



VILNIAUS UNIVERSITETO
MEDICINOS FAKULTETO
ŽMOGAUS IR MEDICININĖS GENETIKOS KATEDRA

MAGISTRO DARBAS

*KARBAPENEMAZIŲ GENŲ TYRIMAS TIKRO LAIKO POLIMERAZĖS GRANDININĖS
REAKCIJOS METODU*

Magistrantė
ŠARŪNĖ VITKUTĖ

(parašas)

Darbo vadovė
Dr. SILVIJA KIVERYTĖ

(parašas)

Konsultantas
Dr. MAKSIM BRATČIKOV

(parašas)

VU MF Žmogaus ir medicininės
genetikos katedros vedėjas
prof. (HP) dr. ALGIRDAS UTKUS

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data 2017.05.15
Registracijos Nr. _____

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Karbapenemazės	7
1.2. Karbapenemazių klasifikacija	7
1.2.1. A klasės karbapenemazės	8
1.2.2. B klasės karbapenemazės.....	9
1.2.3. C klasės β-laktamazės	10
1.2.4. D klasės karbapenemazės	11
1.3. <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> ir <i>A. baumannii</i> (EPA) rūšių genetinė struktūra....	11
1.4. Antibakteriniai vaistai – karbapenemai.....	12
1.4.1. Karbapenemų veikimo mechanizmas	13
1.4.2. Atsparumo karbapenemams mechanizmai	13
1.5. Karbapenemazių ir karbapenemams atsparių bakterijų paplitimas pasaulyje.....	14
1.6. Karbapenemazių ir karbapenemams atsparių bakterijų paplitimas Lietuvoje	14
1.7. Fenotipiniai karbapenemazių nustatymo metodai.....	16
1.7.1. Karbapenemazes gaminančių bakterijų atranka	16
1.8. Molekuliniai genetiniai karbapenemazių nustatymo metodai.....	17
1.8.1. PGR metodai.....	18
1.8.2. Tikro laiko PGR metodai	19
1.9. Karbapenemazių nustatymo svarba.....	20
2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS	20
2.1. Mėginių rinkimas	20
2.2. Mikroorganizmų kultūros šviežinimas.....	20
2.3. Mikroorganizmų kultūros šaldymas.....	21
2.4. Tiriamosios medžiagos paruošimas	21
2.4.1. Šaldytų mėginių šviežinimas	21
2.4.2. Bakterijų DNR paruošimas	22
2.5. Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija.....	22
2.5.1. TL-PGR naudojamos medžiagos ir įranga.....	22
2.5.2. TL-PGR rezultatų analizė	27
2.6. Statistinė duomenų analizė.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	28
3.1. <i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų tyrimo rezultatai	28

3.1.1.	Tiriamųjų amžiaus vidurkio nustatymas ir <i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų pasiskirstymo tarp lyčių įvertinimas.....	28
3.1.2.	<i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų jautrumo imipenemui ir meropenemui tyrimo rezultatai	29
3.1.3.	<i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų pasiskirstymo tarp skyrių įvertinimas	31
3.1.4.	<i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų pasiskirstymo pagal tiriamąją medžiagą įvertinimas	33
3.1.5.	Invazinių <i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų tyrimo rezultatai	34
3.1.6.	Karbapenemazių genų nustatymas TL-PGR metodu <i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų izoliatuose.....	35
3.2.	<i>Pseudomonas</i> genties bakterijų tyrimo rezultatai	36
3.2.1.	Tiriamųjų amžiaus vidurkio nustatymas ir <i>Pseudomonas</i> genties bakterijų pasiskirstymo tarp lyčių įvertinimas.....	36
3.2.2.	<i>Pseudomonas</i> genties bakterijų jautrumo imipenemui ir meropenemui tyrimo rezultatai	38
3.2.3.	<i>Pseudomonas</i> genties bakterijų pasiskirstymo tarp skyrių įvertinimas	39
3.2.4.	<i>Pseudomonas</i> genties bakterijų pasiskirstymo pagal tiriamąją medžiagą įvertinimas 40	
3.2.5.	Invazinių <i>Pseudomonas</i> genties bakterijų tyrimo rezultatai	41
3.2.6.	Karbapenemazių genų nustatymas TL-PGR metodu <i>Pseudomonas</i> genties bakterijų izoliatuose.....	42
3.3.	<i>Pseudomonas</i> genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze tyrimo rezultatai	43
3.3.1.	Tiriamųjų amžiaus vidurkio nustatymas ir izoliatų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymo tarp lyčių įvertinimas.....	43
3.3.2.	<i>Pseudomonas</i> genties bakterijų su VIM tipo karbapenemaze jautrumo imipenemui ir meropenemui tyrimo rezultatai	43
3.3.3.	<i>Pseudomonas</i> genties bakterijų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymo tarp skyrių įvertinimas	45
3.3.4.	<i>Pseudomonas</i> genties bakterijų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymo pagal tiriamąją medžiagą įvertinimas.....	46
3.3.5.	Karbapenemazių negaminančių ir karbapenemazes gaminančių <i>Pseudomonas</i> genties bakterijų palyginimas	47
	IŠVADOS	48
	SANTRAUKA.....	49
	SUMMARY.....	50
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	51
	PADĖKA	58

SANTRUMPOS

DNR – deoksiribonukleorūgštis

EDTA – etilenodiaminotetraacto rūgštis

ERV – epidemiologinės ribinės vertės

GES – Guiana plataus spektro fermentas

GIM – German imipenemazė

IMI – imipenemą hidrolizuojanti β -laktamazė

IMP – imipenemazė

KPC – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė

MBL – metalo- β -laktamazė

MSK – minimali slopinanti koncentracija

NDM – Naujojo Delio metalo- β -laktamazė

NMC – nemetalo karbapenemazė

NVSPL – Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PSB – peniciliną surišantys baltymai

SIM – Seulo imipenemazė

SME – *Serratia marcescens* fermentas

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

VIM – Verona integrono koduojama metalo- β -laktamazė

ĮVADAS

Problemos aktualumas. Karbapenemams atsparių gram-neigiamų bakterijų paplitimas auga visame pasaulyje ir kelia vis didesnę grėsmę visuomenės sveikatai. Ši problema siejama su *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ir *Acinetobacter* spp. bakterijomis – labiausiai paplitusiais patogenais, atsakingais už daugumą visuomeninių ir hospitalinių infekcijų. Sunkios infekcijos sukeltos šių bakterijų, įskaitant pneumoniją ir sepsį, šlapimo takų, intraabdominalinių ir chirurginių vietų infekcijas, susijusias su dideliu mirtingumu, kuris siekia apie 40 %. Daugelis ligų gydomos β -laktaminiais antibiotikais jau keletą dešimtmečių. Didėjantis karbapenemų naudojimas ligų gydymui, kurias sukėlė *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ir *Acinetobacter* spp. gaminančios plataus spektro β -laktamazės, lėmė karbapenemazes gaminančių patogenų selekciją ir plitimą. Per pastaruosius metus karbapenemazes gaminančios bakterijos išplito beveik visuose pasaulio regionuose. *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė (KPC), OXA-48 fermentai, taip pat kai kurios metalo- β -laktamazės (NDM, VIM, IMP) yra svarbiausios karbapenemazės, plintančios visame pasaulyje. (1)

Karbapenemazių genų nustatymas svarbus tiek epidemiologiniu, tiek ir klinikiniu požiūriu. Epidemiologiniu požiūriu karbapenemazių genų nustatymas svarbus siekiant stebėti protrūkius pavienių ligoninių ar šalies mastu, taip pat plitimo analizei ir epidemiologinės situacijos stebėjimui visame pasaulyje, kad atsparios bakterijos neišplistų ir nesukeltų nekontroliuojamo atsparumo problemų. (2) Klinikiniu požiūriu karbapenemazes gaminančių bakterijų sukeltos infekcijos įvairios, o gydymui dažnai nepakanka vieno aktyvaus vaisto. Šiuo metu vis dažniau taikoma kombinuota terapija su bent dviem aktyviais vaistais, o jei bent vienas iš šių vaistų yra karbapenemas reikšmingai padidėja paciento išgyvenamumo galimybė. (3) Klinikiniu požiūriu karbapenemazių nustatymas svarbus tinkamo gydymo parinkimui, o tai padidina pacientų išgyvenamumo tikimybę.

Karbapenemazes gaminančios bakterijos gali hidrolizuoti beveik visus β -laktaminius antibiotikus, o genai, koduojantys atsparumą, perduodami su plazmidėmis tarp skirtingų bakterijų rūšių. Šie genai randami daugelyje dauginiu atsparumu pasižyminčių izoliatų. Tokių izoliatų aptikimas iš klinikinės medžiagos pirmiausia prasideda nuo kruopščios atrankos pagal sumažėjusį jautrumą karbapenemams. Po to atliekami biocheminiai karbapenemazių gamintojų identifikacijos testai. Galiausiai karbapenemazės geno identifikacijai pasitelkiami molekuliniai metodai. Molekuliniai metodai išlieka auksiniais standartais karbapenemazių genų identifikacijai. Dauguma šių metodų pagrįsti polimerazės grandininės reakcijos metodu, tačiau gali būti atliekama ir sekoskaita, jei reikia itin tiksliai identifikuoti karbapenemazės geną. (4)

Darbo tikslas

Sukurti tikro laiko PGR metodu paremtą tyrimo protokolą karbapenemazes koduojančių genų (*bla_{GM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*) paplitimo VUL Santaros klinikose nustatymui iš Mikrobiologijos laboratorijoje išaugintų ir karbapenemams atsparių *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties klinikinių izoliatų.

Darbo uždaviniai

1. Remiantis literatūros duomenų analize parinkti karbapenemazių genus, koduojančius labiausiai Europoje paplitusias karbapenemazes;
2. Parinkti tikro laiko PGR protokolą ir eksperimento būdu optimizuoti jo sąlygas;
3. Atlikti tiriamų *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties izoliatų tipavimą pagal parinktus karbapenemazių genus;
4. Taikant statistinės analizės metodus išanalizuoti karbapenemazių genų paplitimą VUL Santaros klinikose.

Darbo naujumas. Karbapenemazių genų plitimas stebimas visame pasaulyje, įskaitant Europą ir pačią Lietuvą. Karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų stebėseną Lietuvoje tapo privalomas nuo 2014 metų, tačiau vis dažniau pranešama ir apie karbapenemazes gaminančias *Pseudomonas* genties bakterijas. Tyrimui pasirinkti *bla_{GM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}* karbapenemazių genai, nes šie genai labiausiai paplitę Europoje. Iki šiol Lietuvoje karbapenemazių genų paplitimas analizuotas Vilniaus klinikinėje ligoninėje (5), Lietuvos Sveikatos Mokslų Universiteto ligoninėje (6), tačiau nebuvo analizuotas VUL Santaros klinikose. Darbe analizuotas tyrimui atrinktų *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų pasiskirstymas pagal skyrių ir tiriamąją medžiagą, atsparumas karbapenemams, bei nustatytas karbapenemazių genų paplitimas šiose gentyse VUL Santaros klinikų izoliatuose.

Atliekant magistro baigiamąjį darbą buvo renkami *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties klinikiniai izoliatai, atitinkantys potencialių karbapenemazių gamintojų kriterijus, atliktas bakterijų DNR paruošimas pagal terminės bakterijų ląstelių lizės metodiką bei tipavimas pagal parinktus karbapenemazių genus tikro laiko PGR metodu su *TaqMan* zondais. Gauti duomenys apdoroti statistinės analizės metodais. Nustatytas karbapenemazių genų paplitimas VUL Santaros klinikose.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Karbapenemazės

Karbapenemazės arba kitaip β -laktamazės yra fermentai, kurie hidrolizuoja penicilinus, cefalosporinus, taip pat karbapenemus ir monobaktamus – svarbiausius šiais laikais naudojamus antibakterinius vaistus prieš bakterines infekcijas.

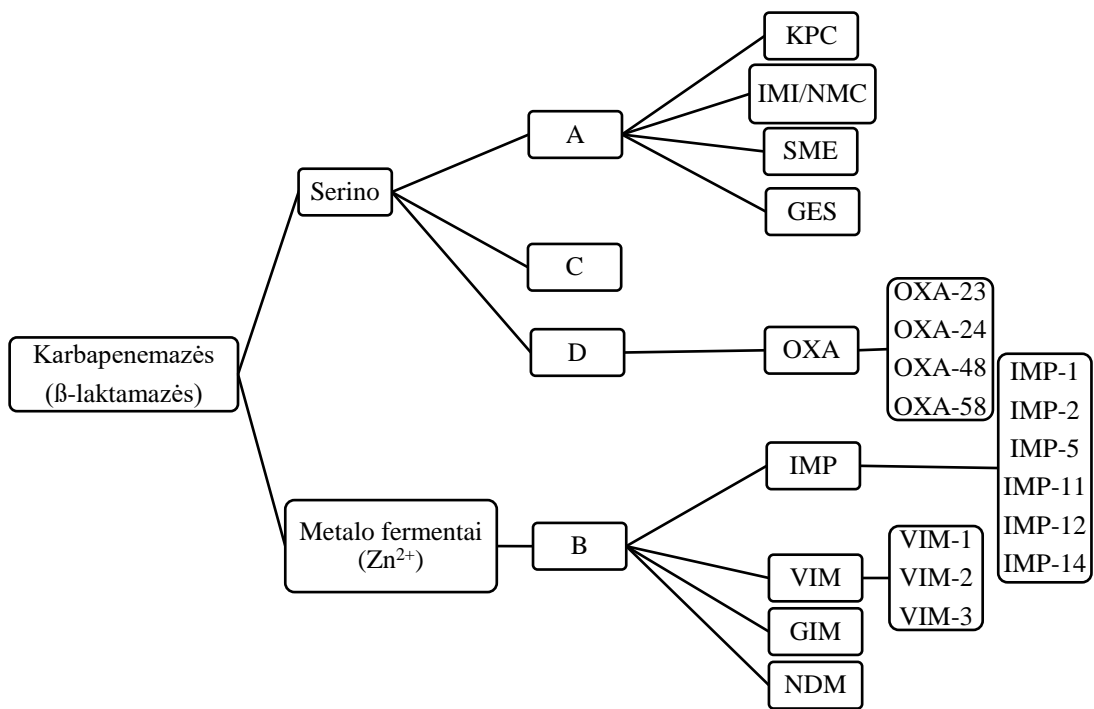
Gram-neigiamų bakterijų, tokių kaip *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ir *Acinetobacter* spp. rūšių, atsparumas karbapenemams per paskutinį dešimtmetį tapo pagrindine visuomenės sveikatos krize visame pasaulyje dėl tokių bakterijų spartaus plitimo ir naujų antibakterinių vaistų trūkumo. Nuo tada, kai buvo aprašyta metalo- β -laktamazė, IMP-1, *Pseudomona aeruginosa* rūšyje (7), serino karbapenemazė, OXA-23, *Actinetobacter baumannii* rūšyje (8) ir serino karbapenemazė, KPC-1, *Klebsiella pneumoniae* rūšyje (9), karbapenemus koduojantys genai išplito visame pasaulyje ir toliau plinta tarp gram-neigiamų, daugeliui vaistų atsparių bakterijų, atsakingų už daugelį hospitalinių infekcijų. Karbapenemazės yra fermentai, inaktyvuojantys beveik visus β -laktaminius antibiotikus, įskaitant ir karbapenemus, o šie fermentai dažniausiai nustatomi *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* ir *P. aeruginosa* bakterijų rūšyse. (10) Nuo 1990 metų laikyta, kad karbapenemazės yra rūšiai specifiškos, tačiau dabar nustatyta, kad jos tarp bakterijų plinta per plazmides. Šiuo metu ypač didelį susirūpinimą kelia gram-neigiamų karbapenemams atsparių bakterijų sklaida, turinčių KPC tipo, VIM tipo, NDM tipo ir OXA tipo karbapenemazes. (11, 12)

1.2. Karbapenemazių klasifikacija

Karbapenemazės klasifikuojamos į dvi grupes pagal aktyvųjį centrą:

1) serino karbapenemazės - priklauso A klasės penicilnazės, D klasės oksacilnazės ir C klasės β -laktamazės, kurios aktyviajame centre turi seriną ir gali būti inaktyvuotos su beta-laktamazių inhibitoriais (klavulanine rūgštimi ar tazobaktamu);

2) metalo- β -laktamazės - priklauso B klasės karbapenemazės. Šio tipo karbapenemazės aktyviajame centre turi vieną arba daugiau cinko atomų ir gali būti inhibuojamos su etilenodiamintetraacto rūgštimi (EDTA). (1 paveikslas)



1 paveikslas. Karbapenemazių klasifikacija

1.2.1. A klasės karbapenemazės

A klasės karbapenemazės apima IMI (imipenemą hidrolizuojanti β-laktamazė)/NMC (nemetalo karbapenemazė), SME (*Serratia marcescens* fermentas), KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė) ir GES (Guiana plataus spektro) fermentus, kurie bakterijai suteikia įvairaus laipsnio atsparumą karbapenemams: nuo sumažėjusio jautrumo iki visiško atsparumo. SME, NMC ir IMI fermentai koduojami chromosomos, o KPC ir GES fermentai koduojami plazmidžių. SME fermentai paprastai aptinkami tik *Serratia marcescens* bakterijų rūšyje, tuo tarpu IMI ir NMC fermentai sporadiškai aptinkami *Enterobacter cloacae* rūšyje. (11) Retas šių trijų fermentų tipų aptikimas pasaulyje, paaiškinamas tuo, kad jie koduojami bakterijų chromosomos. KPC fermentų genai randami perduodamose tarp bakterijų plazmidėse. Šios plazmidės dažniausiai paplitusios *K. pneumoniae* bakterijose, tačiau jų randama ir kitose *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* bakterijų rūšyse. (10) GES fermentų genai rasti perduodamų plazmidžių integronuose *P. aeruginosa* ir *K. pneumoniae* rūšyse. (11) (1 lentelė)

1 lentelė. A klasės karbapenemazės

Karbapenemazė	Koduojama: chromosomos/plazmidės	Bakterijų rūšys, kuriose aptinkama
IMI (imipenemą hidrolizuojanti β-laktamazė)	chromosomos	<i>Enterobacter cloacae</i>
NMC (nemetalo fermento karbapenemazė)	chromosomos	<i>Enterobacter cloacae</i>
SME (<i>Serratia marcescens</i> fermentas)	chromosomos	<i>Serratia marcescens</i>
KPC (<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemazė)	plazmidės	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>
GES (Guiana plataus spektro fermentas)	plazmidės	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

1.2.2. B klasės karbapenemazės

B klasės metalo-β-laktamazės apima IMP (imipenemazė), VIM (Verona integrono koduojama metalo-β-laktamazė), GIM (German imipenemazė), SIM (Seulo imipenemazė) ir NDM (Naujojo Delio metalo-β-laktamazė) fermentus, kurių genai yra perduodamose plazmidėse *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose, taip pat randami ir *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* bakterijų rūšyse. IMP tipo fermentai pirmą kartą aptikti 1991 metais *S. marcescens* klinikinime izoliate iš Japonijos. (13) Dabar IMP fermentai aptinkami visame pasaulyje *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* bakterijose. Tarp VIM tipo fermentų, kurių šiuo metu yra daugiau nei 30 variantų, *bla_{VIM-1}* genas pirmą kartą aptiktas 1997 metais Veronoje, Italijoje *P. aeruginosa* klinikiniam izoliatui. Genas buvo įtrauktas kaip geno kasetė į I klasės integroną kartu su *aacA4* genu, atsakingu už atsparumą aminoglikozidams. (14) Šis genas taip pat buvo aptiktas *E. coli* izoliatui Graikijoje 2001 metų lapkritį kartu su *aacA7*, *dhfrI* ir *aadA* genais, esančiais I klasės integrone. (15) Pirmiausia *E. coli* ir *K. pneumoniae* su *bla_{VIM-1}* genu išplito Graikijoje (16, 17), o dabartinis paplitimas apima visą pasaulį. (12) VIM-2 tipas pirmą kartą aprašytas iš *P. aeruginosa* klinikinio izoliato Prancūzijoje. *Bl_{VIM}* genas taip pat įtrauktas kaip geno kasetė į I klasės integroną. (18) Šiuo metu VIM-2 tipas endeminis visame pasaulyje. (12) NDM fermentai nustatyti visai neseniai. (19) Pirmoji didelių klinikinių izoliatų serija buvo registruota iš Azijos ir Jungtinės Karalystės 2010 metų rugpjūtį. (20) Nuo tada NDM-1 išplito visame pasaulyje (21) ir yra viena iš dažniausių karbapenemazių *Enterobacteriaceae* ir *A. baumannii* bakterijose. (10, 12, 22) (2 lentelė)

2 lentelė. B klasės karbapenemazės

Karbapenemazė	Bakterijų rūšys, kuriose aptinkama
IMP (imipenemazė)	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>
VIM (Verona integrono koduojama metalo-β-laktamazė)	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
GIM (German imipenemazė)	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SIM (Seulo imipenemazė)	<i>Acinetobacter baumannii</i>
NDM (Naujojo Delio metalo-β-laktamazė)	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

1.2.3. C klasės β-laktamazės

C klasės β-laktamazės kelia daug terapinių problemų, nes suteikia atsparumą penicilinui, cefalosporinams (cefoksitinui ir cefotetanui) bei nėra inhibuojamos klinikoje naudojamais β-laktamazių inhibitoriais, tokiais kaip klavulalinė rūgštis. C klasės β-laktamazės koduojamos chromosomos kai kuriose galimai patogeninėse bakterijose: *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Morganella* spp., *Proteus rettgeri*, *P. aeruginosa*, *Serratia* spp. ir *Yersinia enterocolitica*. Plazmidžių koduojamos C klasės β-laktamazės aptinkamos *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella senftenberg*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans*, *S. marcescens* ir *E. cloacae* bakterijų rūšyse. (3 lentelė) Palyginus su chromosomos koduojamais fermentais, plazmidžių koduojamos C klasės β-laktamazės sukelia daugiau terapinių problemų, nes perduodamos kitoms bakterijų rūšims. (23)

3 lentelė. C klasės β-laktamazės

C klasės β-laktamazės koduojamos:	
chromosomos	plazmidės
<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Escherichia coli</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Morganella</i> spp. <i>Proteus rettgeri</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia</i> spp.	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella senftenberg</i> <i>Serratia marcescens</i>

1.2.4. D klasės karbapenemazės

D klasės karbapenemazės, dar žinomos kaip karbapenemus hidrolizuojančios D klasės β-laktamazės, turi labai didelės klinikinės reikšmės, nes aptinkamos daugelyje įvairių žmonių patogenų, tokių kaip *A. baumannii* ir *K. pneumoniae*. (11) Skiriamos dvi pagrindinės filogenetiškai susijusių fermentų grupės: pirmajai grupei priklauso OXA-23, OXA-24/40, OXA-51 ir OXA-58 fermentai, kurie dažniausiai nustatomi *A. baumannii* bakterijoje. Antrajai grupei priklauso su OXA-48 susiję variantai: OXA-54, OXA-162, OXA-163 ir OXA-181. Šio tipo karbapenemazės dažniausiai aptinkamos *K. pneumoniae* bakterijų rūšyje. D klasės karbapenemazių genai randami tiek bakterijų chromosomoje, tiek plazmidėse. (24)

1.3. *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* ir *A. baumannii* (EPA) rūšių genetinė struktūra

EPA rūšys šiandien gerai žinomos kaip sukeliančios hospitalines infekcijas. Šios bakterijos gali lengvai ir greitai plisti tarp žmonių per rankas, daiktus, užkrėstą maistą ar vandenį ir gali keistis genetinė medžiaga per horizontalų genų perkėlimą su plazmidėmis arba transpozonais. (25) Šios karbapenemazės gali būti išskirstytos į koduojamas chromosomas ir koduojamas mobilių genetinių elementų (transpzonų, integronų ir plazmidžių). Serino karbapenemazių fermentai, tokie kaip SME, NMC-A ir IMI, yra mažiau aprašyti EPA rūšyse negu kitos karbapenemazės. Šios karbapenemazės tokiose rūšyse kaip *S. marcescens* ir *Enterobacter cloacae*, koduojami chromosomos ir labai retai siejami su mobiliais genetiniais elementais, todėl ir EPA rūšyse aptinkami retai (11). Išskyrus IMI-2 koduojamą plazmidės *Enterobacter cloacae* bakterijoje. (26) Skirtingai nuo fermentų aptartų anksčiau, KPC ir GES fermentai dažniausiai koduojami perduodamų tarp bakterijų plazmidžių. (11) Pirmasis KPC genas buvo atrastas didelėje plazmidėje, koduojančioje KPC-1 karbapenemazių fermentą. Netrukus po to buvo aprašytas KPC-2 variantas, kuris šiuo metu yra labiausiai paplitęs KPC fermentas gram-neigiamose bakterijose ir nuo KPC-1 skiriasi viena amino rūgštimi. (27) (4 lentelė) Vienas *K. pneumoniae* klonas ST-258, turintis KPC-2 yra paplitęs visame pasaulyje, o tai paaiškina platų *bla_{KPC-2}* geno paplitimą bakterijose. Tačiau neseniai pranešta, kad KPC-2 yra susijęs tik su vienu mobiliu genetiniu elementu – transpzonu Tn4401, kuris pasižymi aukštu transpozicijos dažniu. Tn4401 transpzonas, būdingas *K. pneumoniae*, buvo nustatytas *P. aeruginosa* plazmidėje pCOL-1. Tai įrodo, kad transpzonai perduodami tarp EPA rūšių. (28)

OXA tipo karbapenemazių genai koduojami tiek chromosomos, tiek plazmidžių. Labiausiai aprašytas OXA genas *A. baumannii* bakterijose, *bla_{OXA-23}*, aptinkamas Tn2006 transpozone. Transpzonas Tn2006, esantis perduodamose plazmidėse, dažnai įsiterpia į *A. baumannii* bakterijų chromosomoje esantį *comM* geną.

Metalo karbapenemazių genai pirmiausia aprašyti *P. aeruginosa* bakterijų rūšyje. IMP-1 ir VIM genai aptinkami I klasės integrone. Metalo karbapenemazių genai I klasės integrone yra dažnai susiję su genais, koduojančiais atsparumą aminoglikozidams (*aacA4*, *aadA1*, *aadB*). I klasės integronas priklauso mobiliems integronų elementams, kurie skirstomi į penkias grupes ir visada yra plazmidėje. I klasės integronai atlieka svarbų vaidmenį vykstant IMP ir VIM genų sklaidai enterobakterijose.

4 lentelė. EPA rūšys su joms būdingomis karbapenemazėmis

EPA grupės bakterija	Būdinga karbapenemazė
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GES, GIM, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM
<i>Acinetobacter baumannii</i>	GIM, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM,
<i>Enterobacteriaceae</i>	GES, GIM, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM

1.4. Antibakteriniai vaistai – karbapenemai

Karbapenemai atlieka labai svarbų vaidmenį tarp antibakterinių vaistų. Iš šimtų skirtingų β -laktamų, karbapenemai pasižymi plačiausiu aktyvumo spektru prieš gram-teigiamas ir gram-neigiamas bakterijas. Todėl jie dažnai naudojami kaip „paskutinės eilės agentai“ arba kaip „paskutinio pasirinkimo antibiotikai“ pacientams, kurių infekcijos ypač sunkios ir susijusios su atspariomis bakterijomis. (29)

Karbapenemai pasižymi platesniu antibakteriniu veikimu nei kiti antibakteriniai vaistai, tokie kaip penicilinai, cefalosporinai ar β -laktamai. Stipriausiais karbapenemais prieš gram-teigiamas bakterijas laikomi imipenemas, panipenemas ir doripenemas. Meropenemas, biapenemas, ertapenemas ir doripenemas efektyviausiai veikia prieš gram-neigiamas bakterijas. Svarbiausi karbapenemų aspektai yra: 1) ertapenemas pasižymi ribotu veikimo spektru, nes nėra toks aktyvus kaip imipenemas ar meropenemas prieš *P. aeruginosa*; 2) meropenemas veikia silpniau prieš *A. baumannii* nei imipenemas ar doripenemas; 3) doripenemo MSK reikšmės yra mažesnės lyginant su imipenemu ir meropenemu prieš *P. aeruginosa* ir *A. baumannii*. Be to, doripenemas yra mažiausiai jautrus hidrolizei, kurią vykdo karbapenemazės. Doripenemo hidrolizė vyksta nuo 2 iki 150 kartų lėčiau nei imipenemo; 4) meropenemas turi unikalų pritaikymą. Meropenemas kartu su klavulanine rūgštimi efektyviai naikina *Mycobacterium tuberculosis* bakteriją, kuri paprastai yra atspari β -laktamams dėl chromosomos koduojamos β -laktamazės. Šis gebėjimas nuslopinti arba visiškai sunaikinti *M. tuberculosis* yra nauja karbapenemų savybė, o moksliniai tyrimai šioje srityje sparčiai auga. (30)

Deja, neseniai atsiradęs dauginis patogenų atsparumas šių antibiotikų veikimui kelia didelę grėsmę visame pasaulyje.

1.4.1. Karbapenemų veikimo mechanizmas

Karbapenemai, kaip ir kiti β -laktamai, sunkiai difunduoja per bakterijų ląstelių sienelę. (31) Apskritai per gram-neigiamų bakterijų sienelę karbapenemai pereina per išorinius membranos baltymus - porinus. Perėję į periplazminę ertmę, karbapenemai prie peniciliną surišančių baltymų (PSB) iškart prijungia acilo grupę. PSB yra fermentai (pvz. transglikolazės, transpeptidazės ar karboksipeptidazės) katalizuojantys peptidoglikano susiformavimą bakterijų sienelėje. (32) Karbapenemai veikia kaip PSB fermentų peptidazės domenų inhibitoriai ir gali slopinti peptidų jungimąsi vienas su kitu, taip pat ir kitas peptidazių reakcijas, ko pasekoje stabdoma bakterijų sienelių sintezė. Pagrindinis veiksnys, suteikiantis karbapenemams tokį didelį veiksmingumą yra galimybė surišti skirtingus PSB. (33) Ląstelės sienelės formavimasis yra dinamiškas erdvinis procesas, formavimasis ir autolizė vyksta tuo pačiu metu. Nors PSB ir užslopinti, autolizė vyksta toliau. Galiausiai peptidoglikanas silpnėja ir ląstelė plyšta dėl osmosinio slėgio skirtumų. (34)

1.4.2. Atsparumo karbapenemams mechanizmai

Dauguma gram-neigiamų biochemiškai neaktyvių lazdelių (pvz. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas* spp.), taip pat *Enterobacteriaceae* (pvz. *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp.) ir gram-teigiamų bakterijų (pvz. *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Nocardia* spp.) šiuo metu jau yra arba tampa atsparios beveik visiems kliniškai prieinamiems karbapenemams. Toks atsparumo didėjimas kelia didelę grėsmę visuomenės sveikatai visame pasaulyje.

Atsparumo karbapenemams mechanizmai apima β -laktamazių gamybą, išmetimo pompas ir mutacijas, kurios pakeičia porinų arba PSB raišką bei funkciją. Šių mechanizmų derinys yra didelio atsparumo karbapenemams priežastis tam tikrose bakterijų rūšyse: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Acinetobacter baumannii*. (29)

Gram-teigiamų kokių ir gram-neigiamų lazdelių atsparumas karbapenemams yra nulemtas skirtingų mechanizmų. Gram-teigiamuose kokuose atsparumas karbapenemams dažniausiai pasireiškia dėl pakaitos PSB amino rūgščių sekoje arba naujo, karbapenemams atsparaus, PSB gamybos. (35, 36) Gram-neigiamose lazdelėse atsparumas karbapenemams pasireiškia dėl β -laktamazių raiškos, išmetimo pompų, porinų praradimo ir PSB pokyčių. (37, 38)

Karbapenemazės (β -laktamazės) yra pagrindis atsparumo antibiotikams mechanizmas, veikiantis bakterijose. Šie periplazminiai fermentai hidrolizuoja β -laktaminius antibiotikus ir taip užkerta kelią vaistui pasiekti taikinį PSB. B klasės β -laktamazės β -laktamų inaktyvacijai naudoja cinką, o A, C ir D klasės β -laktamazės naudoja seriną kaip nukleofilą β -laktaminiam ryšiui hidrolizuoti. (29)

1.5. Karbapenemazių ir karbapenemams atsparių bakterijų paplitimas pasaulyje

Per pastaruosius 10 metų fiksuojamas vis didėjantis karbapenemazių paplitimas. *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė pirmiausia aptikta Jungtinėse Amerikos Valstijose, o vėliau visame pasaulyje. Graikijoje ir Jungtinėse Amerikos Valstijose šio tipo karbapenemazė laikoma endemiška. Apie metalo fermentus (VIM ir IMP) taip pat pranešama visame pasaulyje, tačiau pietų Europoje ir Azijoje jų paplitimas didesnis. Karbapenemazės OXA-48 tipas daugiausia nustatomas Viduržemio jūros regione, Europos valstybėse ir Indijoje. Naujausia identifikuota Naujojo Delio metalo- β -laktamazė iš pradžių užfiksuota Jungtinėje Karalystėje, vėliau Indijoje, Pakistane, o dabartinis paplitimas apima visą pasaulį. (39)

Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras 2012 metais pradėjo „Europos karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* projektą“ (ang. EuSCAPE), kurio tikslas gilinti žinias apie karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* ir kitų bakterijų epidemiologiją. Šio tyrimo duomenimis 2013 metais *A. baumannii* bakterijų, gaminančių karbapenemazes aptinkama beveik visose Europos valstybėse. Iš 38 tyrime dalyvavusių šalių vienintelėje Montenegro valstybėje nenustatytas nei vienas karbapenemams atsparaus *A. baumannii* atvejis. Devyniose valstybėse nustatyti sporadiniai atvejai (Albanija, Austrija, Bosnija ir Hercegovina, Suomija, Liuksemburgas, Malta, Nyderlandai, Norvegija ir buvusi Makedonijos Jugoslavijos respublika). Pavieniai protrūčiai ligoninėse užfiksuoti keturiose valstybėse (Estija, Airija, Slovėnija, Švedija), o sporadiniai protrūčiai ligoninėse nustatyti šešiose valstybėse (Bulgarija, Danija, Lenkija, Rumunija, Serbija ir Turkija). Vienolikoje valstybių stebėtas regioninis arba tarpregioninis paplitimas (Belgija, Kipras, Čekijos respublika, Prancūzija, Vokietija, Vengrija, Kosovas, Portugalija, Slovakija, Ispanija ir Jungtinė Karalystė). Apie endeminę situaciją pranešė šešios valstybės (Kroatija, Graikija, Izraelis, Italija, Latvija, Lietuva). To paties tyrimo duomenimis trys Europos valstybės 2015 metais nenustatė nei vienos karbapenemazes gaminančios enterobakterijos (Bosnija ir Hercegovina, Islandija, Kosovas). Trylikoje valstybių užfiksuotas regioninis arba tarpregioninis paplitimas (Belgija, Kroatija, Danija, Prancūzija, Vokietija, Vengrija, Airija, Izraelis, Lenkija, Rumunija, Slovakija, Ispanija, Jungtinė Karalystė). Keturios valstybės pranešė apie endeminę situaciją (Graikija, Italija, Malta, Turkija). Devyniose Europos valstybėse aptikti tik sporadiniai atvejai: penkiose valstybėse nustatytas protrūkis vienoje ligoninėje (Bulgarija, Suomija, Nyderlandai, Slovėnija, Švedija), o keturiose valstybėse pavieniai protrūčiai skirtingose ligoninėse (Austrija, Čekijos respublika, Portugalija, Serbija). (40)

1.6. Karbapenemazių ir karbapenemams atsparių bakterijų paplitimas Lietuvoje

Karbapenemams atsparių *A. baumannii* padermių procentas Lietuvos trečio lygio medicinos centruose smarkiai padidėjo 2010 – 2011 metų laikotarpiu. Paplitimo dažnis

karbapenemams atsparių bakterijų šalies ligoninėse padidėjo nuo 4 % 2008 – 2009 metais iki 43 % užfiksuotų 2011 metais. (41) Baltijos šalyse 2013 metais atlikto tyrimo metu *Enterobacteriaceae* šeimai priklausančiose *K. pneumoniae* bakterijose, atspariose karbapenemams, genų, lemiančių atsparumą neaptikta. Šiose bakterijose atsparumas karbapenemams siejamas su kitais mechanizmais, tokiais kaip CTX-M fermento gamyba, porino netekimas arba pokyčiai bakterijų išmetimo pompose. (42) Europos ligų prevencijos ir kontrolės skyrius 2012 metais pradėjo „Europos karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* tyrimą“. Šio projekto tikslas pagerinti žinias apie karbapenemams atsparių bakterijų paplitimą ir epidemiologiją, plėsti supratimą apie karbapenemams atsparių bakterijų plitimo mastus bei didinti laboratorijų gebėjimą diagnozuoti ir sekti karbapenemams atsparias bakterijas Europoje. Invazines infekcijas sukeliančių karbapenemams atsparių bakterijų, išskirtų iš kraujo ir smegenų skysčio, plitimo sekimas Lietuvoje tapo privalomas nuo 2014 metų. Laikotarpiu nuo 2014 metų sausio 1 dienos iki gruodžio 31 dienos pranešta apie Lietuvoje nustatytų 13 invazinių karbapenemams atsparių bakterijų atvejų:

- 2 atvejai OXA-48 gaminančios *K. pneumoniae*;
- 9 atvejai NDM gaminančios *E. cloacae*;
- 1 atvejis NDM gaminančios *E. aerogenes*;
- 1 atvejis VIM gaminančios *E. cloacae*.

Remiantis šiais duomenimis Lietuva priskirta pirmai epidemiologinei stadijai – sporadiniai atvejai. (40)

Lietuvoje Nacionalinėje visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje (NVSPL) vykdoma infekcinių ligų sukėlėjų laboratorinė stebėseną. Remiantis NVSPL duomenimis karbapenemams atsparių bakterijų proporcija Lietuvoje didėja. NVSPL 2014 metų duomenimis, gautais iš 13 mikrobiologijos laboratorijų visoje Lietuvoje, buvo tirtos 39 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų kultūros, iš kurių 31,7 % nustatytas atsparumas karbapenemams. Vienuolikos tirtų *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų kultūrų atsparumas karbapenemams siekė 100 %. Iš tirtų 64 *Acinetobacter baumannii* bakterijų kultūrų, atsparumas karbapenemams siekė 98,4 %. Invazinių antibiotikams atsparių bakterijų ataskaitos duomenimis 2014 metais buvo tirtos 64 *Acinetobacter baumannii* bakterijų kultūros, iš kurių 1,6 % nustatytas vidutinis jautrumas karbapenemams, o 68,7 % - visiškasis atsparumas. Iš tirtų 721 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų kultūrų, visiškasis atsparumas karbapenemams nustatytas 0,27 % bakterijų. Ištyrus 30 *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų kultūrų, visiškasis atsparumas karbapenemams siekė 30 %. NVSPL 2015 metų dauginiu atsparumu pasižyminčių bakterijų stebėsenos ataskaitos duomenimis, gautais iš 16 mikrobiologijos laboratorijų visoje Lietuvoje, karbapenemams atsparių bakterijų daugėja lyginant su 2014 metais. NVSPL 2015 metais buvo tirta 81 *Acinetobacter baumannii* bakterijų kultūra, o

atsparumas karbapenemams siekė 98,76 %. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų atsparumas karbapenemams nustatytas 39,58 % (tirtos 48 bakterijų kultūros). Iš tirtų 18 *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų kultūrų, atsparumas nustatytas 88,89 %. Invazinių antibiotikams atsparių bakterijų ataskaitos duomenimis 2015 metais buvo tirta 100 *Acinetobacter baumannii* bakterijų kultūrų, iš kurių vidutinis jautrumas karbapenemams nustatytas 1 %, o visiškai atsparumas – 82 % bakterijų kultūrų. Taip pat buvo tirtos 854 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų kultūros, vidutinis jautrumas karbapenemams siekė 0,12 %, o visiškai atsparių bakterijų nenustatyta. Iš tirtų 56 *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų kultūrų, vidutinis jautrumas karbapenemams siekė 1,79 %, o visiškai atsparumas nustatytas 28,57 % bakterijų kultūrų. (5, 6 lentelės) (43)

5 lentelė. Bakterijų atsparumas karbapenemams Lietuvoje

Bakterijų rūšis	Atsparumas (%)	
	2014 metai	2015 metai
<i>Acinetobacter baumannii</i>	98,4	98,76
<i>Enterobacteriaceae</i>	31,7	39,58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	88,89

6 lentelė. Invazinių bakterijų (iš kraujo ir smegenų skysčio) atsparumas karbapenemams Lietuvoje

Bakterijų rūšis	Atsparumas (%)			
	2014 metai		2015 metai	
	Vidutiniškai jautrios	Atsparios	Vidutiniškai jautrios	Atsparios
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1,6	68,7	1	82
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	0,27	0,12	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	30	1,79	28,57

1.7. Fenotipiniai karbapenemazių nustatymo metodai

1.7.1. Karbapenemazes gaminančių bakterijų atranka

Karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* bakterijų atranka vykdoma pagal Europos jautrumo antibiotikams tyrimų komiteto (angl. EUCAST) nustatytus kriterijus, atliekant minimalios slopinančios koncentracijos (MSK) ir diskų difuzijos testus. Karbapenemazes gaminančių bakterijų karbapenemų MSK vertės gali svyruoti žemiau kliniškai reikšmingų verčių, todėl karbapenemazes gaminančių bakterijų aptikimui naudojamos EUCAST apibrėžtos epidemiologinės ribinės vertės (ERV) (angl. ECOFF). Pagal ERV atskiriami laukinio tipo mikroorganizmai (be atsparumo antibakteriniams vaistams) nuo ne laukinio tipo mikroorganizmų (turi įgytą atsparumą antibakteriniams vaistams). Karbapenemazes gaminančių bakterijų aptikimas pagal jautrumą meropenemui pasižymi geriausiu jautrumu ir specifiskumu.

Ertapenemas pasižymi puikiu jautrumu, bet prastu specifiškumu. Atskyrimas tarp laukinio tipo ir karbapenemazes gaminačių bakterijų vertinant imipenemo ERV yra gana prastas, todėl tyrimo rezultatai, gauti tik su imipenemu atrankai naudoti nerekomenduojami. (44) (7 lentelė)

7 lentelė. Karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* bakterijų klinikiniai kriterijai ir atrankos epidemiologinės ribinės vertės (pagal EUCAST metodologiją)

Karbapenemai	MSK (mg/L)		Diskų difuzijos zonos skersmuo (mm) su 10 µg diskais	
	J/M kriterijus	ERV atrankos kriterijus	J/M kriterijus	ERV atrankos kriterijus
Meropenemas	≤ 2	> 0,12	≥ 22	< 25
Imipenemas	≤ 2	> 1	≥ 22	< 23
Ertapenemas	≤ 0,5	> 0,12	≥ 25	< 25

Paaškinimai: J – jautru, M – mažai jautru

Atrinkus potencialias karbapenemazes gaminančias bakterijas, atliekami patvirtinimo tyrimai: sumažėjusio jautrumo karbapenemams rutininiai testai, fenotipiniai metodai karbapenemazių aptikimui. Tam naudojami diskų difuzijos testai. Diskų sudėtyje yra meropenemo ir įvairių inhibitorių, tokių kaip boroninė rūgštis, kuri inhibuoja A klasės karbapenemazes, dipikolinė rūgštis inhibuojanti B klasės karbapenemazes. Šiuo metu nėra inhibitoriaus slopinančio D klasės karbapenemazes. Kloksacilinas, kuris slopina AmpC β-laktamazes, dedamas į testus tam, kad būtų galima diferencijuoti tarp padidintos AmpC gamybos su porino netekimu ir karbapenemazių gamybos. Pagrindinis šių metodų trūkumas siejamas su atlikimo trukme, kuri trunka iki 18 valandų.

Karbapenemų hidrolizės analizę galima atlikti ir kitais metodais, tokiais kaip MALDI-TOF masių spektrometrija ar Carba NP testu. Taikant šiuos metodus karbapenemazių gamybą galima patvirtinti per keletą valandų, tačiau nėra pakankamai informacijos apie metodų jautrumą bei specifiškumą. (45)

1.8. Molekuliniai genetiniai karbapenemazių nustatymo metodai

Karbapenemazių gamyba bakterijose taip pat patvirtinama molekuliniiais genetiniais metodais. Molekuliniai metodai laikomi standartiniais tiksliai karbapenemazių genų identifikacijai. Dauguma šių metodų pagrįsti polimerazės grandininės reakcijos (PGR) technologija, taip pat gali būti sekvenuojamas visas koduojantis regionas, jei reikia identifikuoti β-laktamazės geną.

Mokslinėse laboratorijose ir centruose karbapenemazių genai dažniausiai identifikuojami hibridizacijos metodais. Hibridizacijos metodų ir *Southern blotting* metodo kombinacija naudojama nustatyti ar karbapenemazę koduojantis genas yra chromosomoje ar plazmidėje. (45)

Šiuo metu daugelis klinikinių laboratorijų, siekdamos išspręsti problemas susijusias su fenotipiniais metodais ir sumažinti nustatymo laiką, naudoja PGR pagrįstus metodus. Taikant PGR metodą su grynomis kolonijomis, rezultatus galima gauti per 4 – 6 valandas, o pats metodas pasižymi puikiu jautrumu ir specifiškumu. PGR pagrįsti metodai apima paprastą arba dauginę PGR, o tikro laiko PGR dar labiau sutrumpina nustatymo laiką. Neseniai pradėtas taikyti ir mikrogardelių metodas, kuriuo galima greit ir patikimai aptikti daugialypį atsparumą antibakteriniams vaistams lemiančius veiksnius. (46, 47)

Pagrindiniai molekulinii metodų trūkumai yra jų kaina ir kvalifikuotų specialistų poreikis. Papildoma problema siejama su tuo, kad atsparumo genų sritis yra iš anksto numatyta, todėl šiais metodais negalima aptikti naujų karbapenemazių genų tipų.

1.8.1. PGR metodai

Jei įtariama, kad bakterija gamina karbapenemazę, greičiausias būdas nustatyti, kuriai β -laktamazių šeimai priklauso ši karbapenemazė yra atlikti PGR. Atlikta daugybė tyrimų, kuriuose PGR naudojama aptikti karbapenemazės tipą. Queenan ir Bush savo publikacijoje paskelbė pradmenis, kuriuos galima naudoti atliekant PGR be modifikacijų ir nustatyti šiuo metu žinomas karbapenemazių šeimas ir subgrupes. (48)

Sparčiai didėjantis karbapenemazes gaminančių bakterijų dažnis įrodo būtinybę turėti įrankius protrūkių kontrolei ir plitimo sekimui kiekvienos šeimos karbapenemazių genų tipui. Ellington su kolegomis 2007 metais išvystė dauginės PGR metodą, kuriuo galima aptikti ir diferencijuoti penkias skirtingas metalo- β -laktamazių (MBL) genų šeimas (VIM, IMP, SPM, GIM ir SIM) vienos reakcijos metu. Metodas veikė puikiai, buvo aptikti ir atskirti visi referentiniai kamieniai, taip pat rasti IMP ir VIM aleliai visose tirtose padermėse. (49) Vėliau publikuota daugiau šio metodo patobulinimų, kuriais galima identifikuoti vis daugiau karbapenemazių genų, tokių kaip KPC, NDM, OXA-48. Dallenne ir kitų 2011 metais išleistas dar vienas metodo patobulinimas, kuriuo siekta aptikti daugumą genų, koduojančių kliniškai svarbias β -laktamazes, lemiančias atsparumą trečios kartos cefalosporinams ir karbapenemams. (50) Voets ir kitų patobulinime išvystytos septynios dauginės PGR reakcijos plazmidžių koduojamų AmpC β -laktamazių (ACC, ACT, DHA, CMY, FOX, LAT, MIR, MOX), metalo karbapenemazių (GIM, NDM, SIM, SPM), serino karbapenemazių (IMI, SME, NMC-A) ir OXA β -laktamazių (OXA-23, -24, -48, -1, -2, -51, -4, -58) aptikimui. Šios publikacijos autoriai naudojo keturias dauginės PGR reakcijas iš Dallenne ir kitų tyrimo, genų koduojančių CTX-M, SHV, GES, VEB, PER, KPC, VIM, IMP β -laktamazių aptikimui. Visos dauginės PGR reakcijos buvo apjungtos į vieną amplifikacijos protokolą. (51)

Endimiani ir kiti, 2011 metais pristatė PGR pagrįstą metodą *bla_{KPC}* geno *Enterobacteriaceae* bakterijų šeimoje aptikimui ir identifikacijai. (48) Šios technikos metu naudojama PGR kartu su elektropurkštuvinės jonizacijos – masių spektrometrijos technologija. Ši technika yra perspektyvi genotipavimo sistema su aukštu dauginiu pajėgumu ir gali aptikti vienos bakterijų padermės skirtingus genus. Sistema taip pat gali aptikti vieno nukleotido polimorfizmus, įskaitant mutacijas dėl kurių pakinta amino rūgštis.

1.8.2. Tikro laiko PGR metodai

Keletas dauginių TL-PGR protokolų, dar labiau sumažinančių karbapenemazių genų aptikimo laiką, buvo išvystyti mokslinių tyrimų grupių tuo pačiu metu. Tikro laiko PGR metodu vertinant lydimosi kreives galima tiksliai atskirti skirtingus karbapenemazių genų variantus. Mendes ir kiti, (53) 2007 metais aprašė pirmąjį dauginį tikro laiko PGR protokolą genų, koduojančių MBL fermentus, nustatymui (IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, GIM-1). MBL identifikacija buvo paremta būdingu amplikono lydimosi piku. Tyrime, publikuotame po keletos mėnesių, tikro laiko PGR metodu specifiškai identifikuoti *bla_{VIM}* ir *bla_{IMP}* genai gram-neigiamose bakterijose. Visos procedūros laikas truko mažiau nei 1 valandą. (54) Tyrimo autoriai parodė, kad tikro laiko PGR produktų lydimosi kreivių analizė genus išskirstė į keturias grupes: 1) *bla_{VIM-1}*; 2) *bla_{VIM-2}*; 3) *bla_{IMP-1}*; 4) *bla_{IMP-2}*.

Chen ir kiti, 2011 metais išvystė dauginę tikro laiko PGR gebančią identifikuoti *bla_{KPC}* geno variantus. Ši dauginė tikro laiko PGR technika nuo kitų PGR pagrįstų technikų skiriasi tuo, kad naudojami molekuliniai švyturio zondai, kurių pagalba galima aptikti vieno nukleotido polimorfizmus. Taip pat šia technika galima atskirti skirtingus *bla_{KPC}* variantus, reikšmingus epidemiologiniu ir evoliuciniu požiūriu. Vėliau Chen ir kiti, (55) naudodami molekulinis švyturio zondus, išvystė dauginę tikro laiko PGR, kuria galima identifikuoti epideminį *K. pneumoniae* ST258 kloną ir *bla_{KPC}* karbapenemazės geną vienos reakcijos metu. Ši technika pasižymėjo puikiu jautrumu (100%) ir specifiškumu (100%).

Monteiro ir kiti, (56) išstobulino vieną dauginės tikro laiko PGR protokolą, kuriuo galima identifikuoti labiausiai paplitusius serino karbapenemazių (KPC, GES, OXA-48) ir metalo karbapenemazių (IMP, VIM, NDM) tipus eneterobakterijų izoliatuose, panaudojant didelės skiriamosios gebos lydimosi kreives. Visa procedūra, įskaitant DNR išskyrimą, mėginių paruošimą, dauginės PGR reakciją ir rezultatų analizę, truko 3 valandas.

Visi aukščiau aptarti tikro laiko PGR protokolai pasižymėjo 100 % jautrumu ir specifiškumu. Šie rezultatai rodo, kad tikro laiko PGR yra patikimas ir greitas metodas labiausiai paplitusių karbapenemazių genų aptikimui. Dėl šios priežasties molekuliniai metodai turėtų būti

naudojami karbapenemazių genų aptikimui, kad būtų galima kontroliuoti jų epidemiologinį plitimą.

1.9. Karbapenemazių nustatymo svarba

Karbapenemazių nustatymas svarbus tiek epidemiologiniu infekcijų kontrolės, tiek ir klinikiniu požiūriu. Karbapenemazės suteikia gram-neigiamoms bakterijoms atsparumą ne tik karbapenemams, bet ir kitiems β -laktaminiams antibiotikams. Šios atsparios bakterijos ne visada sukelia specifines kliniškes infekcijas, dauguma pacientų, kolonizuoti karbapenemazes gaminančiomis bakterijomis lieka asimptominiai. Tokie pacientai yra potencialus hospitalinių ir visuomeninių infekcijų šaltinis, nes karbapenemams atsparios bakterijos, esančios žarnyne, gali perduoti atsparumą kitoms žarnyno bakterijoms arba sąlygoti infekcijų plitimą per neplautas rankas ar sąlytį su nešvariais paviršiais, užterštais fekalijomis (stalai, kėdės, durų rankenos). Šiuo atveju karbapenemazių nustatymas yra svarbus tam, kad karbapenemazes gaminančios bakterijos neišplistų neaptiktos ir nesukeltų nekontroliuojamo atsparumo problemų. (2) Karbapenemazių nustatymas turi svarbos ir klinikiniu požiūriu. Nenustačius karbapenemazių, pacientai gali gauti netinkamą gydymą. Karbapenemazes gaminančių bakterijų sukeltos infekcijos įvairios, o gydymui dažnai nepakanka vieno aktyvaus vaisto. Šiuo metu vis dažniau taikoma kombinuota terapija su bent dviem aktyviais vaistais, o jei bent vienas iš šių vaistų yra karbapenemas reikšmingai padidėja paciento išgyvenamumo galimybė. (3) Klinikiniu požiūriu karbapenemazių nustatymas svarbus tinkamo gydymo parinkimui, o tai padidina pacientų išgyvenamumo tikimybę.

2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

Tyrimas atliktas 2016 - 2017 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje.

2.1. Mėginių rinkimas

Enterobacteriaceae šeimos ir *Pseudomonas* genties bakterijos, fenotipiškai atsparios karbapenemams, atrinktos VUL Santaros klinikų LMC Mikrobiologijos laboratorijoje. Tyrimui buvo atrinkti 120 *Enterobacteriaceae* šeimos ir 143 *Pseudomonas* genties izoliatai.

2.2. Mikroorganizmų kultūros šviežinimas

Mikroorganizmų šaldymui tinka tik šviežia, gryna mikroorganizmų kultūra, todėl prieš šaldymą kultūra buvo šviežinama. Su sterilia bakteriologine kilpele buvo paimama truputis kultūros ir užsėjama (inokuliuojama) ant kraujo agarų be priedų. Kraujo agaras su inokuliatu buvo

inkubuojamas termostate (Memmer, Vokietija) $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 12 valandų. Po inkubacijos šviežia kultūra iškart buvo šaldoma -80°C temperatūroje.

2.3. Mikroorganizmų kultūros šaldymas

Mikroorganizmai buvo šaldomi VIABANK (Medical Wire & Equipment, Jungtinė Karalystė) šaldymo buteliuke. Šaldymo buteliuke yra mažiausiai 20 keramikinių rutuliukų, padengtų kriogeniniu konservavimo tirpalu.

Šaldymo eiga: pirmiausia ant buteliuko užrašomas šaldomo mikroorganizmo kodas. Naudojant sterilų vatos pagaliuką buvo paimama šviežia, gryna mikroorganizmo kultūra. Atkemšamas šaldymo buteliukas. Sterilus vatos pagaliukas su kultūra buvo įnešamas į buteliuko vidų, o kultūra paskirstoma tarp rutuliukų švelniai buteliuką suvartant. Po suvartymo sterilia pipete buvo nusiurbiamas perteklinis konservavimo tirpalo kiekis. Buteliukas užkimštas ir perkeltas laikymui į šaldiklį -80°C .

Šaldyti ne visi gauti mėginiai. Duomenys apie mėginius atrinkti iš Laboratorinių tyrimų informacinės sistemos, dublikatai atmesti ir į imtį nepateko. Apie mėginius surinkta papildoma informacija:

1. Fenotipiniais metodais nustatytas bakterijų rūšis;
2. Laboratorijos registracijos numeris bei paciento ligos istorijos numeris (ši informacija reikalinga pasikartojančių mėginių atmetimui);
3. Paciento, iš kurio paimtas mėginys, lytis ir amžius;
4. Tiriamoji medžiaga – iš kokio biologinio skysčio ar audinio paimtas mėginio pasėlis;
5. Ėminio priėmimo data laboratorijoje;
6. VUL Santaros klinikų skyrius ar kitos įstaigos diagnostinis padalinys, kuriame paimtas mėginys.

2.4. Tiriamosios medžiagos paruošimas

2.4.1. Šaldytų mėginių šviežinimas

Tolesniam molekuliui tyrimui buvo paruošiama bakterijų DNR. Bakterijų DNR paruošimui reikalinga šviežia bakterijų kultūra, todėl užšaldytos bakterijų kultūros buvo šviežinamos. VIABANK šaldymo buteliukas buvo atšildomas kambario temperatūroje. Iš VIABANK buteliuko su bakteriologine kilpele buvo paimamas vienas keramikinis rutuliukas ir išvedžiojamas po McConkey agaro lėkštelę. Lėkštelės inkubuotos termostate 12 valandų $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po inkubacijos paruošta bakterijų DNR.

2.4.2. Bakterijų DNR paruošimas

Bakterijų DNR paruošimui buvo naudojama terminės bakterijų ląstelių lizės metodika. Veikiant bakterijų suspensiją aukšta temperatūra suyra bakterijų ląstelių sienelė ir plazminė membrana, o laisva DNR lieka supernatante. Pagal šią metodiką 200 µl distiliuoto vandens yra 10^9 bakterijų ląstelių. Į sterilius 1,5 ml *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius su pipete įpilta 200 µl distiliuoto vandens. Su bakteriologine kilpele paimta viena bakterijų kultūros kolonija nuo McConkey agaro ir suspenduota prieš tai paruoštame *Eppendorf* tipo mėgintuvėlyje. Suspensija buvo kaitinama elektrinėje vandens vonelėje TS-100 (Biosan, Latvija) 99°C temperatūroje 10 min. Po kaitinimo suspensijos buvo centrifuguojamos 5415R centrifuga (*Eppendorf AG*, Vokietija) 1000 apsisukimų per minutę greičiu 5 minutes (pagal Ali A Dashti ir kiti, 2009). Pagaminti bakterijų lizatai perkelti laikymui į šaldiklį -20°C temperatūroje.

2.5. Tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

TL-PGR – tai molekulinės biologijos metodas, naudojamas vienu metu pagausinti norimą DNR fragmentą ir kiekybiškai įvertinti produkto kiekį. Šis metodas leidžia realiu laiku įvertinti, ar gausinama seka, ir nustatyti jos kopijų skaičių mėginyje. Metodo esmė – vykdoma DNR fragmento amplifikacija, kurios metu naudojamos fluorescuojančios žymės ir po kiekvieno TL-PGR ciklo pagal fluorescencijos intensyvumą nustatomas susidariusio produkto kiekis. Fluorescencijos intensyvumui nustatyti naudojami fluorescencinėmis žymėmis žymėti oligonukleotidiniai zondai (*TaqMan*). Tyrimui naudojama automatizuota sistema, dėl kurios amplifikacijos reakcija ir pagausinto produkto kiekio nustatymas vyksta vienu metu. (57)

2.5.1. TL-PGR naudojamos medžiagos ir įranga

- Laminaras (AirClean Systems, JAV);
- Mėgintuvėlių centrifuga FV-2400 (Biosan, Latvija);
- Vienkartinės pirštinės;
- Termocikleris su fluorescencine detekcija Rotor – Gene – RG – 3000 (Corbett research, Australija);
- Sterilūs 1,5 ml *Eppendorf* tipo mėgintuvėliai;
- Sterilūs 0,1 ml mėgintuvėliai (Qiagen, Vokietija);
- Automatinės pipetės su vienkartiniais antgaliais (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl);
- TL-PGR komponentai:
 - o Dejonizuotas vanduo;
 - o Išskirta bakterijų DNR;
 - o SensiMix II Probe (2X) (Bioline, Jungtinė Karalystė);

- Dauginės TL-PGR pradmenų ir zondų mišiniai.

Tikro laiko polimerazės grandininėi reakcijai parinkti pradmenys ir zondai aptinkantys *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* ir *bla_{VIM}* genus, koduojančius tam tikras karbapenemazes:

- *bla_{GIM}* – koduoja German imipenemazę;
- *bla_{IMP}* – koduoja imipenemazę;
- *bla_{KPC}* – koduoja *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazę;
- *bla_{NDM}* – koduoja Naujojo Delio metalo-β-laktamazę;
- *bla_{OXA-48}* – koduoja karbapenemus hidrolizuojančią oksacilinazę;
- *bla_{VIM}* – koduoja Verona integrono koduojamą metalo-β-laktamazę.

Pradmenys parinkti naudojant Informax Vector NTI Suite *AlignX* modulį (versija 9.0.0.393) ir *jPCR* programas. Kadangi genų, koduojančių tą pačią karbapenemazę, yra keletas variantų, besiskiriančių vienu ar daugiau nukleotidų, naudojantis *AlignX* ir *NCBI* (angl. *National Center for Biotechnology Information*) duomenų baze, pradmenys parinkti taip, kad apimtų visus vieną karbapenemazę koduojančių genų variantus. *NCBI* duomenų bazėje buvo surastos genų variantų sekos ir perkeltos į *AlignX* modulį. Įkėlus sekas į *AlignX* modulį matomi sekų konservatyvūs regionai bei skirtumai tarp sekų. Konservatyviuose sekų regionuose, naudojant *jPCR* programą, buvo parinkti pradmenys bei zondai, reikalingi tikro laiko polimerazės grandininėi reakcijai. (8, 9 lentelės)

8 lentelė. Tikro laiko polimerazės grandininėje reakcijoje naudoti oligonukleotidiniai pradmenys

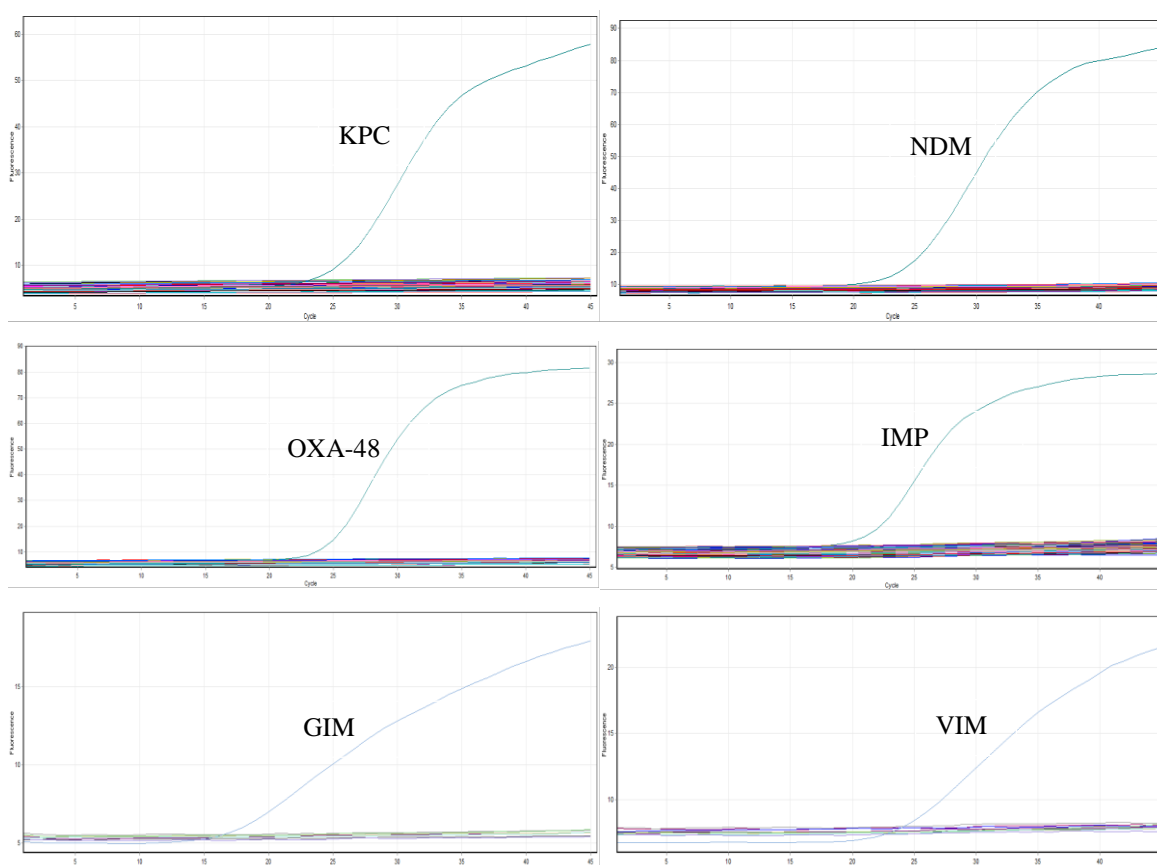
Pradmuo	Nukleotidų seka (5' – 3')	Amplikono ilgis (bp)
GIM (<i>bla_{GIM}</i>)	CTATCCAGGTGCTGGGCATACAG (F) CTACGTAACCTAAGCCTTCCCAC (R)	116
IMP (<i>bla_{IMP}</i>)	TGGTTTGTAGGGCGCGGCT (F1) TGGTTTGTGGARCGTGGCT (F2) TCAGATGCATACGTGGGRATWGATYGAGA (R)	116
KPC (<i>bla_{KPC}</i>)	CGATACCACGTTCCGTCTGGAC (F) TGTAAGCTTTCGTCACGGC (R)	105
NDM (<i>bla_{NDM}</i>)	GAAGCTGAGCACCGCATTAGC (F) GTGTGCTGCCAGACATTCGG (R)	153
OXA-48 (<i>bla_{OXA-48}</i>)	GCGTGTATTAGCCTTATCGGCTGTG (F) CTCATTCCAGAGCACAACACTACGCC (R)	146
VIM (<i>bla_{VIM}</i>)	GTGCGCTTCGGTCCMGTAGA (F) GCCATTCAGCCARRTYGGCATC (R)	167

9 lentelė. Tikro laiko polimerazės grandininėje reakcijoje naudoti oligonukleotidiniai zondai

Zondas	Nukleotidų seka (5' – 3')
GIM (<i>bla_{GIM}</i>)	FAM-TGACTCCTCACGAGGCAGCCACC-BHQ1
IMP (<i>bla_{IMP}</i>)	HEX-TAGCGACAGYACRGGHGGGAATAGAGTG-BHQ1
KPC (<i>bla_{KPC}</i>)	FAM-TGAACTCCGCCATCCCAGGCG-BHQ1
NDM (<i>bla_{NDM}</i>)	HEX-TCGCCAAACCGTTGGTCGCCAG-BHQ1
OXA-48 (<i>bla_{OXA-48}</i>)	FAM-TGCCWGCGGTAGCAAAGGAATGGC-BHQ1
VIM (<i>bla_{VIM}</i>)	HEX-TCTATCCTGGTGCTGCGCATTCGRSC-BHQ1

Paaiškinimai: W – A arba T nukleotidas, M – A arba C nukleotidas, R – A arba G nukleotidas, Y – C arba T nukleotidas, S – C arba G nukleotidas

Tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos sąlygos optimizuotos naudojant teigiamų ir neigiamų kontrolių kultūras. (2 paveikslas) Kaip teigiamos kontrolės buvo naudotos Enterobacteriaceae šeimos bakterijos su žinomais karbapenemazių genais. Kultūros gautos iš Baltijos šalių antimikrobinio atsparumo tinklo (angl. *BARN*), esančio Švedijoje. (71)



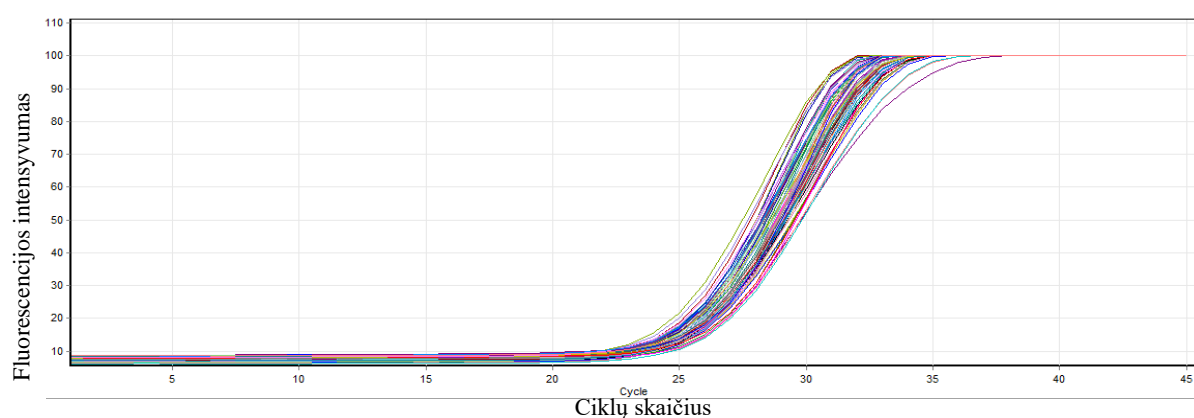
2 paveikslas. KPC, NDM, OXA-48, IMP, GIM ir VIM teigiamų ir neigiamų kontrolių amplifikacijos kreivės

Optimizavus tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos sąlygas buvo atliekamos tiriamųjų mėginių TL-PGR. Laminare paruošti trys skirtingi dauginės TL-PGR pradmenų, zondų

bei vidinės kontrolės mišiniai. Vidinei amplifikacijos kontrolei naudota plazmidė IC 1/10³, koduojanti bakterijoms nebūdingą dirbtinę DNR seką. (10, 11, 12 lentelės ir 3 paveikslas)

10 lentelė. Tikro laiko polimerazės grandininėje reakcijoje naudoti vidinės kontrolės pradmenys ir zondas

Pradmenys ir zondas	Nukleotidų seka (5' – 3')
Pradmuo F	CCGAGGACGAAATGGAAGTG
Pradmuo R	GGTGATGTTCTGAGTACATAGCGG
Zondas	ROX-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-BHQ2



3 paveikslas. Tiriamųjų mėginių vidinės kontrolės amplifikacijos kreivės

11 lentelė. KPC ir NDM pradmenų ir zondų mišinys, GIM ir VIM pradmenų ir zondų mišinys

Reagentai	Medžiagų kiekiai (μl)	Reagentai	Medžiagų kiekiai (μl)
ddH ₂ O	12,5	ddH ₂ O	12,5
KPC pradmuo F (100 μM)	5	GIM pradmuo F (100 μM)	5
KPC pradmuo R (100 μM)	5	GIM pradmuo R (100 μM)	5
KPC zondas (100 μM)	2,5	GIM zondas (100 μM)	2,5
NDM pradmuo F (100 μM)	5	VIM pradmuo F (100 μM)	5
NDM pradmuo R (100 μM)	5	VIM pradmuo R (100 μM)	5
NDM zondas (100 μM)	2,5	VIM zondas (100 μM)	2,5
Vidinės kontrolės pradmuo F (100 μM)	5	Vidinės kontrolės pradmuo F (100 μM)	5
Vidinės kontrolės pradmuo R (100 μM)	5	Vidinės kontrolės pradmuo R (100 μM)	5
Vidinės kontrolės zondas (100 μM)	2,5	Vidinės kontrolės zondas (100 μM)	2,5
Bendras kiekis	50	Bendras kiekis	50

12 lentelė. OXA-48 ir IMP pradmenų ir zondų mišinys

Reagentai	Medžiagų kiekiai (μl)
ddH ₂ O	7,5
OXA-48 pradmuo F (100 μM)	5
OXA-48 pradmuo R (100 μM)	5
OXA-48 zondas (100 μM)	2,5
IMP pradmuo F(1) (100 μM)	5
IMP pradmuo F(2) (100 μM)	5
IMP pradmuo R (100 μM)	5
IMP zondas (100 μM)	2,5
Vidinės kontrolės pradmuo F (100 μM)	5
Vidinės kontrolės pradmuo R (100 μM)	5
Vidinės kontrolės zondas (100 μM)	2,5
Bendras kiekis	50

TL-PGR reakcijos mišinys ruoštas iš SensiMix II Probe (2X) mišinio, pradmenų ir zondų mišinio, vidinei kontrolei naudojamos plazmidės IC 1/10³ ir bakterijų DNR. (13 lentelė)

13 lentelė. Tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos mišinio komponentai

Reagentai	Medžiagų kiekiai reikalingi vienai reakcijai (μl)
ddH ₂ O	6,186
SensiMix II Probe (2X)	7,5
Pradmenų ir zondų mišinys	0,3
Plazmidė IC 1/10 ³	0,014
DNR	1
Bendras kiekis	15

Paruoštas TL-PGR reakcijos mišinys išpilstytas į 0,1 ml sterilius mėgintuvėlius po 14 μl. Į mėgintuvėlius pridėta po 1 μl bakterijų DNR. Mėgintuvėliai buvo sudedami į amplifikatorių Rotor – Gene RG – 3000. Paleista TL-PGR programa. (14 lentelė)

14 lentelė. TL-PGR ciklų eiga

Etapai		Temperatūra	Laikas
DNR denatūracija		95°C	10 min
DNR denatūracija		95°C	20 s
Pradmenų prikibimas, mėginių fluorescencijos signalų detekcija	40 ciklų	60°C	60 s
Naujos grandinės sintezė		72°C	10 s

2.5.2. TL-PGR rezultatų analizė

TL-PGR rezultatai buvo analizuojami pagal gautas amplifikacijos kreives, kurios susidaro, kai kiekvieno mėginio fluorescencijos signalas nubrėžiamas priklausomai nuo ciklo skaičiaus. Tyrime taikytas dauginės TL-PGR metodas, kuriuo vienos reakcijos metu viename mėgintuvėlyje vyksta trijų taikinių detekcija (du tiriamieji genai ir viena vidinės kontrolės seka). Tiriamųjų genų poros dauginei TL-PGR parinktos taip, kad genų aptikimui naudojami pradmenys ir zondai nesihybridizuotų tarpusavyje. Dauginės TL-PGR genų poros:

- *bla_{KPC}* ir *bla_{NDM}*;
- *bla_{GIM}* ir *bla_{VIM}*;
- *bla_{OXA-48}* ir *bla_{IMP}*.

Dauginėje TL-PGR naudoti *TaqMan* zondai. *TaqMan* zondai yra sekai specifiniai oligonukleotidiniai zondai, turintys fluorescuojančią žymę ir fluorescenciją slopinančią žymę. Fluorescuojanti žymė pritvirtinta zondo 5' gale, o slopinanti žymė – 3' gale. Per PGR pradmenų prisijungimo ir naujos grandinės sintezės etapus, zondas suskaldomas dėl 5' → 3' *Taq* DNR polimerazės egzozonukleazinio aktyvumo. Tokiu būdu fluorescuojanti žymė atskiriama nuo slopinančios žymės, o fiksuojama fluorescencija yra proporcinga susikaupusio PGR produkto kiekiui.

Dauginėje TL-PGR naudoti zondai pažymėti skirtingomis fluorescuojančiomis žymėmis. GIM, KPC ir OXA-48 zondai pažymėti 6-karboksifluoresceino (FAM) fluorescuojančia žyme, kuri fluorescuoja žalia spalva. FAM absorbuoja 495 nm ilgio bangas, o išspinduliuojamų bangų ilgio maksimumas siekia 520 nm. Tokio ilgio bangas geba užfiksuoti TL-PGR amplifikatoriuje esantis fluorescencijos detektorius. VIM, NDM ir IMP zondai pažymėti 6-heksachlorofluoresceino (HEX) fluorescuojančia žyme, kuri fluorescuoja geltona spalva. HEX absorbuoja 535 nm ilgio bangas, o išspinduliuojamų bangų ilgio maksimumas siekia 556 nm, fiksuojamus detektoriaus. Vidinės amplifikacijos kontrolės zondas pažymėtas 5-karboksi-X-rodamino (ROX) fluorescuojančia žyme, kuri fluorescuoja oranžine spalva. ROX absorbuoja 576 nm ilgio bangas, o išspinduliuoja 601 nm ilgio bangas, kurias geba užfiksuoti amplifikatoriaus fluorescencijos detektorius.

TL-PGR metu DNR kiekis matuojamas po kiekvieno ciklo fluorescencinių dažų pagalba. Didėjant dažų kiekiui didėja ir fluorescencinis signalas, kuris yra proporcingas susidariusių PGR produktų (amplikonų) skaičiui. Duomenys surinkti reakcijos eksponentinės fazės metu suteikia kiekybinės informacijos apie amplifikacijos taikinio pradinį kiekį. Fluorescencijos pokyčiai vykstant reakcijai matuojami amplifikatoriuje esančiu detektoriumi. Brėždamas fluorescencijos signalo priklausomybę nuo ciklo skaičiaus, TL-PGR amplifikatorius sukuria amplifikacijos kreivę, kuri atspindi produkto kaupimąsi visos PGR reakcijos metu.

2.6. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė buvo atlikta naudojant laisvos prieigos statistinį duomenų paketą R (versija 3.3.3). Šapiro ir Vilko testu (angl. *Shapiro-Wilk test*) buvo tikrinama ar kiekybiniai duomenys yra pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį. Jei duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, analizei naudotas Stjudento (t) kriterijus (angl. *Student's t-test*) (dviejų imčių vidurkiams palyginti). Jei duomenys pasiskirstę ne pagal normalųjį skirstinį, analizei naudotas Vilkoksono testas (angl. *Wilcoxon test*) (neparametriniams dydžiams). Kiekybiniai duomenys, pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį pateikiami vidurkais su standartiniu nuokrypiu ($\bar{X} \pm SN$), o duomenys, kurie nepasiskirstę pagal normalųjį skirstinį apibūdinami naudojant medianą ir tarpkvartilinį plotį ($Md \pm IQR$). Pirsono chi kvadrato (X^2) kriterijus (angl. *Pearson's Chi-squared test*) ir tikslusis Fišerio testas (angl. *Fisher's exact test*) (mažoms imtims ir kai tikėtinų dažnių yra mažiau nei 5) taikytas kokybinių požymių ryšiui nustatyti. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių apibrėžtas, jei reikšmingumo lygmuo $p < \alpha$, kur $\alpha = 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų tyrimo rezultatai

3.1.1. Tiriamųjų amžiaus vidurkio nustatymas ir *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų pasiskirstymo tarp lyčių įvertinimas

Tyrimui buvo atrinkta 120 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų, atitinkančių potencialių karbapenemazių gamintojų kriterijus. Šie izoliatai turėjo padidėjusias MSK reikšmes karbapenemų grupės vaistams: MSK reikšmės imipinemui > 1 mg/L, o meropenemui – $> 0,12$ mg/L.

Tiriamųjų, kuriems buvo išauginti *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų klinikiniai izoliatai, vidutinis amžius siekė $54,74 \pm 17,29$ metų. Jauniausias tiriamasis buvo 2 metų, o vyriausias – 92 metų amžiaus. Iš viso tyrime buvo 68 vyrai ir 48 moterys. Vyrų vidutinis amžius buvo $59 \pm 18,25$ metai. Jauniausias vyriškos lyties tiriamasis buvo 2 metų, o vyriausias – 92 metų amžiaus. Moterų vidutinis amžius siekė $58,5 \pm 18,50$ metų. Jauniausia moteris buvo 21 metų, o vyriausia – 83 metų amžiaus. Vidutinis amžius tarp vyrų ir moterų statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,928$).

Tiek vyrams, tiek moterims dažniausiai buvo išauginti *K. pneumoniae* izoliatai. Moterims – 40 (38,8 %), o vyrams 63 (61,2 %) izoliatai. Kitų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų rūšių buvo išauginti pavieniai izoliatai. Moterims buvo išauginti 2 (100 %) *E. asburiae*, 2 (100 %) *E. cloacae*, 2 (66,7 %) *S. marcescens*, 1 (100 %) *E. kobei* ir 1 (100 %) *E.coli* izoliatai. Vyrams išauginti 2 (100 %) *E. aerogenes*, 1 (100 %) *C. freundii* ir 1 (33,3 %) *S. marcescens* izoliatai.

Nustatyta, kad į tyrimą įtrauktų ir padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams turėjusių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų dažnis statistiškai reikšmingai priklausė nuo vyriškos lyties ($p = 0,04$). (15 lentelė) Padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams turi ir karbapenemazes gaminančios, ir karbapenemazių negaminančios, tačiau karbapenemams atsparios bakterijos. S. Mariappan ir kiti, 2017 metais Indijoje atliko tyrimą, kuriuo siekta išsiaiškinti karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų sukeltų infekcijų rizikos veiksnius. (58) Tyrime buvo palyginti karbapenemazes gaminantys ir karbapenemazių negaminantys, tačiau atsparūs karbapenemams *Enterobacteriaceae* šeimos izoliatai. Tyrimo rezultatai atskleidė, kad vyriška lytis yra reikšmingas rizikos veiksnys infekcijoms, kurias sukelia tiek karbapenemazes gaminančios, tiek ir karbapenemazių negaminančios, bet atsparios karbapenemams *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos. Lyginant S. Mariappan ir kitų, tyrimo duomenis su mūsų tyrimo rezultatais, mūsų tyrimas paremia šio tyrimo rezultatus, jog vyriška lytis turi reikšmės infekcijoms, kurias sukelia karbapenemams atsparios *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos.

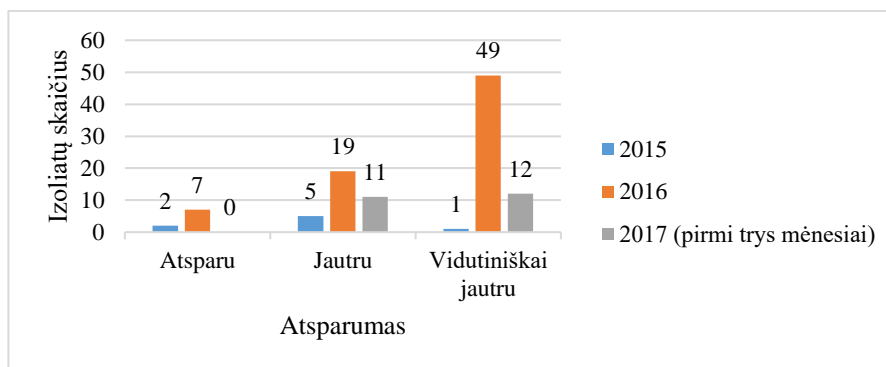
15 lentelė. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų pasiskirstymas tarp lyčių

		Lytis		Viso
		Moteris	Vyras	
Kultūros pavadinimas	<i>Citrobacter freundii</i>	0 (0 %)	1 (100 %)	1 (100 %)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 (0 %)	2 (100 %)	2 (100 %)
	<i>Enterobacter asburiae</i>	2 (100 %)	0 (0 %)	2 (100 %)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (100 %)	0 (0 %)	2 (100 %)
	<i>Enterobacter kobei</i>	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)
	<i>Esherichia coli</i>	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40 (38,8 %)	63 (61,2 %)	103 (100 %)
	<i>Morganella morganii</i>	0 (0 %)	1 (100 %)	1 (100 %)
	<i>Serratia marcescens</i>	2 (66,7 %)	1 (33,3 %)	3 (100 %)
Viso		48 (41,4 %)	68 (58,6 %)	116 (100 %)

3.1.2. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų jautrumo imipenemui ir meropenemui tyrimo rezultatai

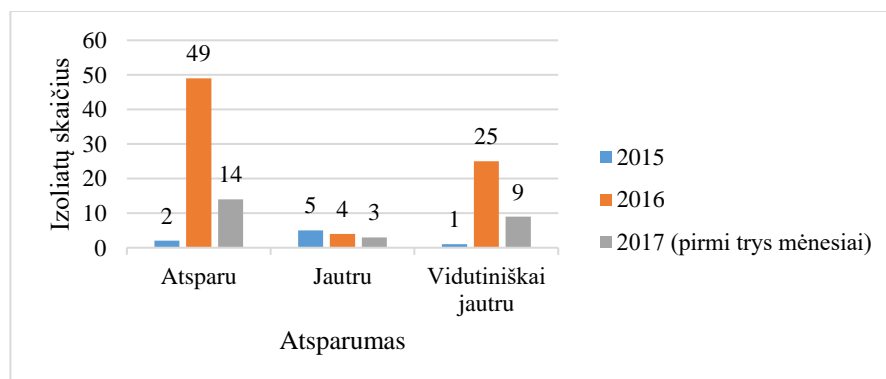
Enterobacteriaceae šeimos bakterijų izoliatai buvo suskirstyti į dvi grupes pagal jautrumą imipenemui ir meropenemui, remiantis EUCAST nustatytais kriterijais (imipenemo ir meropenemo MSK reikšmės: jautru, kai MSK ≤ 2 mg/L. Vidutiniškai jautru, kai MSK > 2 , bet ≤ 8 mg/L. Atsparu, kai MSK > 8 mg/L). 2017 metų mėginiai buvo renkami iki balandžio mėnesio. 2015 metais buvo išauginti 5 (62,5 %) izoliatai jautrūs imipenemui. Vidutiniškai jautrių izoliatų buvo išaugintas 1 (12,5 %), o atsparių – 2 (25 %). Lyginant 2015 metais išaugintus izoliatų su 2016 metais, nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių ($p = 0,009$). Pagal gautus rezultatus matyti tendencija, kad vidutiniškai jautrių ir atsparių izoliatų daugėjo. (4 paveikslas)

2016 metais atsparūs impenemui buvo išauginti 7 (9,3 %) izoliatai. Jautrių izoliatų buvo 19 (25,3 %), o vidutiniškai jautrių – 49 (65,3 %) izoliatai. Lyginant 2017 metais išaugintus izoliatu su 2016 metų tuo pačiu laikotarpiu statistiškai reikšmingo skirtumo tarp grupių nenumatyta ($p = 0,249$). Tiek 2016 metais, tiek ir 2017 metais per pirmuosius tris metų mėnesius nebuvo išauginta atsparių impenemui izoliatų (0 %). 2017 metais jautrių izoliatų buvo išauginta 11 (47,8 %), o vidutiniškai jautrių – 12 (52,2 %) izoliatų. (16 lentelė)



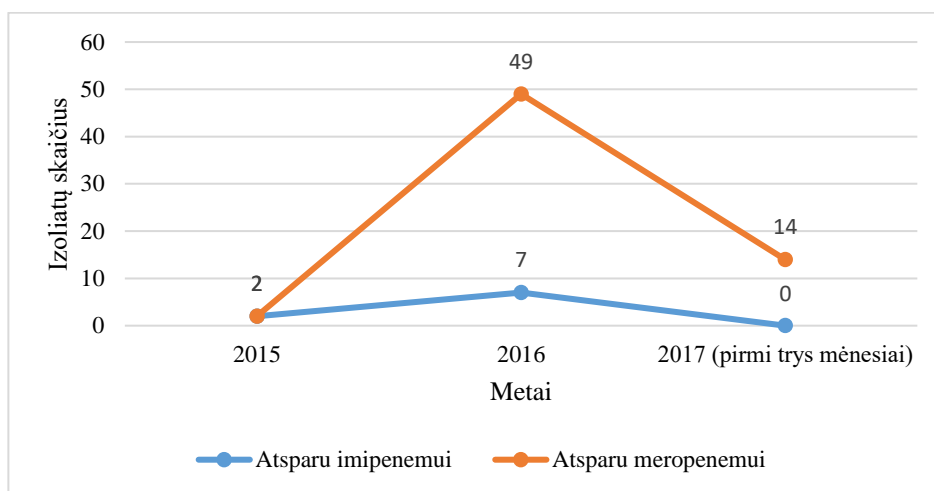
4 paveikslas. Impenemui atsparių, jautrių ir vidutiniškai jautrių *Enterobacteriaceae* šeimos izoliatų skaičiaus pasiskirstymas pagal metus

2015 metais buvo išauginti 5 (62,5 %) jautrūs, vienas izoliatas (12,5 %) vidutiniškai jautrus ir 2 (25 %) atsparūs meropenemui izoliatai. Lyginant 2015 metais išaugintus izoliatu su 2016 metais, nustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių ($p = 0,0003$). 2016 metais lyginant su 2015 metais buvo išauginta daugiau meropenemui atsparių izoliatų (49 (62,8 %)). Mažiausiai buvo išauginta jautrių izoliatų – 4 (5,1 %). Vidutiniškai jautrūs išauginti 25 (32,1 %) izoliatai. Lyginant 2017 metais išaugintus izoliatu su 2016 metų tuo pačiu laikotarpiu statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių nenumatytas ($p = 0,568$). 2017 metais per pirmuosiu tris metų mėnesius buvo išauginta daugiau meropenemui atsparių izoliatų (14 (53,9 %)) nei 2016 metų tuo pačiu laikotarpiu. 2017 metais buvo išauginti 3 (11,5 %) jautrūs meropenemui izoliatai, o vidutiniškai jautrių izoliatų buvo 9 (34,6 %). (5 paveikslas)



5 paveikslas. Meropenemui atsparių, vidutiniškai jautrių ir jautrių izoliatų pasiskirstymas pagal metus

Mūsų tyrimo duomenimis meropenemui atsparių izoliatų buvo daugiau nei imipenemui. 2015 metais metais šių izoliatų dažnis buvo toks pat, tačiau 2016 ir 2017 metais meropenemui atsparių izoliatų dažnis buvo žymiai didesnis. Tiek imipenemas, tiek ir meropenemas yra β -laktaminiai antibiotikai ir priklauso tai pačiai karbapenemų klasei. Didesnis meropenemui atsparių izoliatų dažnis gali būti siejamas su skirtingu antibiotikų veikimo mechanizmu, todėl imipenemas galimai yra veiksmingesnis negu meropenemas, kuriam atsparumas nustatomas dažniau. (6 paveikslas)



6 paveikslas. Imipenemui ir meropenemui atsparių izoliatų skaičiaus palyginimas pagal metus

NVSPL dauginiu atsparumu pasižyminčių bakterijų stebėsenos ataskaitos duomenimis 2015 metais buvo tirti 48 *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatai, surinkti iš 11 Lietuvos mikrobiologijos laboratorijų, esančių ligoninėse. (43) Iš jų atsparumu imipenemui ir meropenemui pasižymėjo 19 (39,58 %) izoliatų. Lyginant šiuos duomenis su mūsų tyrimo duomenimis atsparių karbapenemams *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų dažnis buvo panašus su 2015 metų Lietuvos mikrobiologijos laboratorijose nustatytu dažniu (39,58 % NVSPL tyrimo duomenimis ir 25 % mūsų tyrimo duomenimis).

Iš 120 tirtų *Enterobacteriaceae* šeimos izoliatų atsparūs vienam arba abiem tirtiems karbapenemams (imipenemui ir meropenemui) buvo 66 (55 %) izoliatai. Likę izoliatai turėjo padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams, todėl į tyrimą įtraukti kaip potencialūs karbapenemazių gamintojai.

3.1.3. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų pasiskirstymo tarp skyrių įvertinimas

Iš skirtingų ligoninės skyrių dažniausiai išauginamas izoliatas buvo *K. pneumoniae*. Daugiausiai *K. pneumoniae* izoliatų buvo išauginta bendrosios hematologijos (39 izoliatai (90,7 %)) ir kaulų čiulpu transplantacijos (41 izoliatas (100 %)) skyriuose. Kitų *Enterobacteriaceae*

šėimos atstovų izoliatai skirtinguose skyriuose buvo išauginami pavieniais atvejais. *Enterobacteriaceae* šėimos izoliatų pasiskirstymas pagal skyrius pateikiamas 16 lentelėje. Lyginant *K. pneumoniae* ir kitų *Enterobacteriaceae* šėimos bakterijų rūšių pasiskirstymą tarp skyrių, nustatytas statistiškai reišmingas skirtumas tarp grupių ($p = 0,0003$). Remiantis mūsų tyrimo rezultatais padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams turėjusių *Enterobacteriaceae* šėimos bakterijų izoliatų dažnis didžiausias bendrosios hematologijos ir kaulų čiulpų transplantacijos skyriuose, tačiau šie rezultatai nesutampa su kitų autorių duomenimis. (58, 59) Analizuojant kitų autorių tyrimus *Enterobacteriaceae* šėimos bakterijų izoliatai, atsparūs karbapenemams, dažniausiai išauginami intensyvios terapijos skyriuose. Remiantis E.S. Snitkin ir kitų, 2012 metais Jungtinėse Amerikos Valstijose atliktu tyrimu, intensyvios terapijos skyrius net siejamas su karbapenemams atsparių *Enterobacteriaceae* šėimos bakterijų protrūkiu ir plitimu visoje ligoninėje. (59) S. Mariappan ir kitų, 2017 metais Indijoje atlikto tyrimo duomenimis intensyvios terapijos skyrius yra reišmingas rizikos veiksnys infekcijoms, kurias sukelia karbapenemazes gaminančios ir karbapenemams atsparios *Enterobacteriaceae* šėimos bakterijos. (58)

16 lentelė. *Enterobacteriaceae* šėimos bakterijų pasiskirstymas pagal skyrius

Skyrius	Bakterijų rūšis									Viso
	<i>K. pneumoniae</i>	Kitos <i>Enterobacteriaceae</i> šėimos bakterijų rūšys								
		<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. kobei</i>	<i>C. freundii</i>	<i>M. morganii</i>	<i>S. marcescens</i>	
1. Ambulatoriniai sk.	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
2. Bendrosios hematologijos sk.	39	1	0	0	2	1	0	0	0	43
3. Chirurgijos sk.	6	0	0	1	0	0	0	0	1	8
4. Hematologijos ir onkologijos sk.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5. Kaulų čiulpų transplantacijos sk.	41	0	0	0	0	0	0	0	0	41
6. Nefrologijos ir inkstų transplantacijos sk.	4	0	0	0	0	0	1	1	0	6
7. Onkoginekologijos sk.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8. Reanimacijos ir intensyvios terapijos sk.	10	0	1	1	0	0	0	0	2	14
9. Urologijos sk.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
10. Kita*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Viso	103	2	2	2	2	1	1	1	3	117

*Kita – izoliatai atsiųsti į Mikrobiologijos laboratoriją iš kitų diagnostinių padalinių

3.1.4. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų pasiskirstymo pagal tiriamąją medžiagą įvertinimas

Daugiausiai padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams turėjusių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų buvo išauginta iš išmatų. Iš išmatų daugiausia išauginta *K. pneumoniae* izoliatų – 84 (93,4 %). Taip pat iš išmatų išauginta po vieną (1,1 %) *C. freundii*, *E. coli*, *E. asburiae* ir *E. kobei* izoliatą, bei 2 (2,2 %) *E. cloacae* izoliatai. Šių izoliatų radimas išmatose rodo, kad ligoniai yra kolonizuoti *Enterobacteriaceae* šeimos atstovais, kurie turi padidėjusias MSK reikšmes karbapenemų grupės vaistams. Šios bakterijos virškinamajame trakte gali keistis atsparumo mechanizmais su žarnyno bakterijomis. Epidemiologiniu požiūriu tai yra svarbus infekcijos išplitimo šaltinis, iš kurio, nesilaikant sanitarinių higienos reikalavimų atsparumu pasižyminčios bakterijos gali išplisti į ligoninių aplinką, bei toliau plisdamos kontakto būdu sąlygoti hospitalinių invazinių infekcijų atsiradimą. Kitų *Enterobacteriaceae* šeimos atstovų izoliatų skirtingose tiriamosiose medžiagose buvo išauginta pavieniais atvejais. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų pasiskirstymas pagal tiriamąją medžiagą pateikiamas 17 lentelėje. Tyrimo metu nustatyta, kad padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams turinčios *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos statistiškai reikšmingai dažniau buvo išaugintos iš išmatų nei iš kitų tiriamųjų medžiagų ($p = 0,002$). Pagal mūsų tyrimo rezultatus *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatai su padidėjusiomis MSK reikšmėmis karbapenemams dažniausiai buvo išauginami iš išmatų, o tai vertinome kaip epidemiologiškai reikšmingą kolonizaciją. Tarp kliniškai reikšmingų infekcijų sukėlėjų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatai su padidėjusiomis MSK reikšmėmis karbapenemams dažniausiai buvo išauginami iš kraujo ir šlapimo. Gauti rezultatai sutampa tiek su Europoje, Turkijoje, 2016 metais I. Baran ir N. Aksu (60), tiek su Afrikoje, Ugandoje, 2015 metais D. Okoche ir kitų, (61) atliktais tyrimais. Pagal Turkijoje atlikto tyrimo rezultatus dažniausiai karbapenemams atsparūs *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatai buvo išauginami iš kraujo, šlapimo ir žaizdų eksudato, o Ugandoje atlikto tyrimo duomenimis šie izoliatai dažniausiai buvo išauginami iš šlapimo, kraujo ir pūlių tepinėlių.

17 lentelė. *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų pasiskirstymas pagal tiriamąją medžiagą

Tiriamoji medžiaga	Bakterijų rūšis									Viso
	<i>K. pneumoniae</i>	Kita <i>Enterobacteriaceae</i> šeimos bakterijų rūšis								
		<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. kobei</i>	<i>C. freundii</i>	<i>M. morganii</i>	<i>S. marcescens</i>	
BAL skystis	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Bronchų aspiratas	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Iš pilvo ertmės eksudato	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Išmatos	84	1	0	1	2	1	1	0	0	90
Kateteris	1	0	0	0	0	0	0	0	2	3
Kraujas	6	0	1	0	1	0	0	0	1	9
Operacinė žaizda	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Pūliai iš absceso	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Punktatas	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Skrepliai	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Skystis iš dreno	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Šlapimas	6	1	0	0	0	0	0	1	0	8
Viso	105	2	2	2	3	1	1	1	3	120

3.1.5. Invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų tyrimo rezultatai

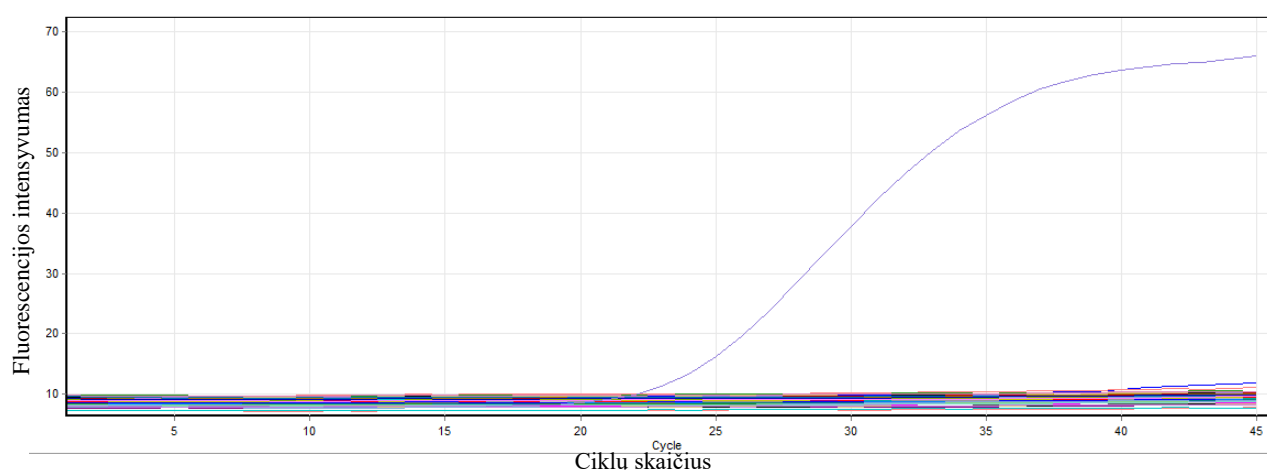
Pagal tiriamąją medžiagą buvo atskirta invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų grupė. Šiai grupei priklauso bakterijų izoliatai, išskirti iš kraujo ir smegenų skysčio. Iš viso šių bakterijų izoliatų buvo 14 ir sudarė 11,67 % visų tirtų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų. Visi (100 %) invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatai buvo išauginti iš kraujo.

Tirti invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos izoliatai turėjo padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams, tačiau nei vienas izoliatas nepasižymėjo atsparumu imipenemui ir meropenemui (0 %) pagal EUCAST nustatytus kriterijus (imipenemo ir meropenemo MSK reikšmės: jautru, kai $MSK \leq 2$ mg/L. Vidutiniškai jautru, kai $MSK > 2$, bet ≤ 8 mg/L. Atsparu, kai $MSK > 8$ mg/L). Jautrūs imipenemui buvo išauginti 8 (100 %), o jautrūs meropenemui 9 (90 %) izoliatai. Vidutiniškai jautrus meropenemui išaugintas 1 (10 %) *Enterobacteriaceae* šeimos izoliatas. Lyginant gautus rezultatus su NVSPL 2015 metų invazinių antibiotikams atsparių bakterijų ataskaitos duomenimis, gautais iš 16 mikrobiologijos laboratorijų, esančių Lietuvos ligoninėse, matoma, kad gauti duomenys panašūs. Tiek kitose Lietuvos ligoninėse, tiek ir mūsų ligoninėje atsparių imipenemui ir meropenemui invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų nenustatyta (0 %). NVSPL ataskaitoje Lietuvos ligoninėse jautrių imipenemui izoliatų dažnis siekė

99,44 %, o meropenemui – 99,53 %. (43) Mūsų tyrime imipenemui jautrių izoliatų dažnis buvo 100 %, o meropenemui jautrių – 90 %. Išanalizavus NVSPL ir mūsų tyrimų duomenis, matoma, kad invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų situacija Europoje skiriasi nuo Lietuvos. Remiantis A.P. Magiorakos ir kitų, 2013 metų tyrimu Europoje net 18 valstybių pranešė apie bent vieną invazinį karbapenemams atsparaus *K. pneumoniae* izoliato atvejį. Taip pat tyrimo analizė parodė, kad keliose šalyse, tokiose kaip Graikija, Kipras, Vengrija ir Italija, karbapenemams atsparių invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų tendencija didėja. Dažnėjantys pranešimai apie visuomenines invazines infekcijas rodo, kad karbapenemams atsparios *K. pneumoniae* bakterijos plinta ne tik ligoninių mastu, bet ir visuomenėje. (62) NVSPL ir mūsų tyrimo duomenimis Lietuvoje karbapenemams atsparių invazinių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų plitimo tendencija nėra didėjanti, tačiau infekcijų kontrolės priemonės yra būtinos, jei plitimas pasiektų ir Lietuvą.

3.1.6. Karbapenemazių genų nustatymas TL-PGR metodu *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatuose

Iš 120 tirtų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų buvo nustatytas vienas izoliatas, koduojantis NDM tipo karbapenemazę. (7 paveikslas) Šis izoliatas į VUL Santaros klinikų Mikrobiologijos laboratoriją buvo gautas iš Medicina practica laboratorijos. Izoliatas su NDM tipo karbapenemaze sudarė 0,83 % visų tirtų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų. Tirtuose *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatuose *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* ir *bla_{VIM}* genų, koduojančių karbapenemazes, nenustatyta (0 %). Iš 120 tirtų *Enterobacteriaceae* šeimos atstovų atsparūs karbapenemams buvo 66 (55 %) izoliatai, o likę 54 (45%) izoliatai turėjo padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams. NDM tipo karbapenemazę gaminantis izoliatas buvo nustatytas atsparių karbapenemams izoliatų grupėje (sudarė 1,52 %), o padidėjusias MSK reikšmes turėjusių izoliatų grupėje karbapenemazes gaminančių izoliatų nenustatyta (0 %).



7 paveikslas. TL-PGR metodu nustatytos NDM tipo karbapenemazės amplifikacijos kreivė

Lyginant mūsų tyrimo rezultatus su Europos karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* projekto duomenimis apie Lietuvą, mūsų tyrimo metu karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų nustatyta mažiau. Projekto duomenimis Lietuvoje buvo nustatyti 2 *K. pneumoniae* izoliatai su OXA-48 tipo karbapenemaze, 9 *E. cloacae* izoliatai su NDM tipo karbapenemaze, 1 *E. aerogenes* izoliatas su NDM tipo karbapenemaze ir 1 *E. cloacae* izoliatas su VIM tipo karbapenemaze. To paties tyrimo duomenimis beveik visose Europos valstybėse nustatomi *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatai su NDM tipo karbapenemaze, išskyrus Albaniją, Bosniją ir Hercegoviną, Kiprą, Islandiją, Kosovą, Latviją, Liuksemburgą ir Malta. Vertinant kaimyninių valstybių duomenis apie karbapenemazes gaminančias *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijas, Latvijoje ir Estijoje šių bakterijų izoliatų nustatoma pavieniais atvejais, o nustatytos vyraujančios karbapenemazės yra GIM ir VIM tipo. Lenkijoje nuo 2008 iki 2012 metų vyraujančios karbapenemazės buvo KPC tipo, tačiau dabar situacija pasikeitė ir vyraujančios karbapenemazės yra NDM tipo. (40)

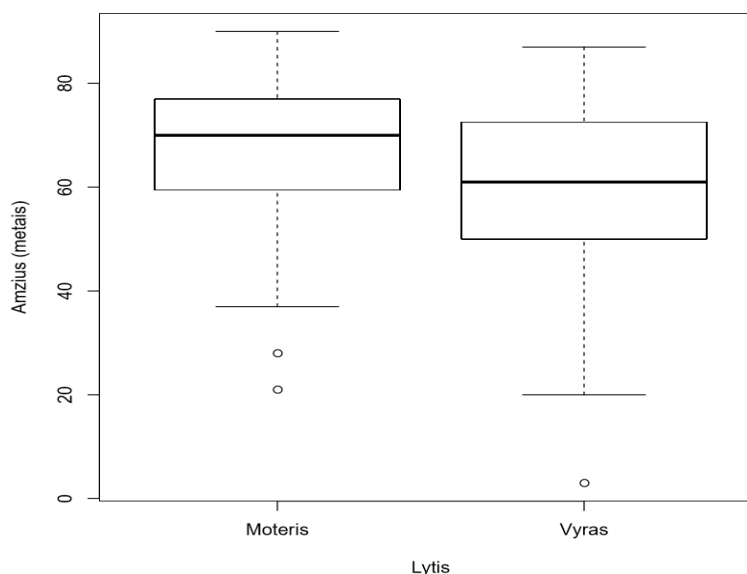
Pagrindinis atsparumo karbapenemams mechanizmas *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose yra karbapenemazių gamyba. Jos perduodamos tarp skirtingų bakterijų rūšių su plazmidėmis ir suteikia atsparumą ne tik karbapenemams, bet ir kitiems antibiotikams, tokiems kaip penicilinai ar cefalosporinai. Mūsų tyrimo duomenimis iš 120 tirtų padidėjusias MSK reikšmes karbapenemams turėjusių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų tik vienam izoliatui nustatyta karbapenemazės gamyba. Kitų tirtų *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų izoliatų atsparumas karbapenemams turėtų būti siejamas su kitais atsparumo mechanizmais, tokiais kaip išmetimo pompos ar mutacijos, kurios pakeičia porinų ir PSB raišką ir funkcijas. (29)

3.2. *Pseudomonas* genties bakterijų tyrimo rezultatai

3.2.1. Tiriamųjų amžiaus vidurkio nustatymas ir *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymo tarp lyčių įvertinimas

Tyrimui buvo atrinkti 143 *Pseudomonas* genties izoliatai, atsparūs vienam arba keliems karbapenemams (imipenemui ir meropenemui).

Pacientų, kuriems buvo išauginti atsparūs karbapenemams *Pseudomonas* genties klinikiniai izoliatai, vidutinis amžius siekė $60,69 \pm 17,37$ metų. Moterų vidutinis amžius buvo $70 \pm 17,50$ metai, o vyrų $61 \pm 22,25$ metai. Vidutinis amžius tarp vyrų ir moterų statistiškai reikšmingai skyrėsi ($p = 0,004$). (8 paveikslas) Jauniausia moteris buvo 21 metų, o vyriausiai buvo 90 metų. Jauniausio vyriškos lyties tiriamojo amžius siekė 3 metus, o vyriausio 87 metus.



8 paveikslas. Vyrų ir moterų amžiaus pasiskirstymo stačiakampė diagrama

Tiek vyrams, tiek moterims dažniausiai buvo išauginami *P. aeruginosa* rūšiai priklausę klinikiniai izoliatai. Moterims išauginti 55 (40,4 %), o vyrams 81 (59,6 %) izoliatas. Kitų *Pseudomonas* rūšių buvo išauginti pavieniai izoliatai. *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymas tarp lyčių pateikiamas 18 lentelėje. Nustatyta, kad *Pseudomonas* genties izoliatų dažnis statistiškai reikšmingai nepriklausė nuo lyties ($p = 0,847$). Mūsų tyrimo duomenimis *Pseudomonas* genties izoliatų dažnis reikšmingai nuo lyties nepriklausė, tačiau šių izoliatų išauginta daugiau vyrams negu moterims. Lyginant mūsų tyrimo rezultatus su kitų autorių tyrimais, rezultatai sutampa. Tiek J. M. Vanegas ir kitų, 2014 metais Kolumbijoje, tiek ir K. Y. Lin ir kitų, Taivane 2016 metais atliktų tyrimų duomenimis karbapenemams atsparių *Pseudomonas* genties bakterijų išauginama daugiau vyrams, tačiau statistiškai reikšminga priklausomybė nuo lyties nepatvirtinta. (63, 64)

18 lentelė. *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymas tarp lyčių

		Lytis		Viso
		Moteris	Vyras	
Rūšis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55 (40,4 %)	81 (59,6 %)	136 (100 %)
	<i>Pseudomonas monteillii</i>	0 (0 %)	1 (100 %)	1 (100 %)
	<i>Pseudomonas putida</i>	1 (33,3 %)	2 (66,7 %)	3 (100 %)
	<i>Pseudomonas veronii</i>	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)
Viso		57 (40,4 %)	84 (59,6 %)	141 (100 %)

3.2.2. *Pseudomonas* genties bakterijų jautrumo imipenemui ir meropenemui tyrimo rezultatai

Pseudomonas genties bakterijų izoliatai buvo suskirstyti į dvi grupes pagal jautrumą imipenemui ir meropenemui, remiantis EUCAST nustatytais kriterijais (imipenemo MSK reikšmės: jautru, kai MSK ≤ 4 mg/L. Vidutiniškai jautru, kai MSK > 4, bet ≤ 8 mg/L. Atsparu, kai MSK > 8 mg/L. Meropenemo MSK reikšmės: jautru, kai MSK ≤ 2 mg/L. Vidutiniškai jautru, kai MSK > 2, bet ≤ 8 mg/L. Atsparu, kai MSK > 8 mg/L.) 2017 metų mėginiai buvo renkami iki balandžio mėnesio. 2015 metais atsparūs imipenemui *Pseudomonas* genties izoliatai sudarė didžiausią dalį – 38 (97,4 %). Tais pačiais metais buvo išaugintas vienas (2,6 %) vidutiniškai jautrus izoliatas. Lyginant 2015 metų duomenis su 2016 metų duomenimis statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių nenustatytas ($p = 0,260$), tačiau imipenemui atsparių izoliatų tendencija didėjo. 2016 metais atsparūs imipenemui buvo išauginti 68 (100 %) izoliatai. 2017 metais daugiausia buvo išauginta atsparių *Pseudomonas* genties izoliatų – 19 (79,2 %), o 2016 metais tuo pačiu laikotarpiu išauginta 10 imipenemui atsparių izoliatų. (19 lentelė) Lyginant 2017 metų pirmųjų trijų mėnesių izoliatų išauginimą su 2016 metų tuo pačiu laikotarpiu, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių nenustatytas ($p = 0,290$).

19 lentelė. Imipenemui atsparių ir vidutiniškai jautrių *Pseudomonas* genties izoliatų pasiskirstymas pagal metus

	Metai			Viso
	2015	2016	2017 (pirmi trys mėnesiai)	
Atsparu	38 (97,4 %)	68 (100 %)	19 (79,2 %)	125 (99,2 %)
Vidutiniškai jautru	1 (2,6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (0,8 %)
Viso	39 (100 %)	68 (100 %)	19 (100 %)	126 (100 %)

Tyrimo metu 2015, 2016 ir 2017 metais daugiausia buvo išauginta atsparių meropenemui *Pseudomonas* genties izoliatų – 116 (87,2 %). Meropenemui vidutiniškai jautrių izoliatų daugiausia išauginta 2016 metais. Šiais metais vidutiniškai jautrių izoliatų išauginta 10 (13,7 %). (20 lentelė) Lyginant 2015 metais išaugintų izoliatų rezultatus su 2016 metais ($p = 0,713$) ir 2017 metų rezultatus su 2016 metų tuo pačiu laikotarpiu ($p = 0,649$) statistiškai reikšmingų skirtumų tarp grupių nenustatyta.

20 lentelė. Atsparių ir vidutiniškai jautrių *Pseudomonas* genties izoliatų pasiskirstymas pagal metus

	Metai			Viso
	2015	2016	2017	
Atsparu	33 (91,7 %)	63 (86,3 %)	20 (83,3 %)	116 (87,2 %)
Vidutiniškai jautru	3 (8,3 %)	10 (13,7 %)	4 (16,7 %)	17 (12,8 %)
Viso	36 (100 %)	73 (100 %)	24 (100 %)	133 (100 %)

Kitų autorių duomenimis 2014 metais Kolumbijoje *Pseudomonas* genties bakterijų atsparumas imipenemui siekė 86,1 %, o meropenemui – 80,3 %. (63) Lyginant šiuos duomenis su mūsų tyrimo duomenimis matoma, kad atsparumas imipenemui ir meropenemui buvo panašus.

3.2.3. *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymo tarp skyrių įvertinimas

Dažniausiai iš skirtingų skyrių buvo išauginami atsparūs karbapenemams *Pseudomonas aeruginosa* rūšies izoliatai. Daugiausia *P. aeruginosa* rūšies izoliatų buvo išauginta iš reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriaus. Iš šio skyriaus buvo išaugti 38 (100 %) izoliatai. Kitų *Pseudomonas* rūšių izoliatų buvo išauginta pavieniais atvejais skirtinguose skyriuose. *Pseudomonas* genties izoliatų pasiskirstymas tarp skyrių pateikiamas 21 lentelėje. *Pseudomonas* genties izoliatai buvo išauginti ne tik iš VUL Santaros klinikų skyrių, bet ir iš kitų diagnostinių padalinių. Lyginant *P. aeruginosa* ir kitų *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymą tarp skyrių, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių nustatytas ($p = 0,234$). Remiantis mūsų tyrimo rezultatais *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų dažnis buvo didžiausias reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriuje. Analizuojant kitų autorių iš Taivano 2016 metų ir Brazilijos 2016 metų tyrimus *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatai, atsparūs karbapenemams, taip pat dažniausiai išauginami intensyvios terapijos skyriuose. (64, 65) I. R. Gonçalves ir kitų, 2016 metais Brazilijoje atlikto tyrimo duomenimis intensyvios terapijos skyrius yra reikšmingas rizikos veiksnys infekcijoms, kurias sukelia karbapenemams atsparios *Pseudomonas* genties bakterijos. (65)

21 lentelė. Atsparių karbapenemams *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymas skyriuose

Skyrius	Bakterijų rūšis				Viso
	<i>P. aeruginosa</i>	Kita <i>Pseudomonas</i> genties bakterijų rūšis			
		<i>P. monteillii</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. veronii</i>	
1. Akių ligų sk.	1	0	0	0	1
2. Ambulatoriniai sk.	16	0	1	0	17
3. Bendrosios hematologijos sk.	5	0	0	1	6
4. Chemoterapijos sk.	1	0	0	0	1
5. Chirurgijos sk.	30	0	1	0	31
6. Dermatovenerologijos sk.	3	0	0	0	3
7. Hematologijos ir onkologijos dienos stacionaro sk.	1	0	0	0	1
8. Hepatologijos ir gastroenterologijos sk.	2	0	0	0	2
9. Kaulų čiulpų transplantacijos sk.	12	0	0	0	12
10. Nefrologijos ir inkstų transplantacijos sk.	4	1	0	0	5
11. Onkoginekologijos posk.	1	0	0	0	1
12. Ortopedijos traumatologijos sk.	2	0	0	0	2
13. Pulmonologijos ir alergologijos sk.	4	0	1	0	5
14. Reanimacijos ir intensyvios terapijos sk.	38	0	0	0	38
15. Stacionarinės rehabilitacijos sk.	2	0	0	0	2
16. Urologijos sk.	3	0	0	0	3
17. Vidaus ligų sk.	2	0	0	0	2
18. Kita*	10	0	0	0	10
Viso	137	1	3	1	142

*Kita - izoliatai atsiųsti į Mikrobiologijos laboratoriją iš kitų diagnostinių padalinių

3.2.4. *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymo pagal tiriamąją medžiagą įvertinimas

Dažniausiai *Pseudomonas* genties bakterijos buvo išauginamos iš šlapimo ir žaizdos eksudato, atitinkamai 29 ir 27 izoliatai. Iš šlapimo buvo išauginti 28 (96,6 %) *P. aeruginosa* ir 1 (3,4 %) *P. putida* izoliatai. Iš žaizdos eksudato išauginti 25 (92,6 %) *P. aeruginosa* izoliatai ir po 1 (3,7 %) *P. monteillii* bei *P. putida* izoliatą. Rečiausiai izoliatai išauginti iš operacinės žaizdos, pūlių iš absceso, skysčio iš dreno ir tracheostomos sekreto. Iš šių tiriamųjų medžiagų buvo išauginta po 1 (100 %) *P. aeruginosa* izoliatą. *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymas pagal tiriamąją medžiagą pateikiamas 22 lentelėje. Tyrimo metu nustatyta, kad karbapenemams atsparių *Pseudomonas* genties bakterijų išauginimas statistiškai reikšmingai nepriklausė nuo tiriamosios medžiagos ($p = 0,935$). Pagal mūsų tyrimo rezultatus karbapenemams atsparūs *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatai dažniausiai buvo išauginami iš šlapimo, žaizdos eksudato ir išmatų.

Gauti rezultatai sutampa su kitų autorių Kolumbijoje 2014 metais (63), Taivane 2016 metais (64) ir Brazilijoje 2017 (65) metais atliktų tyrimų duomenimis. Remiantis šių autorių rezultatais karbapenemams atsparios *Pseudomonas* genties bakterijos dažniausiai išauginamos iš šlapimo, žaizdų ir seilių tiriamosios medžiagos.

22 lentelė. *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymas pagal tiriamąją medžiagą

Tiriamoji medžiaga	Bakterijų rūšis				Viso
	<i>P. aeruginosa</i>	Kita <i>Pseudomonas</i> genties bakterijų rūšis			
		<i>P. monteilii</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. veronii</i>	
BAL skystis	5	0	0	0	5
Bronchų aspiratas	16	0	0	0	16
Iš ausies	2	0	0	0	2
Iš trofinės opos	11	0	0	0	11
Išmatos	18	0	0	1	19
Kita	8	0	0	0	8
Kraujas	7	0	0	0	7
Kvėpavimo takai	3	0	0	0	3
Operacinė žaizda	1	0	0	0	1
Pūliai iš absceso	1	0	0	0	1
Punktatas	3	0	0	0	3
Skrepliai	6	0	1	0	7
Skystis iš dreno	1	0	0	0	1
Šlapimas	28	0	1	0	29
Stentas	2	0	0	0	2
Tracheostomos sekretas	1	0	0	0	1
Žaizdos eksudatas	25	1	1	0	27
Viso	138	1	3	1	143

3.2.5. Invazinių *Pseudomonas* genties bakterijų tyrimo rezultatai

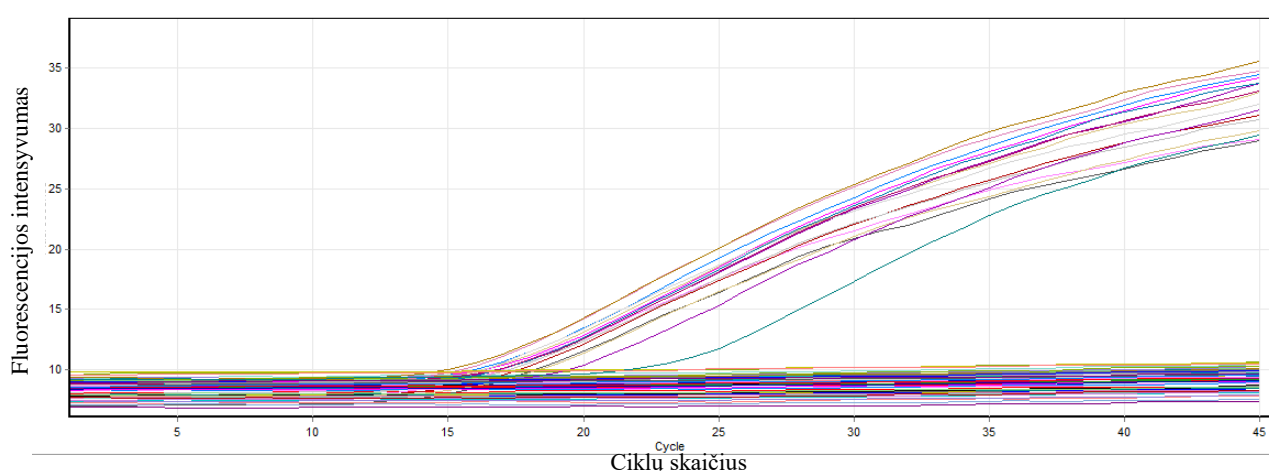
Pagal tiriamąją medžiagą buvo atskirta atsparių karbapenemams invazinių *Pseudomonas* genties bakterijų grupė. Šiai grupei priklausė *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatai išskirti iš kraujo ir smegenų skysčio. Visi (100 %) surinkti izoliatai buvo išskirti iš kraujo. Šių izoliatų buvo 7 ir tai sudarė 4,9 % visų *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų. Visi invazinių *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatai priklausė *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų rūšiai.

Pagal EUCAST nustatytus kriterijus karbapenemams (imipenemo MSK reikšmės: jautru, kai MSK \leq 4 mg/L. Vidutiniškai jautru, kai MSK $>$ 4, bet \leq 8 mg/L. Atsparu, kai MSK $>$ 8 mg/L.

Meropenemo MSK reikšmės: jautru, kai $MSK \leq 2$ mg/L. Vidutiniškai jautru, kai $MSK > 2$, bet ≤ 8 mg/L. Atsparu, kai $MSK > 8$ mg/L.), visi (100 %) invaziniai *Pseudomonas* genties izoliatai buvo atsparūs imipenemui. Vidutiniškai jautrių ir jautrių izoliatų imipenemui neišauginta (0 %). Meropenemui atsparių invazinių *Pseudomonas* genties izoliatų buvo 5 (71,43 %), o vidutiniškai jautrių – 2 (28,57 %). Jautrių meropenemui izoliatų neišauginta (0 %). Lyginant gautus rezultatus su kitų Europos šalių invazinių *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų atsparumu karbapenemams matyti, kad atsparumo karbapenemams procentas svyruoja nuo 0 % (Islandijoje) iki 66,3 % (Rumunijoje). (66)

3.2.6. Karbapenemazių genų nustatymas TL-PGR metodu *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatuose

Iš tirtų 143 atsparių karbapenemams *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų buvo nustatyti 34 izoliatai, turintys VIM tipo karbapenemazę. (9 paveikslas) Šių izoliatų dažnis siekė 23,78 % tarp atsparių karbapenemams VUL Santaros klinikų *Pseudomonas* genties izoliatų. Visi izoliatai su nustatyta VIM tipo karbapenemaze priklausė *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų rūšiai. Tirtuose *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatuose *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* ir *bla_{OXA-48}* genų, koduojančių karbapenemazes, nenustatyta (0 %).



9 paveikslas. TL-PGR metodu nustatytos VIM tipo karbapenemazės amplifikacijos kreivės

Lyginant gautus rezultatus su Lietuvos Sveikatos mokslų universiteto ligoninėje atlikto tyrimo duomenimis matyti, kad *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų su VIM tipo karbapenemaze dažnis panašus. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninėje šis dažnis siekia 21,92 %, o mūsų tyrimo duomenimis 23,78 %. (6) Analizuojant 2015 metų Korėjos autorių duomenis VIM tipo karbapenemazes gaminančios *Pseudomonas* genties bakterijos aptinkamos beveik visose Europos valstybėse: Italijoje, Prancūzijoje, Graikijoje, Vokietijoje, Austrijoje, Vengrijoje, Portugalijoje, Ispanijoje, Kroatijoje, Lenkijoje, Belgijoje, Turkijoje, Švedijoje, Jungtinėje Karalystėje, Bulgarijoje. (67)

3.3. *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze tyrimo rezultatai

3.3.1. Tiriamųjų amžiaus vidurkio nustatymas ir izoliatų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymo tarp lyčių įvertinimas

Pacientų, kurių *Pseudomonas* genties klinikiniais izoliatams buvo nustatytos VIM tipo karbapenemazės, amžiaus vidurkis siekė $62,38 \pm 15,09$ metus. Moterų amžiaus vidurkis buvo $68,4 \pm 13,72$ metai, o vyrų $59,86 \pm 15,19$ metai. Vyrų ir moterų vidutinis amžius reikšmingai nesiskyrė ($p = 0,14$). Jauniausia moteris buvo 37 metų, o vyriausiai buvo 85 metai. Jauniausio vyro amžius siekė 28 metus, o vyriausio 82 metus.

Pseudomonas genties izoliatai su VIM tipo karbapenemaze dažniausiai buvo nustatomi vyrams. Moterims VIM tipo karbapenemazės nustatytos 10-yje (29,4 %) izoliatų, o vyrams – 24-iuose (70,6 %) izoliatuose. *Pseudomonas* genties izoliatų nustatymas su VIM tipo karbapenemaze statistiškai reikšmingai priklausė nuo vyriškos lyties ($p = 0,02$). Šie rezultatai sutampa su kitų autorių 2014 metais Kolumbijoje (63), 2017 metais Brazilijoje (65) atliktų tyrimų duomenimis, kuriuose karbapenemazes gaminantys ir karbapenemams atsparūs *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatai išauginami dažniau vyrams nei moterims.

3.3.2. *Pseudomonas* genties bakterijų su VIM tipo karbapenemaze jautrumo imipenemui ir meropenemui tyrimo rezultatai

Pseudomonas genties bakterijų izoliatai su VIM tipo karbapenemaze buvo suskirstyti į dvi grupes pagal jautrumą imipenemui ir meropenemui, remiantis EUCAST nustatytais kriterijais (imipenemo MSK reikšmės: jautru, kai $MSK \leq 4$ mg/L. Vidutiniškai jautru, kai $MSK > 4$, bet ≤ 8 mg/L. Atsparu, kai $MSK > 8$ mg/L. Meropenemo MSK reikšmės: jautru, kai $MSK \leq 2$ mg/L. Vidutiniškai jautru, kai $MSK > 2$, bet ≤ 8 mg/L. Atsparu, kai $MSK > 8$ mg/L.) 2017 metų mėginiai buvo renkami iki balandžio mėnesio. Daugiausia atsparių imipenemui *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze buvo išauginta 2016 metais. Šiais metais buvo išauginta 16 (47,1 %) izoliatų. 2015 metais išauginta 15 (44,1 %) tokių izoliatų, o 2017 metais išauginti 3 (8,8 %) izoliatai. Vidutiniškai jautrių imipenemui *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze nebuvo išauginta (0 %). (23 lentelė)

23 lentelė. Imipenemui atsparių ir vidutiniškai jautrių *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymas pagal metus

	Metai			Viso
	2015	2016	2017 (pirmi trys mėnesiai)	
Atsparu	15 (44,1 %)	16 (47,1 %)	3 (8,8 %)	34 (100 %)
Vidutiniškai jautru	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Viso	15 (100 %)	16 (100 %)	3 (100 %)	34 (100 %)

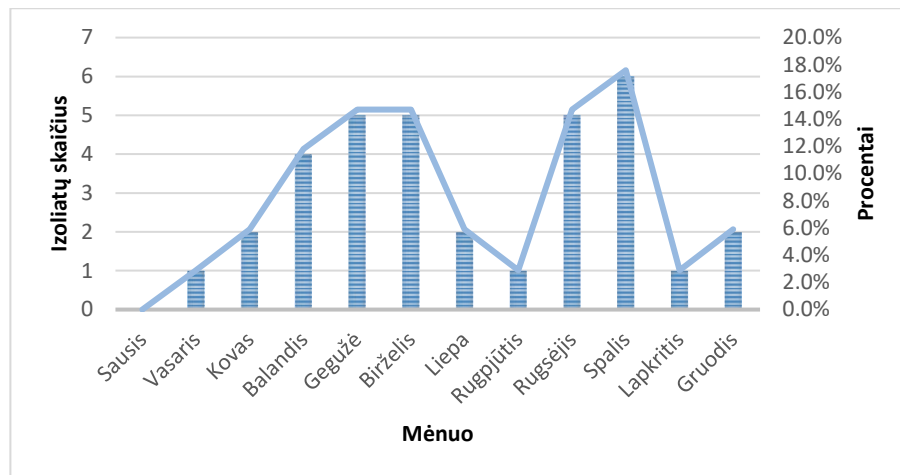
Daugiausia atsparių meropenemui *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze buvo išauginta 2016 metais – 16 (50 %) izoliatų. Šiek tiek mažiau tokių izoliatų išauginta 2015 metais – 13 (40,6 %) izoliatų, o 2017 metais išauginti 3 (9,4 %) izoliatai su VIM tipo karbapenemaze atsparūs meropenemui. Vidutiniškai jautrių *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze nebuvo išauginta (0 %). (24 lentelė)

24 lentelė. Meropenemui atsparių ir vidutiniškai jautrių *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymas pagal metus

	Metai			Viso
	2015	2016	2017 (pirmi trys mėnesiai)	
Atsparu	13 (40,6 %)	16 (50 %)	3 (9,4 %)	32 (100 %)
Vidutiniškai jautru	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Viso	16 (100 %)	16 (100 %)	3 (100 %)	33 (100 %)

Remiantis kitų autorių duomenimis karbapenemazes gaminančių *Pseudomonas* genties bakterijų atsparumas karbapenemams sutampa su mūsų tyrimo rezultatais. G. Mikučionytės ir kitų, 2016 metais Lietuvoje atlikto tyrimo duomenimis, karbapenemazes gaminančių *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų, atsparių imipenemui ir meropenemui, dažnis siekia 100 %, o tai sutampa su mūsų tyrimo rezultatais. (6) Lyginant gautus rezultatus su Egipte atlikto tyrimu, rezultatai taip pat sutampa. Egipte atlikto tyrimo duomenimis visi tirti karbapenemazes gaminantys *Pseudomonas* genties izoliatai pasižymėjo atsparumu (100 %) imipenemui ir meropenemui. (68)

Taip pat buvo analizuotas *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze išskyrimo dažnis pagal metų laikus ir mėnesį. Žiemą buvo išauginti 3 (8,8 %) (gruodį 2 (5,9 %), sausį 0 (0 %), vasarį 1 (2,9 %) izoliatai), pavasarį 11 (32,4 %) (kovą 2 (5,9 %), balandį 4 (11,8 %), gegužę 5 (14,7 %) izoliatai), vasarą 8 (23,5 %) (birželį 5 (14,7 %, liepą 2 (5,9 %), rugpjūtį 1 (2,9 %) izoliatai), o rudenį 12 (35,3 %) (rugsėjį 5 (14,7 %), spalį 6 (17,6 %), lapkritį 1 (2,9 %) izoliatai) izoliatų su VIM tipo karbapenemaze, tačiau šių izoliatų išauginimas nepriklausė nei nuo metų laiko ($p = 0,12$), nei nuo mėnesio. ($p = 0,289$). (10 paveikslas)



10 paveikslas. *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymas pagal mėnesius

3.3.3. *Pseudomonas* genties bakterijų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymo tarp skyrių įvertinimas

Dažniausiai VIM tipo karbapenemazė buvo nustatyta izoliatuose, gautuose iš reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriaus. VIM tipo karbapenemazės buvo nustatytos 19 (55,9 %) izoliatų. Šių izoliatų skaičius sudarė daugiau nei pusę visų nustatytų izoliatų su VIM tipo karbapenemaze. Mažiausiai izoliatų su VIM tipo karbapenemaze buvo nustatyta bendrosios hematologijos, hepatologijos ir gastroenterologijos, stacionarinės reabilitacijos ir kaulų čiulpų transplantacijos skyriuose. Šiuose skyriuose buvo nustatyta po vieną (2,9 %) izoliatą su VIM tipo karbapenemaze. *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymas skyriuose pateikiamas 25 lentelėje. Gauti mūsų tyrimo rezultatai sutampa su kitų autorių duomenimis. Apie karbapenemams atsparius ir VIM tipo karbapenemazę gaminančius *Pseudomonas* genties izolatus pranešama daugelyje Europos valstybių: Graikijoje, Švedijoje, Vokietijoje, Prancūzijoje, Italijoje, Ispanijoje, Bulgarijoje. Liakopoulos ir kitų, 2013 metais Graikijoje (69), Lin ir kitų, 2016 metais Taivane (64) ir Shirani ir kitų, 2016 metais Irane (70) atliktų tyrimų duomenimis *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatai su VIM tipo karbapenemaze dažniausiai išauginami intensyvios terapijos skyriuose, o pagal I. R. Gonçalves ir kitų, 2016 metais Brazilijoje atlikto tyrimo duomenis intensyvios terapijos skyrius yra reikšmingas rizikos veiksnys infekcijoms, kurias sukelia karbapenemams atsparios ir karbapenemazes gaminančios *Pseudomonas* genties bakterijos. (65)

25 lentelė. *Pseudomonas* genties izoliatų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymas skyriuose

Skyrius	Karbapenemazė
	VIM
Bendrosios hematologijos sk.	1 (2,9 %)
Chirurgijos sk.	11 (32,5 %)
Hepatologijos ir gastroenterologijos sk.	1 (2,9 %)
Kaulų čiulpų transplantacijos sk.	1 (2,9 %)
Reanimacijos ir intensyvios terapijos sk.	19 (55,9 %)
Stacionarinės reabilitacijos sk.	1 (2,9 %)
Viso	34 (%)

3.3.4. *Pseudomonas* genties bakterijų su VIM tipo karbapenemaze pasiskirstymo pagal tiriamąją medžiagą įvertinimas

Dažniausiai VIM tipo karbapenemazės buvo nustatytos izoliatuose iš šlapimo ir žaizdos eksudato. Iš šių tiriamųjų medžiagų buvo nustatyta po 10 (29,4 %) izoliatų. Po vieną (2,9 %) izoliatą su VIM tipo karbapenemaze nustatyta iš BAL skysčio, kvėpavimo takų, operacinės žaizdos, punktato ir kitos tiriamosios medžiagos. Iš bronchų aspirato nustatyti 4 (11,8 %), o iš išmatų 5 (17,7 %) izoliatai su VIM tipo karbapenemaze. (26 lentelė) Remiantis kitų autorių duomenimis VIM tipo karbapenemazę gaminantys *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatai dažniausiai išauginami iš šlapimo, kvėpavimo takų, žaizdų, pūlių, seilių. (64, 65, 68, 70) Mūsų tyrimo rezultatai rodo, jog VIM tipo karbapenemazę gaminantys *Pseudomonas* genties izoliatai reišmingai dažniau išauginami iš šlapimo ir žaizdų eksudato, o tai sutampa su kitų autorių duomenimis.

26 lentelė. *Pseudomonas* genties izoliatų gaminančių VIM tipo karbapenemazę pasiskirstymas pagal tiriamąją medžiagą

Tiriamoji medžiaga	Karbapenemazė
	VIM
BAL skystis	1 (2,9 %)
Bronchų aspiratas	4 (11,8 %)
Išmatos	5 (17,9 %)
Kita	1 (2,9 %)
Kvėpavimo takai	1 (2,9 %)
Operacinė žaizda	1 (2,9 %)
Punktatas	1 (2,9 %)
Šlapimas	10 (29,4 %)
Žaizdos eksudatas	10 (29,4 %)
Viso	34 (100 %)

3.3.5. Karbapenemazių negaminančių ir karbapenemazes gaminančių *Pseudomonas* genties bakterijų palyginimas

Tyrimė tirti 143 *Pseudomonas* genties izoliatai, atsparūs vienam arba keliems karbapenemams. Nustatyta, kad iš jų 34 izoliatai gamino VIM tipo karbapenemazę. Lyginant šias grupes matoma, kad abiejose grupėse izoliatai buvo išauginami dažniau vyrams (56,07 % negaminančių karbapenemazių grupėje ir 70,59 % gaminančių karbapenemazes grupėje) negu moterims. Vidutinis amžius tarp lyginamų grupių nesiskyrė ($p = 0,678$). Reikšmingi skirtumai tarp grupių nustatyti vertinant izoliatų atsparumą imipenemui ($p = 0,037$) ir meropenemui ($p = 0,02$), taip pat pasiskirstymą pagal tiriamąją medžiagą ($p = 0,044$) ir skyrių ($p < 0,0001$). (27 lentelė) Vertinant tirtos populiacijos epidemiologines charakteristikas, matyti, kad pacientai infekuoti su karbapenemams atspariomis *Pseudomonas* genties bakterijomis yra vyresnio amžiaus (vidutinis amžiaus siekia 60,69 metus), o šios bakterijos dažniausiai išaugintos iš šlapimo, kvėpavimo takų ir žaizdos eskudato. Lyginant nustatytą amžių su kitų autorių atliktų tyrimų rezultatais (63, 64, 65), taip pat matyti, kad karbapenemams atspariomis *Pseudomonas* genties bakterijomis yra kolonizuoti vyresnio amžiaus asmenys, tačiau vyresnis amžius nėra siejamas kaip reikšmingas infekcijos rizikos veiksnys. Vyresnį amžių ir tokią kolonizaciją turbūt galima sieti su susilpnėjusia imunine sistema. Šiame tyrime trečdalis visų pacientų (26,06 %) buvo reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriuje, o karbapenemazes gaminančių grupėje tokie pacientai sudarė daugiau nei pusę visų tiriamųjų. Remiantis kitų autorių tyrimais reanimacijos ir intensyvios terapijos skyrius yra reikšmingas rizikos veiksnys infekcijai, kurią lemia karbapenemams atsparios *Pseudomonas* genties bakterijos. (65) Šis karbapenemams atsparių *Pseudomonas* genties bakterijų pasiskirstymas rodo, jog reikia stiprinti plitimo sekimą ir imtis prevencinių priemonių ligoninės skyriuose.

27 lentelė. Karbapenemams atsparių *Pseudomonas* genties izoliatų charakteristikos

Charakteristikos	Izoliatų skaičius			<i>p</i> reikšmė
	Viso	Negamina karbapenemazių	Gamina karbapenemazes	
Lytis				0,133
Vyras	84 (59,57 %)	60 (56,07 %)	24 (70,59 %)	
Moteris	57 (40,43 %)	47 (43,93 %)	10 (29,41 %)	
Amžius	60,69 ± 17,37	60,15 ± 18,06	62,38 ± 15,09	0,678
Atsparumas karbapenemams				
Imipenemui				0,037
Atsparu	125 (90,58 %)	91 (87,5 %)	34 (100 %)	
Vidutiniškai jautru	13 (9,42 %)	13 (12,5 %)	0 (0 %)	
Meropenemui				0,002
Atsparu	116 (83,45 %)	84 (78,5 %)	32 (100 %)	
Vidutiniškai jautru	23 (16,55 %)	23 (21,5 %)	0 (0 %)	
Tiriamoji medžiaga				0,044
Iš trofinės opos	11 (7,68 %)	11 (100 %)	0 (0 %)	
Išmatos	19 (13,29 %)	14 (73,68 %)	5 (26,32 %)	
Kraujas	7 (4,9 %)	7 (100 %)	0 (0 %)	
Kvėpavimo takai	32 (22,38 %)	26 (81,25 %)	6 (18,75 %)	
Šlapimas	29 (20,28 %)	19 (65,52 %)	10 (34,48 %)	
Žaizdos eksudatas	28 (19,58 %)	17 (60,71 %)	11 (39,29 %)	
Kita	17 (11,89 %)	15 (88,24 %)	2 (11,76 %)	
Skyrius				<0,0001
Reanimacijos ir intensyvios terapijos sk.	37 (26,06 %)	18 (48,65 %)	19 (51,35 %)	
Kiti skyriai	105 (73,94 %)	90 (85,71 %)	15 (14,29 %)	

IŠVADOS

1. Atlikus mokslo publikacijų duomenų bazėse analizę, genetiniam tyrimui parinkti karbapenemazių genai, labiausiai paplitę Europoje: *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{IMP}*, *bla_{GIM}*.
2. Parinktą TL-PGR protokolą su *TaqMan* zondais galima naudoti karbapenemazių genų nustatymui.
3. Atliktas *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties izoliatų tipavimas pagal parinktus karbapenemazių genus parodė, kad bendras karbapenemazių genų dažnis VUL Santaros klinikose siekia 13,31 % visuose tirtuose izoliatuose, o tai rodo, jog karbapenemazių genai nėra plačiai paplitę VUL Santaros klinikose.
4. Taikant statistinės analizės metodus VUL Santaros klinikose nustatytas *bla_{NDM}* geno paplitimas siekia 1,52 %, *bla_{VIM}* – 23,78 %, o *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}* ir *bla_{OXA-48}* genų paplitimas siekia 0 %. Toks skirtingų karbapenemazių genų paplitimas rodo, jog VUL Santaros klinikose išaugintų izoliatų atsparumas karbapenemams yra nulemtas kitų atsparumo mechanizmų.

SANTRAUKA

Karbapenemazių genų tyrimas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu

Karbapenemazės arba kitaip β -laktamazės yra fermentai, kurie hidrolizuoja penicilinus, cefalosporinus, taip pat karbapenemus ir monobaktamus – svarbiausius šiais laikais naudojamus antibakterinius vaistus prieš bakterines infekcijas. Karbapenemams atsparių gram-neigiamų bakterijų paplitimas auga visame pasaulyje ir kelia vis didesnę grėsmę visuomenės sveikatai. Ši problema siejama su labiausiai paplitusiais žmogaus patogenais, atsakingais už daugumą visuomeninių ir hospitalinių infekcijų – *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. ir *Acinetobacter* spp. Didėjantis karbapenemų naudojimas ligų gydymui, kurias sukėlė šios bakterijos, gaminančios plataus spektro β -laktamazės, lėmė karbapenemazes gaminančių patogenų selekciją ir plitimą. Per pastaruosius metus karbapenemazes gaminančios bakterijos išplito beveik visuose pasaulio regionuose.

Bakterijos, gaminančios karbapenemazes, gali hidrolizuoti beveik visus β -laktامينius antibiotikus, o genai, koduojantys atsparumą, perduodami su plazmidėmis tarp skirtingų bakterijų rūšių. Šie genai randami daugelyje dauginiu atsparumu pasižyminčių izoliatų. Tokių izoliatų aptikimas iš klinikinės medžiagos pirmiausia prasideda nuo kruopšios atrankos pagal sumažėjusį jautrumą karbapenemams. Po to atliekami biocheminiai karbapenemazių gamintojų identifikacijos testai. Galiausiai karbapenemazės geno identifikacijai pasitelkiami molekuliniai metodai, kurie išlieka aukšniais standartais karbapenemazių genų nustatymui.

Šio darbo tikslas - sukurti tikro laiko PGR metodu paremtą tyrimo protokolą karbapenemazes koduojančių genų (*bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*) paplitimo nustatymui VUL Santaros klinikose iš Mikrobiologijos laboratorijoje išaugintų ir karbapenemams atsparių *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties klinikiinių izoliatų. *Bla_{GIM}* genas koduoja German imipenemazę, *bla_{IMP}* – imipenemazę, *bla_{KPC}* – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazę, *bla_{NDM}* – Naujojo Delio metalo- β -laktamazę, *bla_{OXA-48}* – karbapenemus hidrolizuojančią oksacilinazę, o *bla_{VIM}* genas koduoja Verona integrono koduojamą metalo- β -laktamazę.

Darbe ištirta 120 *Enterobacteriaceae* šeimos ir 143 *Pseudomonas* genties izoliatų, atitinkančių potencialių karbapenemazių gamintojų kriterijus pagal atsparumą karbapenemams. Tipavimas buvo atliekamas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu su *TaqMan* zondais.

Tyrimo rezultatai parodė, kad sukurtas TL-PGR protokolai su *TaqMan* zondais yra tinkamas karbapenemazių genų nustatymui. Taikant statistinės analizės metodus nustatyta, kad VUL Santaros klinikose *bla_{NDM}* geno paplitimas siekia 1,52 %, o *bla_{VIM}* – 23,78 %. *Bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*,

bla_{KPC} ir *bla_{OXA-48}* genų paplitimas siekia 0 %. Nors karbapenemazės yra pagrindinis atsparumo antibiotikams mechanizmas bakterijose, tačiau šio tyrimo rezultatai rodo, kad tik dalis izoliatų pasižymi karbapenemazių gamyba. Kitų tirtų *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties bakterijų izoliatų atsparumas karbapenemams turėtų būti siejamas su kitais atsparumo mechanizmais, tokiais kaip išmetimo pompos, porinai ar mutacijos, pakeičiančios peniciliną surišančių baltymų raišką ir funkcijas.

Raktiniai žodžiai: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* gentis, karbapenemazes koduojantys genai

SUMMARY

Investigation of Carbapenemase Genes by Real-Time Polymerase Chain Reaction

Method

Carbapenemases also known as β -lactamases are ferments that hydrolyze penicillins, cephalosporins, also, carbapenems and monobactams – nowadays the most important antibacterial pharmaceuticals against bacterial infections. The prevalence of Gram-negative bacteria, which is resistant to carbapenems, is growing around the world and causing more and more threat to the public health. This problem is related with the most common human pathogens which are responsible for majority of the public and nosocomial infections - *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. The increasing use of carbapenems for the treatment of diseases, which were caused by these bacteria, resulted the selection and spreading of the pathogens that produce carbapenemases. In the past year, the carbapenemase-producing bacteria spread in almost all regions of the world.

Bacteria that produce carbapenemases can hydrolyze almost all β -lactam antibiotics, and the genes encoding resistance, are transferred with plasmid between different species of bacteria. These genes are found in a lot of multiple resistance characterized isolates. Detection of such isolates from clinical material first of all starts from careful selection according to decreased sensitivity to carbapenems. After, there are made biochemical identification tests of the carbapenemases producers. In the end, the molecular methods are invoked for the carbapenemase gene identification, which remain the gold standards for the identification of carbapenemase genes.

The aim of this work was to create the research protocol, based on real time PCR method of carbapenemase encoding genes (*bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{VIM}*) and evaluate these genes prevalence in VUH Santaros clinics from carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* family and *Pseudomonas* genus clinical isolates, who were grown in the Microbiology laboratory. *Bla_{GIM}* gene encodes German imipenemase, *bla_{IMP}* – imipenemase,

bla_{KPC} – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *bla_{NDM}* – New Delhi metallo- β -lactamase, *bla_{OXA-48}* – carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, and *bla_{VIM}* – Verona integron-encoded metallo- β -lactamase.

In the thesis were investigated 120 *Enterobacteriaceae* family and 143 *Pseudomonas* genus clinical isolates that correspondent the criteria of potential Carbapenemases producers according to the resistance to carbapenems. Typing was made by polymerase chain reaction method with *TaqMan* probes.

The study shows that created TL-PGR protocol with *TaqMan* probes were suitable for detection of carbapenemase genes. According to the methods of statistical analysis it was assessed that the prevalence of *bla_{NDM}* gene of VUH Santaros clinics reaches 1,52 %, and *bla_{VIM}* – 23,78 %. The prevalence of *bla_{GIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}* and *bla_{OXA-48}* genes reaches 0 %. Although, carbapenemases are the main resistance mechanism to antibiotics in the bacteria, however, this research results show that only the part of isolates are characterized by production of carbapenemases. The resistance to carbapenems of other investigated *Enterobacteriaceae* family and *Pseudomonas* genus clinical isolates should be related with other resistance mechanisms such as efflux pumps, porins or mutations which change the expression and functions of the penicillin binding proteins.

Key words: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* genus, carbapenemase encoding genes

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. TÄNGDEN, T.; ir GISKE, C.G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. In *Journal of Internal Medicine* [interaktyvus]. 2015, vol. 277, no. 5 [žiūrėta 2017 m. kovo 23 d.], p. 501-512.
2. KAUR, M., GUPTE, S., ir KAUR, T. Clinical importance of carbapenemase production in gram-negative bacteria. In *Journal of tropical diseases* [interaktyvus]. 2015, vol. 3, no. 3 [žiūrėta 2017 m. balandžio 11 d.].
3. TZOUVELEKIS, L.S., *et al.* Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In *Clinical Microbiology and Infection* [interaktyvus]. 2014, vol. 20 [žiūrėta 2017 m. balandžio 11 d.], p. 862-872.
4. NORDMANN, Patrice; ir POIREL Laurent. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2013, vol. 68, no. 3 [žiūrėta 2017 m. kovo 23 d.], p. 487-489.

5. PAVELKOVICH, A., *et al.* Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in the Baltic Countries and St. Petersburg Area. In *BioMed Research International* [interaktyvus]. 2014, vol. 2014 [žiūrėta 2016 m. gegužės 20 d.].
6. MIKUČIONYTĖ, G., *et al.* Nosocomial dissemination of VIM-2-producing ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Lithuania. In *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2016, vol. 35, no. 2 [žiūrėta 2017 m. balandžio 7 d.], p. 195-200.
7. WATABABE, M., *et al.* Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 1991, vol. 35, no. 1 [žiūrėta 2016 m. vasario 5 d.], p. 147-151.
8. PATON, R., *et al.* ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. In *International Journal of Antimicrobial Agents* [interaktyvus]. 1993, vol. 2, no. 2 [žiūrėta 2016 m. vasario 5 d.], p. 81-87.
9. YIGIT, H., *et al.* Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2001, vol. 45, no. 4 [žiūrėta 2016 m. vasario 5 d.], p. 1151-1161.
10. CANTON, R., *et al.* Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. In *Clinical Microbiology and Infection* [interaktyvus]. 2012, vol. 18, no. 5 [žiūrėta 2016 vasario 5 d.], p. 413-431.
11. QUEENAN, A.M.; ir BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. In *Clinical Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2007, vol. 20, no. 3 [žiūrėta 2016 m. vasario 6 d.], p. 440-458.
12. CORNAGLIA, G; GIAMARELLOU, H; ir ROSSOLINI, G.M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? In *The Lancet Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2011, vol. 11, no. 5 [žiūrėta 2016 m. vasario 9 d.], p. 381-393.
13. OSANO, E. *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 1994, vol. 38, no. 1 [žiūrėta 2016 m. vasario 9 d.], p.71-78.
14. LAURETTI, L., *et al.* Cloning and Characterization of *bla_{VIM}*, a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 1999, vol. 43, no. 7 [žiūrėta 2016 m. vasario 9 d.], p. 1584-1590.

15. MIRIAGOU, V., *et al.* *Escherichia coli* with a Self-Transferable, Multiresistant Plasmid Coding for Metallo- β -Lactamase VIM-1. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2003, vol. 47, no. 1 [žiūrėta 2016 m. vasario 15 d.], p. 395-397.
16. SCOULICA, E.V., *et al.* Spread of *bla*_{VIM-1}-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the *bla*_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene. In *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [interaktyvus]. 2004, vol. 48, no. 3 [žiūrėta 2016 m. vasario 16 d.], p. 167-172.
17. GIAKKOUPIS, P., *et al.* VIM-1 Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals. In *Journal of Clinical Microbiology* [interaktyvus]. 2003, vol. 41, no. 8 [žiūrėta 2016 m. vasario 16 d.], p. 3893-3896.
18. POIREL, L., *et al.* Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron-Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2000, vol. 44, no. 4 [žiūrėta 2016 m. kovo 2 d.], p. 891-897.
19. YONG, D., *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2009, vol. 53, no. 12 [žiūrėta 2016 m. kovo 2 d.], p. 5046-5054.
20. KUMARASAMY, K.K., *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. In *The Lancet Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2010, vol. 10, no. 9 [žiūrėta 2016 m. kovo 2 d.], p. 597-602.
21. ROLAIN, J.M; PAROLA, P; ir CORNAGLIA, G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? In *Clinical Microbiology and Infection* [interaktyvus]. 2010, vol. 16, no. 12 [žiūrėta 2016 m. kovo 2 d.], p. 1699-1701.
22. MUNOZ-PRICE, L.S., *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. In *The Lancet Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2013, vol. 13, no. 9 [žiūrėta 2016 m. kovo 18 d.], p. 785-796.
23. JEON, J. H., *et al.* Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. In *International Journal of Molecular Sciences* [interaktyvus]. 2015, vol. 16, no. 5 [žiūrėta 2016 m. kovo 18 d.], p. 9654-9692.
24. DOCQUIER, J.D; ir MANGANI, S. Structure-Function Relationships of Class D Carbapenemases. In *Current Drug Targets* [interaktyvus]. 2016, vol. 17, no. 9 [žiūrėta 2017 m. sausio 3 d.], p. 1061-1071.

25. STOKES, H.W; ir GILLINGS, M.R. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. In *FEMS Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2011, vol. 35, no. 5 [žiūrėta 2016 m. balandžio 25 d.], p. 790-819.
26. YU, Y.S., *et al.* First isolation of *bla_{IMI-2}* in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2006, vol. 50, no. 4 [žiūrėta 2016 m. balandžio 25 d.], p. 1610-1611.
27. NORDMANN, P; NAAS, T; ir POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In *Emerging Infectious diseases* [interaktyvus]. 2011, vol. 17, no. 10 [žiūrėta 2016 m. balandžio 25 d.].
28. NORDMANN, P; CUZON, G; ir NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. In *The Lancet Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2009, vol. 9, no. 4 [žiūrėta 2016 m. balandžio 25 d.], p. 228-236.
29. PAPP-WALLACE, K.M., *et al.* Carbapenems: Past, Present, and Future. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2011, vol. 55, no. 11 [žiūrėta 2016 m. gegužės 15 d.], p. 4943-4960.
30. PAPP-WALLACE, K.M., *et al.* Carbapenems: Past, Present, and Future. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2011, vol. 55, no. 11 [žiūrėta 2016 m. gegužės 15 d.], p. 4943-4960.
31. MARTINEZ-MARTINEZ, L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. In *Clinical Microbiology and Infection* [interaktyvus]. 2008, vol. 14, no. 1 [žiūrėta 2016 m. gegužės 15 d.], p. 82-89.
32. MEROUEH, S.O., *et al.* Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [interaktyvus]. 2006, vol. 21, no. 12 [žiūrėta 2016 m. gegužės 15 d.], p. 4404-4409.
33. HASHIZUME, T., *et al.* Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E.coli*. In *The Journal of Antibiotics* [interaktyvus]. 1984, vol. 37, no. 4 [žiūrėta 2016 m. gegužės 15 d.], p. 394-400.
34. VAN DAM, V; OLRICHS, N; ir BREUKINK, E. Specific labelin of peptidoglycan precursors as a tool for bacterial cell wall studies. In *ChemBiochem* [interaktyvus]. 2009, vol. 10, no. 4 [žiūrėta 2016 m. gegužės 15 d.], p. 617-624.

35. KATAYAMA, Y; ZHANG, H.Z; ir CHAMBERS, H.F. PBP 2a mutations producing very-high-level resistance to β -lactams. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2004, vol. 48, no. 2 [žiūrėta 2016 m. gegužės 16 d.], p. 453-459.
36. MATSUMOTO, A., *et al.* The emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and host risk factors for carriage of drug-resistant genes in northeastern Japan. In *Japanese Journal of Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2007, vol. 60, no. 1 [žiūrėta 2016 m. gegužės 16 d.], p. 10-13.
37. NORDMANN, P., *et al.* Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2011, vol. 66, no. 5 [žiūrėta 2016 m. gegužės 16 d.], p. 1070-1078.
38. PEARSON, J.P; VAN DELDEN, C; ir IGLEWSKI, B.H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. In *Journal of Bacteriology* [interaktyvus]. 1999, vol. 181, no. 4 [žiūrėta 2016 m. gegužės 16 d.], p. 1203-1210.
39. NORDMANN, P; NAAS, T; ir POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In *Emerging Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2011, vol. 17, no. 10 [žiūrėta 2016 m. gegužės 20 d.], p. 1791-1798.
40. ALBIGER, B., *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. In *Eurosurveillance* [interaktyvus]. 2015, vol. 20, no. 45 [žiūrėta 2016 m. gegužės 20 d.].
41. POVILONIS, J., *et al.* Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuania hospitals. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2013, vol. 68, no. 5 [žiūrėta 2016 m. gegužės 20 d.], p. 1000-1006.
42. PAVELKOVICH, A., *et al.* Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in the Baltic Countries and St. Petersburg Area. In *BioMed Research International* [interaktyvus]. 2014, vol. 2014 [žiūrėta 2016 m. gegužės 20 d.].
43. NACIONALINĖ VISUOMENĖS SVEIKATOS LABORATORIJA. Dauginiu atsparumu pasižyminčių bakterijų stebėsenos ataskaita ir kraujo ir galvos ir (ar) nugaros smegenų skysčio pasėliuose stebimų bakterijų atsparumo antimikrobiniams vaistams ataskaita. 2014, 2015, [žiūrėta 2016 m. gegužės 20 d.].
44. NORDMANN, P., *et al.* Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In *Clinical Microbiology and Infection* [interaktyvus]. 2012, vol. 18, no. 5 [žiūrėta 2016 m. gegužės 20 d.], p. 432-438.

45. YAN, J.J., *et al.* Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2001, vol. 45, no. 8 [žiūrėta 2016 m. gegužės 21 d.], p. 2224-2228.
46. MONTEIRO, J., *et al.* Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2012, vol. 67, no. 4 [žiūrėta 2016 m. gegužės 26 d.], p. 906-909.
47. NAAS, T., *et al.* Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. In *Journal of Clinical Microbiology* [interaktyvus]. 2011, vol. 49, no. 4 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 6 d.], p. 1608-1613.
48. QUEENAN, A.M; ir BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. In *Clinical Microbiology Reviews* [interaktyvus]. 2007, vol. 20, no. 3 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 6 d.], p. 440-458.
49. ELLINGTON, M.J., *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2007, vol. 59, no. 2 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 7 d.], p. 321-322.
50. DALLENNE, C., *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2010, vol. 65, no. 3 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 7 d.], p. 490-495.
51. VOETS, G.M., *et al.* A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. In *International Journal of Antimicrobial Agents* [interaktyvus]. 2011, vol. 37, no. 4 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 7 d.], p. 356-359.
52. ENDIMIANI, A., *et al.* Rapid identification of *bla*_{KPC}-possessing *Enterobacteriaceae* by PCR/electrospray ionization-mass spectrometry. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2010, vol. 65, no. 5 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 10 d.], p. 1833-1834.
53. MENDES, R.E., *et al.* Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and meltcurve analysis. In *Journal of Clinical Microbiology* [interaktyvus]. 2007, vol. 45, no. 2 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 11 d.], p. 544-547.

54. POIREL, L., *et al.* Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. In *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [interaktyvus]. 2011, vol. 70, no. 1 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 20 d.], p. 119-123.
55. CHEN, L., *et al.* Multiplex real-time PCR for detection of an epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumonia* ST258 clone. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [interaktyvus]. 2012, vol. 56, no. 6 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 20 d.], p. 3444-3447.
56. MONTEIRO, J., *et al.* Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [interaktyvus]. 2012, vol. 67, no. 4 [žiūrėta 2016 m. rugsėjo 21 d.].
57. KASNAUSKIENĖ, Jūratė. *Viso žmogaus genomo analizės metodai*. Vilnius: Vilniaus universitetas, 2014. 78-82 p. ISBN 978-609-417-082-9.
58. MARIAPPAN, S; SEKAR, U; ir KAMALANATHAN, A. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. In *International Journal of Applied & Basic Medical Research* [interaktyvus]. 2017, vol. 7, no. 1 [žiūrėta 2017 m. balandžio 4 d.], p. 32-39.
59. SNITKIN, E.S., *et al.* Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. In *Science Translational Medicine* [interaktyvus]. 2012, vol. 4, no. 148 [žiūrėta 2017 m. balandžio 5 d.]. p. 116.
60. BARAN, I; ir AKSU, N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. In *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [interaktyvus]. 2016, vol. 15, no. 20 [žiūrėta 2017 m. balandžio 4 d.].
61. OKOCHE, D., *et al.* Prevalence and Characterization of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Mulago National Referral Hospital, Uganda. In *PloS One* [interaktyvus]. 2015, vol. 10, no. 8 [žiūrėta 2017 m. balandžio 6 d.].
62. MAGIORAKOS, A.P., *et al.* The rise of carbapenem resistance in Europe: just the tip of the iceberg? In *Antimicrobial Resistance & Infection Control* [interaktyvus]. 2013, vol. 2, no. 6 [žiūrėta 2017 m. balandžio 10 d.].
63. VANEGAS, J.M., *et al.* Similar Frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Producing KPC and VIM Carbapenemases in Diverse Genetic Clones at Tertiary-Care Hospitals in Medellín, Colombia. In *Journal of Clinical Microbiology* [interaktyvus]. 2014, vol. 52, no. 11 [žiūrėta 2017 m. balandžio 6 d.]. p. 3978-3986.
64. LIN, K.Y., *et al.* Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. In *Journal of Microbiology, Immunology*

- and Infection* [interaktyvus]. 2016, vol. 49, no. 1 [žiūrėta 2017 m. balandžio 7 d.], p. 52-59.
65. GONCALVES, I.R., *et al.* Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. In *Brazilian Journal of Microbiology* [interaktyvus]. 2017, vol. 48, no. 2 [žiūrėta 2017 m. balandžio 7 d.], p. 211-217.
66. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. In *Europeana Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)* [interaktyvus]. 2015, [žiūrėta 2017 metų balandžio 11 d.].
67. HONG, D.J., *et al.* Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. In *Infection & Chemotherapy* [interaktyvus]. 2015, vol. 47, no. 2 [žiūrėta 2017 m. balandžio 10 d.], p. 81-97.
68. ZAFER, M.M., *et al.* Dissemination of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* ST233 at tertiary care hospitals in Egypt. In *BMC Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2015, vol. 15, no. 1 [žiūrėta 2017 m. balandžio 10 d.], p. 122.
69. LIAKOPOULOS, A., *et al.* Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. In *BMC Infectious Diseases* [interaktyvus]. 2013, vol. 13, no. 505 [žiūrėta 2017 metų balandžio 10 d.].
70. SHIRANI, K; ATAELI, B; ir ROSHANDEL, F. Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency. In *Advanced Biomedical Research* [interaktyvus]. 2016, vol. 5, no. 1 [žiūrėta 2017 m. balandžio 10 d.], p. 124.

PADĖKA

Pirmiausia norėčiau padėkoti darbo vadovei dr. Silvijai Kiverytei už nuoseklų bei konstruktyvų vadovavimą atliekant magistro baigiamąjį darbą, patarimus, pagalbą ir vertingas pastabas.

Taip pat už pagalbą ir patarimus atliekant tiriamąjį darbą labai dėkoju dr. Maksim Bratčikov.

Nuoširdžiai dėkoju visam VUL Santaros klinikų LMC Mikrobiologijos laboratorijos kolektyvui už visokeriopą pagalbą.