenotypic confirmation tests. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1081–1085.
28. M'Zali FH, Chanawong A, Kerr KG, Birkenhead D, Hawkey PM. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the Etest ESBL. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 881–885.
29. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1306-1311.
30. Mizuta K, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I, Kato N. Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsule (K) types. *Infect Immun*. 1983;40:56-61.
31. Mockeliūnienė V., Šalomskas A., Mockeliūnas R., Liutkevičienė V. ir kt. Palyginamasis diagnostinių metodų įvertinimas tiriant virusine diarėja persirgusių galvijų specifinę imunologinę būklę. Kaunas, 2006. ISSN 1392-2130. Veterinarija ir zootechnika. T. 34 (56).
32. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Griadkowski M. Concurrent outbreaks of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in Warsaw Hospital. *J Antimicrob Chemoter*. 1999;44:489-499.
33. Panhotra BR, Saxena AK, Al-Ghamdi AM. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* hospital acquired bacteremia. Risk factors and clinical outcome. *Saudi Med J* 2004;25(12):1871-6.

34. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, Michael A Pfaller. Manual of Clinical microbiology. 9th ed. Department of Laboratory Medicine, National Institutes of Health Clinical Center, Bethesda, Maryland, 2007, Volume 1. p. 649-666.
35. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H. Yolken. Manual of Clinical microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology 1999, p. 1505 – 1696.
36. Patterson JE. Antibiotic utilization. Is there an effect on antimicrobial resistance? Chest. 2001; 119: 426S-430S.
37. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11:589-603.
38. Povilonis, A. Lasinskaitė-Čerkašina, V. Vaičiuvėnas. Diagnostinė mikrobiologija. Kaunas, 2007.
39. Reuben Ramphal MD. Gram-negative bacillary bacteremia in adults. UpToDate. 2010.
40. Robert Gaynes, MD. Epidemiology and microbiology of intravascular catheter infections. UpToDate. 2010.
41. Sahly H, Aucken H, Benedi VJ, Forestier C, Fussing V, Hansen DS et al. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23:20-26.
42. Sahly H, Aucken H, Benedi VJ, Forestier C, Fussing V, Hansen DS, et al. Association between extended-spectrum betalactamase production, O serotypes and serum resistance properties in *Klebsiella* isolates from different European countries. Clin Microbiol Infect 2001;7:286.
43. Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA, Greiwe M, Parolis H, Hasty D et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity. 2000;6744-6749.
44. Sanders C., Barry A.L., Washington J.A., Shubert C., Moland E.S. et al. Detection of Extended-Spectrum-b-Lactamase-Producing Members of the Family *Enterobacteriaceae* with the Vitek ESBL Test. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1996, p. 2997–3001.

45. Sanguinetti M., Posteraro B., Spanu T., Ciccaglione D., Romano L., Fiori B., Nicoletti G., Zanetti S., and Fadda G. Characterization of Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix Extended-Spectrum-Lactamase Detection Method. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2003, p. 1463–1468.
46. Schreckenberger P., PhD and Violeta Rekasius, MT(ASCP). A Ten Disk Procedure for the Detection of Antibiotic Resistance in *Enterobacteriaceae*. Loyola University Medical Center, Maywood, Illinois; 2008.
47. Silvia Munoz-Price L. MD, George A. Jacoby MD. Extended-spectrum beta–lactamases. UpToDate. 2010.
48. Smith Moland EA, Black JA, Hanson ND, Hossain A, ABDalhamid B et al. Prevalence of ESBLs in the United States. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003 Sep 14-17*; 43: abstract no. C2-46.
49. Stephen B. Calderwood, MD. Overview of the beta-lactam antibiotics. UpToDate. 2010.
50. Stürenburg Enno, Sobottka Ingo, Noor Djahesh, Laufs Rainer and Mack Dietrich. Evaluation of a new cefepime–clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in an *Enterobacteriaceae* strain collection. *J. Antimicrob. Chemother*, 2004; 54 (1): 134-138.
51. Thomas M. File, JR, MD. Epidemiology, pathogenesis, microbiology, and diagnosis of hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia in adults. UpToDate. 2010.
52. Toronto Medical Laboratories/Mount Sinai Hospital Microbiology Department .Appendix III - Double Disk Test for ESBL. *Antimicrobial Susceptibility Testing Manual*, 2005.
53. Torres A, Bauer TT, Leon-Gil C, Castillo F, Alvarez-Lerma F, Martinez-Pellus A et al. Treatment of severe nosocomial pneumonia: a prospective randomised comparison of intravenous ciprofloxacin with imipenem/cilastatin. *Thorax*. 2000;55(12):1033-1039.
54. Venslovienė J. *Statistiniai metodai medicinoje*. Kaunas, 2010; p.292-299.
55. Wen-Liang Yu, MD. Overview of *Klebsiella pneumoniae* infection. UpToDate. 2010.
56. Wiegand I., Geiss H.K., Mack D., Stürenburg E. and Seifert H.. Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacteriaceae* by Use of

- Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2007, p. 1167–1174.
57. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variation in the prevalence of strains expressing an extended spectrum beta-lactamase phenotype and characterisation of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clin Infect Dis*. 2001;32:S94-S103.
  58. [http://www.biofizikai.lt/downloads/Mikr\\_lab\\_darb\\_123.doc](http://www.biofizikai.lt/downloads/Mikr_lab_darb_123.doc).
  59. <http://medicallsciences.wordpress.com/> Bacterial Resistance.
  60. <http://www.bd.com>. BD Diagnostic Systems. Naudojimo Instrukcija – paruošta naudoti terpè lèkštelèse PA-254005.04. June 2009.
  61. <http://www.bd.com>. Phoenix NMIC/ID – 76 Naudojimomo paskirtis; 2011.
  62. <http://www.bd.com/ds/productCenter/IS-Phoenix.asp>. BD Phoenix™ Automated Microbiology System.
  63. <http://www.bpgkolegija.lt/news>. Dauginio atsparumo antibiotikams Enterobakterijų paplitimas.
  64. [http://www.medscape.com/viewarticle/409761\\_4](http://www.medscape.com/viewarticle/409761_4). Extended-Spectrum Beta-Lactamases: Problems Associated with ESBLs.

Paveikslèliai:

<http://medicallsciences.wordpress.com/> (3, 4, 5 pav.).

<http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/Chemotherapy/BetaLactamAntibiotics.htm>. Beta lactam ring structure (2 pav.).

<http://www.textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/antimicrobial.html> (1pav.).