

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

## **Karbapenemazių fenotipinis nustatymas masių spektrometrijos metodu**

Magistrantė: EVELINA GORBIKOVA \_\_\_\_\_

Darbo vadovas: dr. S. Kiverytė \_\_\_\_\_

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir

laboratorinės medicinos katedros vedėja hab. dr. prof. Z. A. Kučinskienė

leidžiama ginti \_\_\_\_\_

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2017 m., Vilnius

## TURINYS

SUTRUMPINIMAI IR PAAIŠKINIMAI .....	3
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	7
1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> šeimos mikroorganizmai .....	7
1.2. <i>Pseudomonas</i> genties bakterijos .....	7
1.3. Karbapenemai .....	8
1.4. Bakterijų atsparumo mechanizmai.....	11
1.5. Karbapenemazės .....	12
1.6. Karbapenemazes sintetinančių bakterijų epidemiologija .....	14
1.6.1. A klasės karbapenemazių geografinis paplitimas.....	14
1.6.2. B klasės karbapenemazių geografinis paplitimas.....	15
1.6.3. D klasės karbapenemazių geografinis paplitimas.....	16
1.6.4. <i>Pseudomonas</i> genties karbapenemazių geografinis paplitimas.....	18
1.7. Karbapenemazių nustatymo metodai.....	20
1.7.1. Mikrobiologiniai metodai su inhibitoriais .....	20
1.7.2. Modifikuotas <i>Hodge testas</i> .....	22
1.7.3. Kolorimetrinis metodas .....	22
1.7.4. Molekuliniai metodai.....	22
2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODIKA.....	28
2.1. Tyrimo medžiagos ruošimas .....	28
2.2. Tyrimo eiga .....	30
3. TYRIMO REZULTATAI .....	36
3.1. MALDI-TOF masių spektrų analizė .....	36
3.2. Preanaliziniai veiksniai .....	40
3.3. Pacientų duomenų analizė.....	43
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	47
IŠVADOS .....	50
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	51
Santrauka .....	55
Summary of Master's thesis .....	56
PRIEDAI.....	57

## SUTRUMPINIMAI IR PAAIŠKINIMAI

AIM – *Australian* imipenemazė

AmpC – C klasės cefalosporinazė

APBA – aminofenolborono rūgštis

BAL – bronchoalveolinis lavažas

CMY – cefamicenazė

DHP-I – dehidropeptidazė I

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DPA – dipikolio rūgštis

ECDC – Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis

ESBL – plataus veikimo spektro  $\beta$ -laktamazės

EUCAST – Europos antibakterinių jautrumo testų komitetas

EuSCAPE – Europos karbapenemazes produkuojančių enterobakterijų tyrimas

FIM – *Florence* imipenamazė

GES – *Guiana* plataus veikimo spektro

GIM – *German* imipenemazė

IMI – imipenemą hidrolizuojanti  $\beta$ -laktamazė

IMP – imipenemazė

KPC – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė

MALDI-TOF MS – iš matricos lazeriu desorbuojanti ir jonizuojanti lėkio trukmės masių spektrometrija (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*)

MHT – modifikuotas *Hodge testas*

MIK – mažiausia inhibuojanti koncentracija

MPPA – metalo- $\beta$ -laktamazes gaminantis *Pseudomonas aeruginosa*

MRSA – meticilinui atsparus *Staphylococcus aureus*

MSBL -  $\beta$ -laktamazių tyrimas masės spektrometrijos metodu

NDM – *New Delhi* metalo- $\beta$ -laktamazė

NMC – nemetalokarbapenemazė

OXA – oksaciliną hidrolizuojantis

PBP – peniciliną sujungiantis baltymas

PGR – polimerazės grandininė reakcija

RITS – reanimacijos ir intensyvios terapijos skyrius

SFC-1 – *Serratia fonticola* karbapenemazė

SME – *Serratia marcescens* karbapenemazė

SPM – *Sao Paulo* metalo- $\beta$ -laktamazė

SS – standartinis tirpiklis

VIM – *Verona integron-encoded* metalo- $\beta$ -laktamazė

VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos

## IVADAS

Bakterijų dauginio atsparumo antibiotikams problema aktuali ne tik daugelyje pasaulio šalių, bet ir Lietuvoje [2, 5, 10, 11, 33]. Antibakterinis gydymas sparčiai tobulėja, tačiau nepaisant mokslo pažangos, vis dar didelį pavojų žmogaus sveikatai kelia multirezistentiškos gramneigiamos bakterijos. Daugiausiai komplikacijų patiria ligoniai, kurių imuninė sistema yra nusilpusi. Netinkamų antibiotikų vartojimas ir duomenų stoka apie infekcijų sukėlėjus lemia neefektyvų gydymą [2, 10, 38].

Šiuo metu daugiausia dėmesio skiriama tokioms bakterijų rūšims: meticilinui atspariam *Staphylococcus aureus* (MRSA) (sukelia net iki 50% stafilokokų infekcijų); vankomicinui atspariam *Enterococcus* spp.; visoms *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijoms, atsparioms III kartos cefalosporinams ir karbapenemams bei gaminančioms plataus veikimo spektro  $\beta$ -laktamazės (ESBL); biochemiškai neaktyvioms lazdelėms (*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp.), atsparioms karbapenemų grupės antibakteriniams vaistams [2, 10, 33].

Iki šiol žinomi keli gramneigiamų lazdelių atsparumo mechanizmai: modifikuojamas vaistų taikinytis, gaminami deaktyvuojantys fermentai ( $\beta$ -laktamazės ir aminoglikozidus modifikuojantys fermentai), išorinės membranos baltymų pokyčiai, mažinantys pralaidumą antibiotikams [2].

Karbapenemazes produkuojančios enterobakterijos sparčiai plinta visame pasaulyje, nes sugeba horizontaliai (per specifines plazmidės arba transpozonus) perduoti genus, koduojančius šiuos fermentus [2, 19, 40]. Šiais laikais karbapenemai yra svarbiausi antibakteriniai vaistai, skirti gydyti dauginio atsparumo bakterijų sukeltas ligas [30, 40]. Tačiau, šių patogenų atsparumas taip pat siejamas su kitais antibiotikais: cefalosporiniais, chinolonais ir aminoglikozidais. Tokiu atveju, nelieka jokių vaistų ligų gydymui, o tai kelia didelę grėsmę pacientų sveikatai [1, 5, 19, 30, 40].

Mikrobiologijos laboratorijų vaidmuo infekcijų plitimo valdyme yra labai svarbus. Norint užkirsti tam kelią, svarbu teikti informaciją infekcinių ligų kontrolės skyriui apie epidemiologiškai svarbių mikroorganizmų išskirimą klinikinėje tiriamojoje medžiagoje. Taip pat analizuoti ir teikti ataskaitas apie išskirtus infekcinių ligų sukėlėjus ir jų jautrumą antibiotikams [11].

MALDI-TOF MS arba iš matricos lazeriu desorbuojanti ir jonizuojanti lėkio trukmės masių spektrometrija – yra naujas, plačiai mikrobiologijoje naudojamas metodas, skirtas identifikuoti bakterijas. Šis būdas pažangesnis už tradicinius bakterijų tyrimus, nes yra jautresnis, greitesnis, o rezultatai tikslesni [7, 8, 10, 20, 22, 36]. Neseniai sukurta nauja MALDI-TOF MS programinė įranga, galinti nustatyti karbapenemazių aktyvumą įvairiose bakterijose. Kol kas šis tyrimas nėra

taikomas diagnostikoje, nes tik kelios mokslininkų grupės jį taikė ir publikavo savo rezultatus. Šis metodas vis dar tobulinamas [13, 20, 36].

**Darbo tikslas:** nustatyti karbapenemazių aktyvumą masių spektrometrijos metodu *Pseudomonas* genties bakterijose, išskirtose VUL Santaros klinikų pacientams.

**Darbo uždaviniai:**

1. Ištirti atsparias karbapenemams *Pseudomonas* padermes masių spektrometru MALDI-TOF ir įvertinti karbapenemazių gamybą.
2. Atlikti palyginamuosius tyrimus su skirtingais karbapenemais (meropenemu ir ertapenemu).
3. Nustatyti masių spektrometrijos MALDI-TOF metodo privalumus ir trūkumus tiriant karbapenemazių aktyvumą *Pseudomonas* genties bakterijose.

**Padėka:** Nuoširdi padėka užsienio šalių mokslininkėms Ditte Find (Danija) ir Anastasia Pavelkovich (Estija) už aktyvų bendradarbiavimą, konsultacijas ir pagalbą atliekant tyrimą, o taip pat inžinieriui Giedriui Zolubai už programinės įrangos įdiegimą ir Lietuvos Laboratorinės Medicinos Draugijai už užsienyje vykusių apmokymų finansavimą.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. *Enterobacteriaceae* šeimos mikroorganizmai

*Enterobacteriaceae* šeimos bakterijos sudaro dalį žarnyno floros ir yra vieni dažniausių šlapimo takų, kraujo, pilvo organų, pneumonijų ir kitų hospitalinių infekcijų sukėlėjų [30, 34, 40]. Visuomenėje šios bakterijos plinta per nešvarias rankas, maistą ir vandenį [30, 40]. Dažniausiai užsikrečia vyresnio amžiaus pacientai, vartojantys imunosupresantus ir sergantys gretutinėmis ligomis (pavyzdžiui, cukriniu diabetu) [34].

Iš visų enterobakterijų *Serratia* spp. bakterijos yra labiausiai atsparios karbapenemams. Tai yra oportunistiniai patogenai, kurie gali išgyventi ekstremaliomis sąlygomis. Šie mikroorganizmai sintetina SME grupės  $\beta$ -laktamazes, kurios hidrolizuoja penicilinus, cefalosporinus ir karbapenemus [40].

## 1.2. *Pseudomonas* genties bakterijos

*Pseudomonas aeruginosa* yra oportunistinis patogenas, kurio genomai yra vienas iš didžiausių bakterijų genomų (nustatyta net 5567 genų) [27]. Manoma, kad dėl to šis mikroorganizmas yra labai adaptyvus, sugeba greitai prisitaikyti prie besikeičiančių aplinkos sąlygų keisdamas savo savybes ir išvystyti įvairius atsparumo mechanizmus. Dėl šios priežasties, įgytas *P. aeruginosa* atsparumas dažnai siejamas su aplinkos veiksniais (pavyzdžiui, cistinės fibrozės atveju, bakterijos kolonizuoja plaučius, todėl nuo antibiotikų jie apsaugoti polisacharido alginato sluoksniu, neleidžiančiu difunduoti vaistams) [21, 27]. Taip pat nustatyta, kad kuo didesnis bakterijų genomai, tuo didesnė tikimybė perduoti mutavusius genus kitiems mikroorganizmams [27].

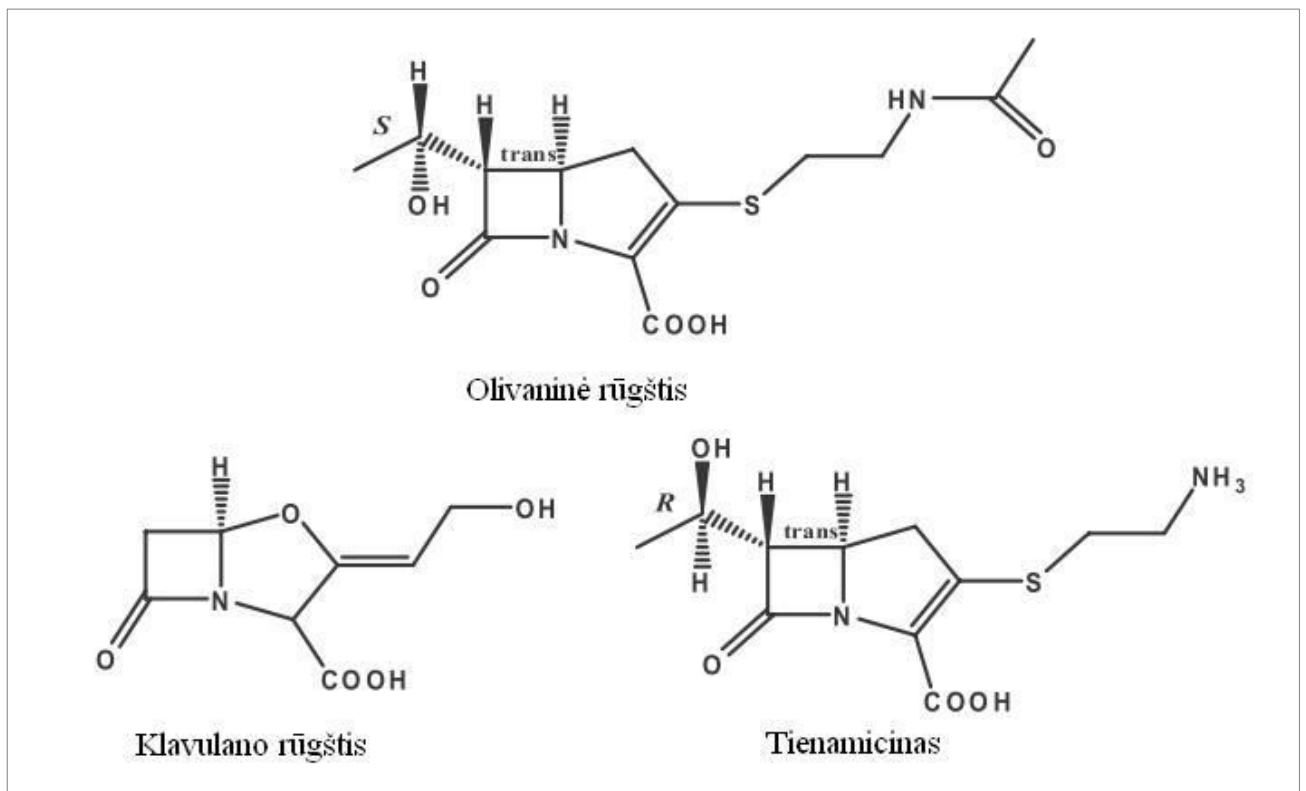
*P. aeruginosa* priklauso SPICE bakterijų grupei (*Serratia* spp., *P. aeruginosa*, indolo teigiamas *Proteus*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.). Visi šie mikroorganizmai sintetina chromosomose užkoduotas AmpC  $\beta$ -laktamazes, kurios hidrolizuoja daugelį  $\beta$ -laktamų ir nėra inhibuojamos  $\beta$ -laktamazių inhibitorių [27].

### 1.3. Karbapenemai

- Istorija

Pirmieji  $\beta$ -laktamazių inhibitoriai (olivaninės rūgštys) atrasti 1976 m. gramteigiamose bakterijose *Streptomyces clavuligerus* (1 pav.). Tačiau, šios rūgštys buvo chemiškai nestabilios ir silpnai įsiskverbėdavo į bakterijų ląsteles, todėl ieškota alternatyvių medžiagų. Netrukus atrasti dar du inhibitoriai: klavulano rūgštis (*S. clavuligerus*) ir tienamicinas (*S. cattleya*) (1 pav.) [33].

Klavulano rūgštis buvo pirmasis kliniškai prieinamas  $\beta$ -laktamazių inhibitorius, tuo tarpu tienamicinas – pirmasis natūralus karbapenemas, kuris tapo pavyzdžiu sintetinant kitus šios klasės antibiotikus. Tienamicinas atsparus daugeliui mikroorganizmų: gramteigiamoms ir gramneigiamoms bakterijoms, tokioms kaip *Streptococcus aureus* ir *Pseudomonas* spp., anaerobui *Bacteroides fragilis*. Deja, ši medžiaga nestabili vandeniniuose tirpaluose, reaktyvi nukleofilams (hidroksilaminui, cisteinui ir savo struktūroje esančiam pirminiam aminui), o taip pat jautri šarminei hidrolizei (pH >8). Šios tienamicino savybės privertė mokslininkus ieškoti chemiškai stabilesnių, bet panašaus veikimo karbapenemų [33].



1 pav. Pirmųjų  $\beta$ -laktamazių inhibitorių cheminė struktūra (Papp-Wallace *et al.*, 2011)



Anksčiausiai atrastas imipenemas, kuris 1985 m. tapo pirmuoju karbapenemu skirtu gydyti kompleksines bakterines infekcijas (2 pav.). Imipenemas bei panašios struktūros panipenemas labiau stabilūs ir mažiau jautrūs šarminei hidrolizei. Tačiau, šių karbapenemų vartojimas turi trūkumų: 1) juos deaktyvuoja inkstų sintetinamas fermentas dehidropeptidazė I (DHP-I); 2) antibiotikai turi būti vartojami kartu su inhibitoriais cilastinu arba betamipronu [17, 33].

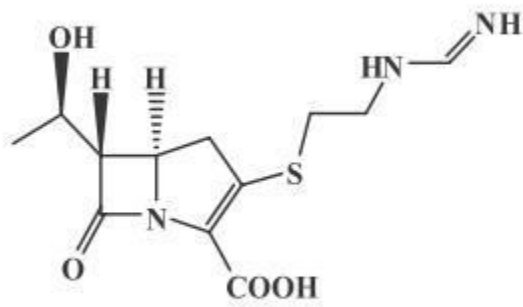
Nustatyta, kad prijungus metilo grupę 1- $\beta$  padėtyje, karbapenemai tampa atsparūs inkstų fermentui DHP-I. Tokiu būdu atrasta eilė kitų antibiotikų: meropenemas, biapenemas, ertapenemas ir doripenemas (2 pav.). Karbapenemų stabilumą ir atsparumą  $\beta$ -laktamazėms lemia  $\beta$ -laktamo žiedo *trans* konfigūracija prie C5 ir C6 anglies atomų [17, 33].

- **Veikimo mechanizmas**

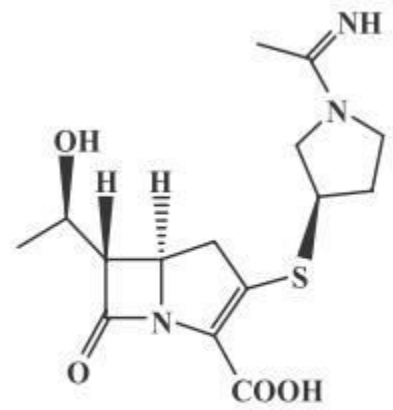
Visi karbapenemai sunkiai difunduoja, tad įsiskverbia į gramneigiamas bakterijas per išorinėje membranoje esančius baltymus porinus. Perėjus periplazminį tarpą, karbapenemai acilina peniciliną surišančius baltymus (PBP) – fermentus (transglikolazės, transpeptidazės, karboksipeptidazės), katalizuojančius peptidoglikano formavimąsi vidinėje bakterijų sienelėje. Taigi, pagrindinis karbapenemų veikimo mechanizmas pagrįstas jų savybe prisijungti prie kelių skirtingų PBP ir aktyvuoti bakterijų membranos autolizę [17, 28, 33].

Įvairūs karbapenemai skirtingai veikia bakterijas. Imipenemas, panipenemas ir doripenemas efektyvesni prieš gramteigiamas bakterijas, o meropenemas, biapenemas, ertapenemas ir doripenemas – prieš gramneigiamas bakterijas. Tačiau, tiriant įvairius karbapenemus ir jų poveikį mikroorganizmams, pastebėta, kad: 1) meropenemas mažiau efektyvus už imipenemą ir doripenemą kovojant su *Acinetobacter baumannii*; 2) doripenemas mažiausiai jautrus karbapenemazėms; 3) meropenemo ir klavulano rūgšties kombinacija veiksminga prieš multirezistentišką *Mycobacterium tuberculosis* [17, 28, 33].

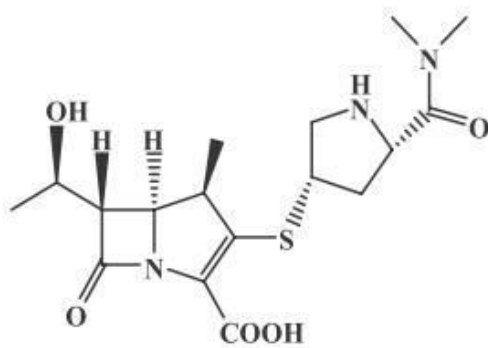
Karbapenemai gali būti vartojami kartu su kitais antibakteriniais vaistais. Kombinuota terapija vis dažniau taikoma gydant multirezistentiškų mikroorganizmų sukeltas infekcijas. Kai kurios kombinacijos turi teigiamą efektą, nes plėtėja antibiotikų veikimo spektras, tačiau dažnai atsitinka taip, jog mikroorganizmų atsparumas kaip tik padidėja [33].



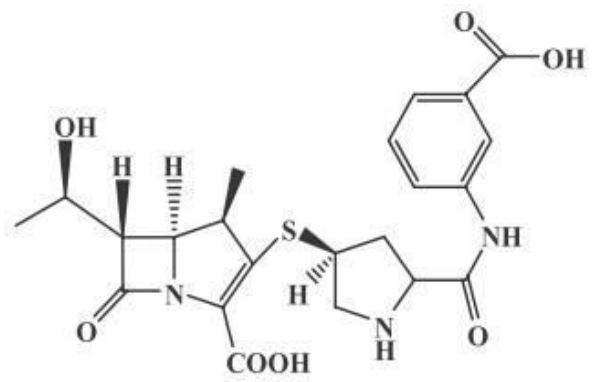
Imipenemas



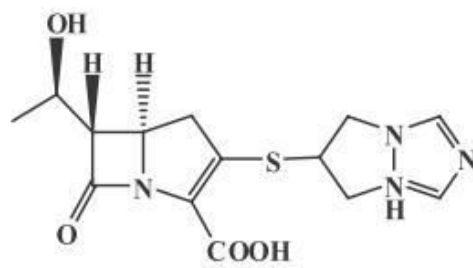
Panipenemas



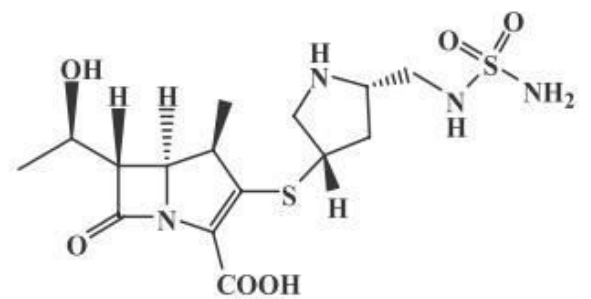
Meropenemas



Ertapenemas



Biapenemas



Doripenemas

2 pav. Kliniškai prieinami karbapenemai (Papp-Wallace *et al.*, 2011)

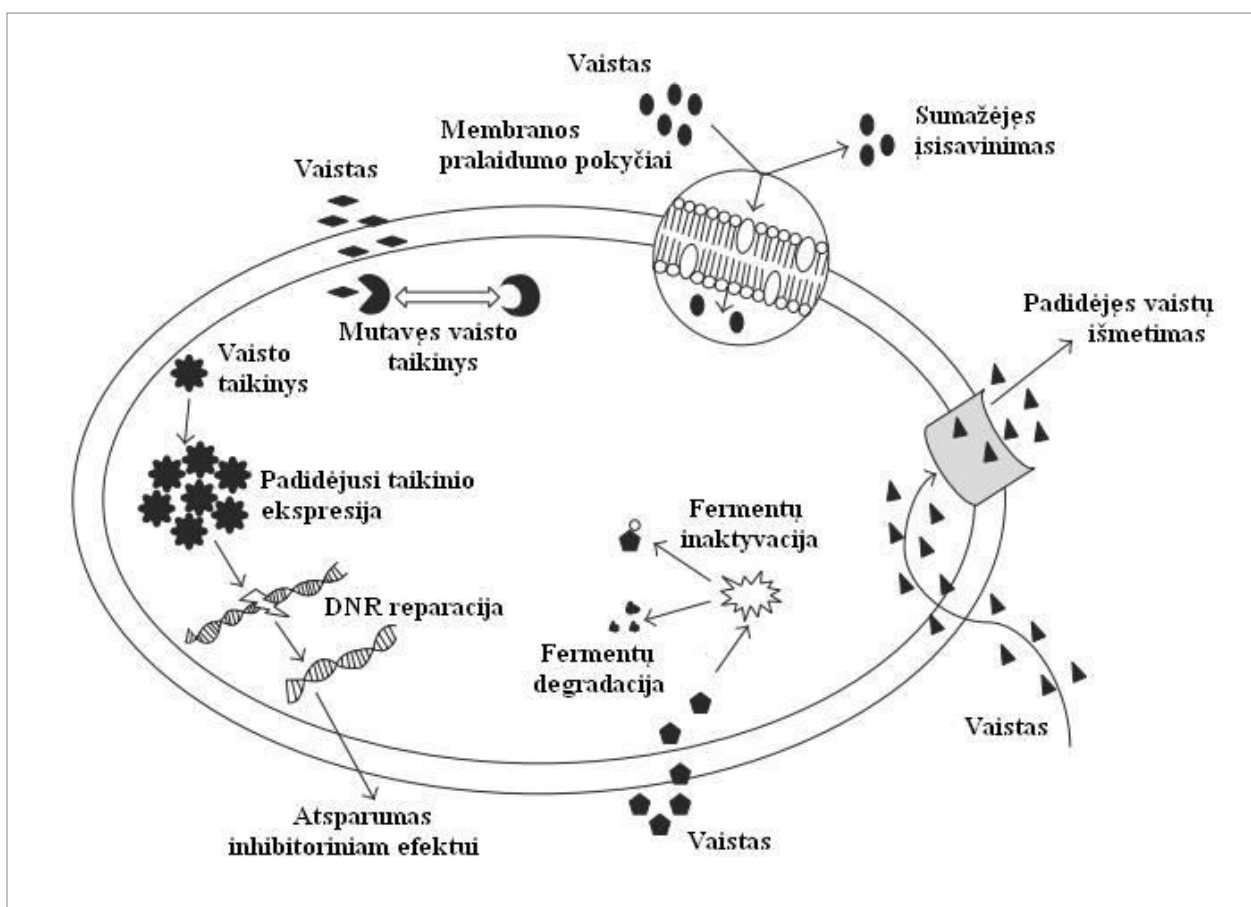
## 1.4. Bakterijų atsparumo mechanizmai

Atsparumą vaistams gali nulemti ne tik mutuojančios bakterijos, bet taip pat nusilpusi žmogaus imuninė sistema, sumažėjęs vaistų biologinis aktyvumas arba greitesnis vaistų metabolizmas. Pagal mikroorganizmų išgyvenamumą, paveikus juos antibiotikais, skiriami trys atsparumo tipai: pirminis, antrinis ir kliniškinis. Pirminis atsparumas reiškia pirmą patogeno susidūrimą su vaistu. Antrinis, kitaip dar vadinamas įgytu, pasireiškia po pakartotinio susidūrimo su antibiotiku. Šiuo atveju, atsparumas tik sustiprėja. Įgytas atsparumas klasifikuojamas į dvi mažesnes grupes: vidinis (dauginis atsparumas) ir plataus veikimo. Pirmajai grupei priklauso pirmo pasirinkimo antibiotikams atsparūs mikroorganizmai, o plataus veikimo spektro rezistentiškumas būdingas mikroorganizmams, atspariems mažiausiai vieno antibiotiko inhibitoriniam efektui. Kliniškinis bakterijų atsparumas išsivysto tik tam tikrose situacijose, kai patogenas veikiamas didesne vaisto doze nei įprastai [28, 38].

Pagrindiniai atsparumo karbapenemams mechanizmai yra  $\beta$ -laktamazių sintezė, antibiotiko išmetimo siurbliai ir mutacijos, keičiančios porinų ir PBP ekspresiją membranoje (3 pav.). Šie mechanizmai skirtingai pasireiškia skirtingose bakterijose. Pavyzdžiui, gramteigiamuose kokuose atsparumas karbapenemams susijęs su aminorūgščių sekų pokyčiais PBP arba naujų antibiotikams atsparių PBP gamyba.  $\beta$ -laktamazių ekspresija, porinų praradimas ir suaktyvėjusi išmetimo siurblių veikla membranose būdinga gramneigiamoms lazdelėms [17, 23, 33].

Ląstelės membrana yra viena svarbiausių bakterijų sudedamųjų dalių, kuri lemia jų išgyvenamumą. Įvairūs antibiotikai prisijungdami prie bakterijų membranoje esančio peptidoglikano, stabdo jos sintezę. Tačiau, rezistentiškų bakterijų chromosomos mutuoja, jos apsieičia nechromosominiais DNR elementais konjugacijos arba transformacijos būdu. Dėl to pakinta membranos struktūra, vaistų prisijungimo vietos, sumažėja jos pralaidumas ir vaistų difuzija į ląstelę (3 pav.) [17, 38].

Šiuo metu daugiausiai dėmesio skiriama atsparumui  $\beta$ -laktamazėms. Šio tipo atsparumas paremtas antibiotiko deaktyvavimu saugant  $\beta$ -laktamo žiedą.  $\beta$ -laktamo antibiotikų grupei priklauso skirtingos medžiagos: ampicilinas, piperacilinas, cefotaksimas, ceftazidimas, ertapenemas, imipenemas ir meropenemas. Tai dažniausiai naudojami antibakteriniai vaistai, kurie retai sukelia šalutinį poveikį ir pasižymi fiziologiniu suderinamumu [17, 29, 37]. Šių vaistų pagrindiniai taikiniai yra bakterijų periplazmos peptidoglikanų transpeptidazės. Antibiotikai negrįžtamai suardo šiuos fermentus ir tokiu būdu slopinama bakterijų sienelės sintezė [20, 23, 37].



3 pav. Bakterijų atsparumo karbapenems mechanizmai (Tanwar *et al.*, 2014)

Kitas atsparumo mechanizmas pagrįstas antibakterinių fermentų deaktyvacija hidrolizuojant esterinius arba amidinius ryšius, o taip pat chemiškai juos modifikuojant (acetilinant, fosforilinant, adenilinant, glikozilinant arba hidroksilinant). Dėl šios priežasties vaistai negali jungtis prie savo taikinių bakterijos viduje (3 pav.) [38].

## 1.5. Karbapenemazės

$\beta$ -laktamazės – tai bakterijų periplazmos fermentai ir pagrindiniai atsparumą lemiantys veiksniai. Šis atsparumo būdas pagrįstas  $\beta$ -laktamo antibiotikų hidrolize, dėl to vaistai nepasiekia savo taikinio – PBP [31, 33]. Karbapenemazės – tai  $\beta$ -laktamazių poklasis, hidrolizuojantys penicilinus, cefalosporinus, karbapenemus ir monobaktamus [11].

$\beta$ -laktamazės skirstomos į 4 klases pagal struktūros panašumus (A, B, C ir D) ir į 4 grupes pagal hidrolizines ir inhibitorines savybes (1, 2, 3 ir 4) [30, 32]. Nustatyta, kad A, C ir D klasių fermentų aktyviajame centre yra serinas, o B klasės –  $Zn^{2+}$  jonai. Daugelis A klasės  $\beta$ -laktamazių jautrios klavulano rūgščiai, o C ir D klasių fermentai – atsparūs. Tačiau, visos šios  $\beta$ -laktamazės deaktyvuojamos karbapenemų ir tai leidžia kurti vis naujus antibiotikus [17, 33, 35].

- **Karbapenemazių klasės**

Kai kurios A klasės karbapenemazės (IMI-1, SFC-1) užkoduotos chromosomose, o kitos (KPC, IMI-2, GES) – plazmidėse [26]. Išskirtinė A klasės karbapenemazių savybė yra disulfidinis ryšys tarp Cys69 ir Cys238 aminorūgščių liekanų. Ši jungtis keičia atstumą tarp aktyviojo centro elementų. Šios klasės fermentai (SME, NMC, IMI, KPC, GES) dažnai vadinami serino- $\beta$ -laktamazėmis [33]. A klasės karbapenemazes sintetinantys patogenai yra dauginio atsparumo, kurių sukeltos infekcijos sunkiai gydomos – pacientų mirtingumas siekia  $\geq 50\%$ . Jų atsparumas įvairiems karbapenemams varijuoja (labiausiai atsparūs ertapenemui) [30].

B klasės  $\beta$ -laktamazės aktyvuojamos per  $Zn^{2+}$  jonus ir pagal savo struktūrą bei aminorūgščių sekas skirstomos į tris grupes: B1, B2 ir B3. Įdomu tai, jog B1 ir B3 grupių fermentų aktyvumui reikalingi du cinko jonai, o B2 – vienas. Abiejų cinko jonų prisijungimas mažina B2  $\beta$ -laktamazių aktyvumą [33, 35]. Šios klasės fermentai (IMP, VIM, GIM, SPM, NDM) dažnai vadinami metalo  $\beta$ -laktamazėmis [30, 33]. Jie hidrolizuoja visus  $\beta$ -laktamus, išskyrus aztreonamą. Atsparumas įvairiems antibiotikams labai varijuoja, o pacientų mirtingumas svyruoja nuo 18% iki 67% [30].

C klasės  $\beta$ -laktamazės (CMY) retai priskiriamos karbapenemazės, nes didžioji jų dalis silpnai veikia karbapenemus [33, 35].

D klasės  $\beta$ -laktamazės (OXA- $\beta$ -laktamazės) silpnai hidrolizuoja karbapenemus ir plataus veikimo spektro cefalosporinus, tad jų hidrolizės reakcijos labiausiai skiriasi iš visų klasių [30]. OXA fermentai – labai heterogeniškos  $\beta$ -laktamazės, kurios yra įvairių atsparumo mechanizmų rezultatas. Dažniausios D klasės karbapenemazės yra OXA-48 ir OXA-181, kurios nėra inhibuojamos EDTA ir klavulano rūgštis [33, 35].

Kliniškai svarbiausi yra A klasės KPC tipo karbapenemazės. Jie hidrolizuoja visus  $\beta$ -laktamus, o juos inhibuoja borono rūgštis. Iš dalies jų aktyvumą mažina klavulano rūgštis ir tazobaktamas. Tačiau, didžiausias fermentinis aktyvumas būdingas B klasės  $\beta$ -laktamazėms. Tai

IMP, VIM ir NDM tipų karbapenemazės, kurios hidrolizuoja visus penicilinus, cefalosporinus ir karbapenemus. Joks inhibitorius (klavulano rūgštis, tazobaktamas ir sulbaktamas) jų neslopina [32].

## **1.6. Karbapenemazes sintetinančių bakterijų epidemiologija**

Manoma, kad pasaulyje plinta dvi šių mikroorganizmų epidemijos – viena iš jų susijusi su *Escherichia coli* sukeltomis infekcijomis, kuriomis užsikrečiama visuomenėje. Šios bakterijos daugiausiai sintetina NDM ir OXA-48 tipo karbapenemazes. Užkirsti kelią infekcijų plitimui yra sudėtinga, nes tai lemia daugelis veiksnių: higienos stoka, per didelis antibakterinių vaistų vartojimas ir vis dažnėjančios kelionės aplink pasaulį [4, 30].

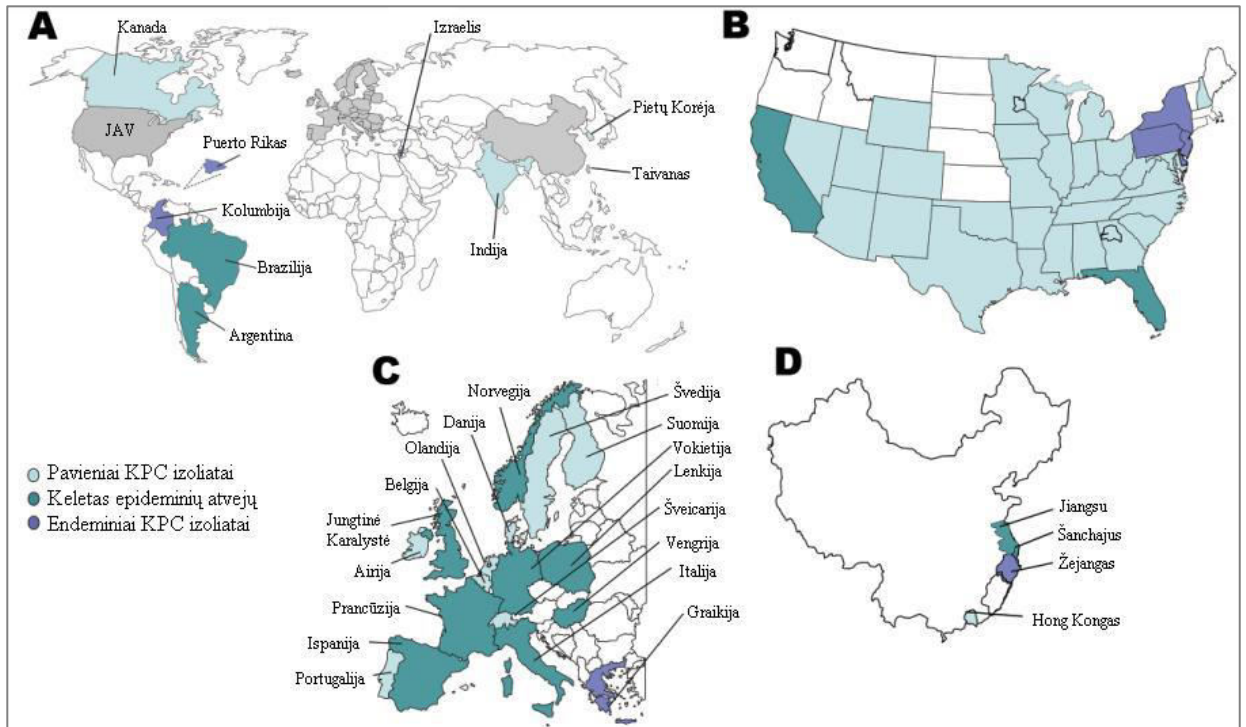
Antra epidemija susijusi su hospitalinių infekcijų sukėlėjais – *Klebsiella pneumoniae* bakterijomis. Per paskutiniuosius 30 metų, *K. pneumoniae* lėmė didžiausią ESBL genų plitimą sveikatos priežiūros įstaigose [30].

Endeminės *K. pneumoniae* padermės, sintetinančios VIM ir KPC, užfiksuotos ankstyvaisiais 2000 m. Graikijoje. Indijos regione ir Vidurio Rytuose didžiausią grėsmę kelia NDM karbapenemazės. OXA-48 tipo fermentai kol kas randami tik keliose Europos šalyse [11].

Karbapenemazių plitimas Europoje pastebėtas antroje XX am. pusėje. Iš pradžių, didžiausia grėsmė kilo Viduržemio regiono šalims (svarbiausias patogenas *P. aeruginosa*) [11]. Nuo 2000 m. *E. coli* bakterijos paplito visame pasaulyje. Jos sugebėjo hidrolizuoti visus cefalosporinus, išskyrus karbapenemus (imipenemą, ertapenemą, meropenemą ir doripenemą). Ilgainiui bakterijos įgijo atsparumą net ir šiems antibiotikams [30].

### **1.6.1. A klasės karbapenemazių geografinis paplitimas**

*Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė (KPC) yra geriausiai žinomas A klasės fermentas [30]. Pirmą kartą jis buvo atrastas 1996 m. rytinėje Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) dalyje [5]. Po kelių metų KPC sintetinančios bakterijos globaliai paplito – jos rastos Puerto Rikoje, Kolumbijoje, Graikijoje, Izraelyje ir Kinijoje. Kiek vėliau gauti duomenys apie *K. pneumoniae* iš įvairių Europos šalių ir Pietų Amerikos (4 pav.) [30].

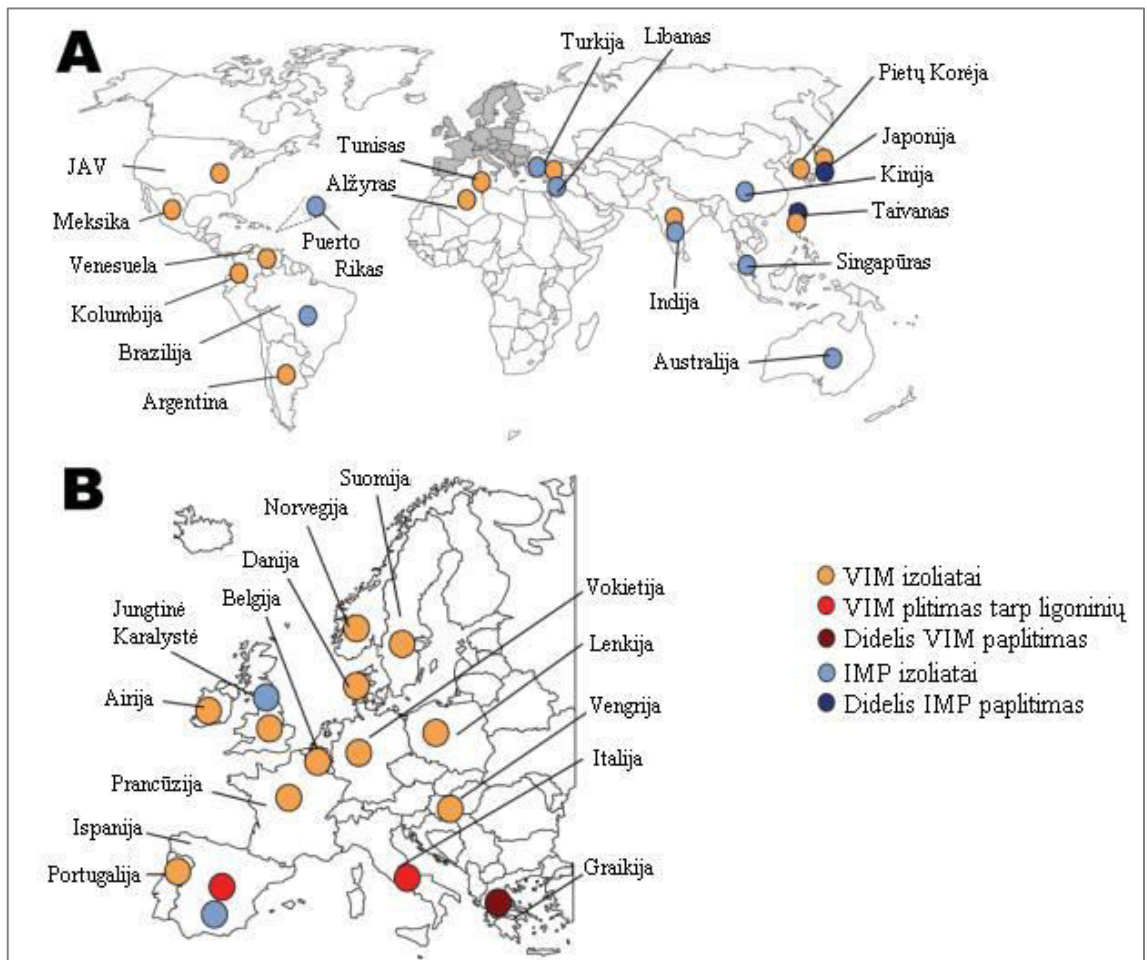


4 pav. *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazių (KPC) paplitimas pasaulyje (A), Jungtinėse Amerikos Valstijose (B), Europoje (C), Kinijoje (D) (Nordmann *et al.*, 2011)

### 1.6.2. B klasės karbapenemazių geografinis paplitimas

Japonijoje, 1991 m. tiriant *Serratia marcescens* bakterijas, atrastas pirmasis IMP-1 karbapenemazių tipas. Ilgainiui įvairūs VIM grupės fermentai tapo endeminiais Graikijoje, o IMP – Taivane ir Japonijoje (5 pav.) [4]. Atskiri bakterijų izoliatai užfiksuoti daugelyje Europos šalių, JAV, Pietų Amerikoje, Afrikoje ir Australijoje. VIM sintetinančių bakterijų plitimas tarp ligoninių nustatytas tik Ispanijoje ir Italijoje [30].

Šiuo metu didžiausias dėmesys skiriamas NDM-1 sintetinančioms enterobakterijoms, kurios 2008 m. atrastos Švedijoje gydant Indijos ligonį. Per dvejus metus šios bakterijos išplito iš Indijos regiono į visus žemynus, išskyrus Centrinę ir Pietų Ameriką. Manoma, kad Balkanų šalys ir Vidurio Rytų regionas yra antrinis šių bakterijų ir NDM-1 židiny (Pakistane, Indijoje ir Bangladeše užfiksuota daugiau nei 50 atvejų). Atsparumą įvairiems karbapenemams lemia jų didelė atsparumo genų įvairovė, esančių plazmidėse [30].

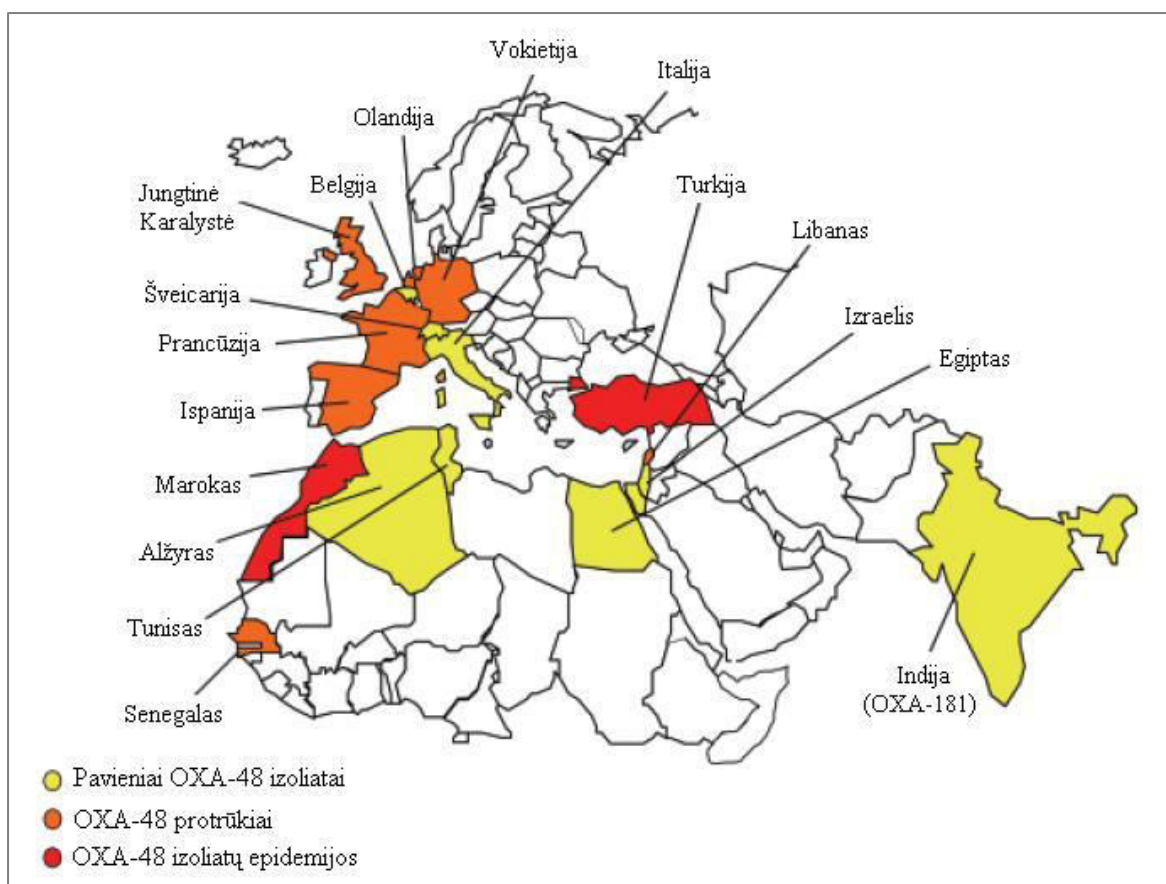


5 pav. VIM ir IMP sintetinančių bakterijų paplitimas pasaulyje (A) ir Europoje (B) (Nordmann *et al.*, 2011)

### 1.6.3. D klasės karbapenemazių geografinis paplitimas

Pirmasis OXA-48 sintetinantis organizmas atrastas 2003 m. Turkijoje [5]. Tai buvo viena iš *K. pneumoniae* padermių, kuri labiausiai paplito šioje šalyje, o taip pat ir Maroke. Šiuo metu šis patogenas randamas Vakarų Europos šalyse, Viduržemio jūros rytinėje ir pietinėje dalyse. Pavieniai atvejai užfiksuoti Italijoje, Šveicarijoje ir Afrikos šalyse (6 pav.). OXA-48 fermentą gaminantys mikroorganizmai plinta ligoninėse, kuriose gydomi pacientai iš endeminių šalių. Tačiau, JAV ir Kanadoje tokių atvejų kol kas neužfiksuota. Įdomu tai, jog Indijoje randama kita fermentų grupė – OXA-181. Manoma, kad D klasės fermentus sintetinančios bakterijos sunkiausiai identifikuojamos, tad jų sukeltą mirtinumą taip pat sudėtinga įvertinti [30].



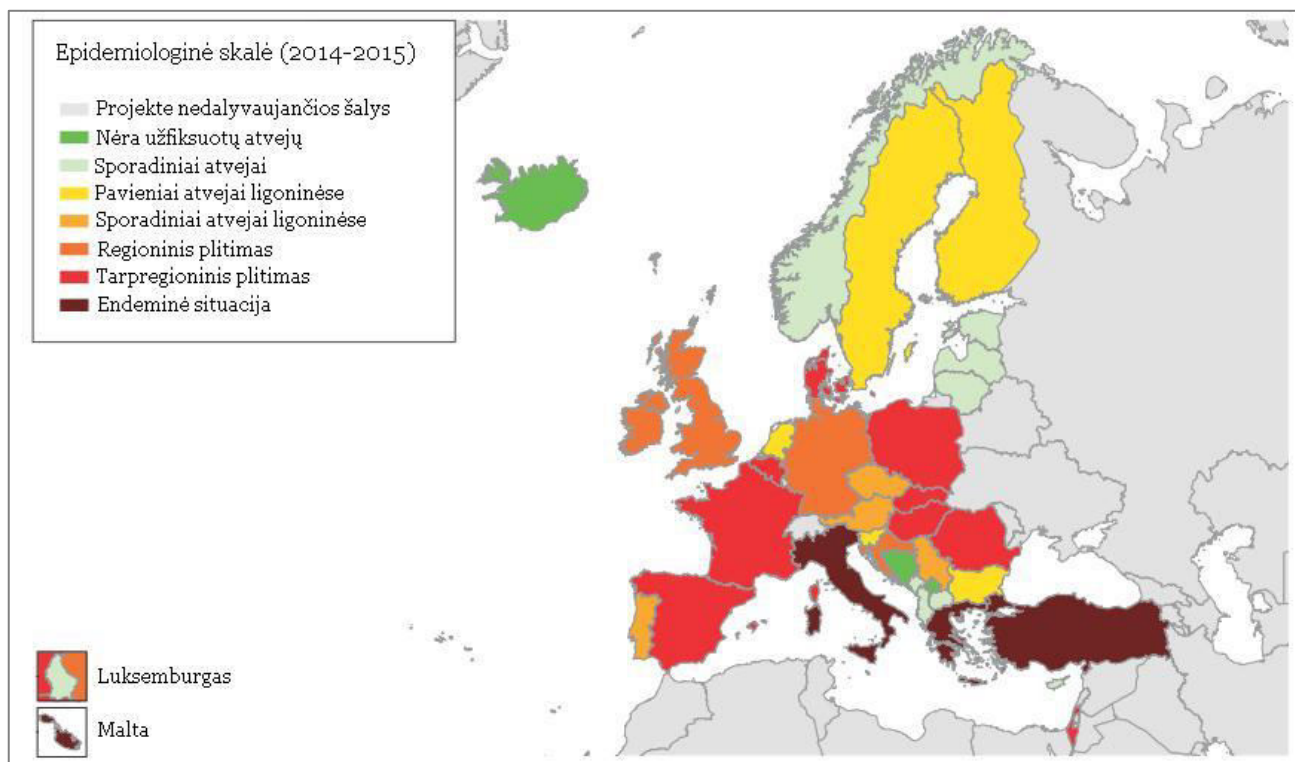


6 pav. OXA-48 sintetinančių bakterijų paplitimas Europoje ir Afrikoje (Nordmann *et al.*, 2011)

Europos ligų prevencijos ir kontrolės centras (ECDC) 2012 m. įsteigė projektą pavadinimu „Karbapenemazes produkuojančių enterobakterijų Europos tyrimas“ (EuSCAPE). Projekto tikslas buvo ištirti invazines *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų padermes, jų epidemiologiją, taip pat skleisti žinią apie kylančią grėsmę žmonių sveikatai ir gerinti diagnostiką. Projekte dalyvavo net 38 Europos šalys. Kiekviena iš jų turėjo įvertinti ligų paplitimą savo šalyje pagal epidemiologinę skalę. Tyrimo rezultatai parodė, jog trijose šalyse neužfiksuota nei vieno tokio atvejo, trylikai šalių būdingas regioninis infekcijų plitimas, o keturiose – endeminiai atvejai. Sporadiniai susirgimai aptikti devyniose šalyse, penkiose buvo pavieniai atvejai ligoninėse ir keturiose užfiksuotos sporadinės hospitalinės infekcijos (7 pav.) [1].

Baltijos šalys tik paskutiniaisiais tyrimo metais pateikė savo rezultatus ECDC organizacijai. Estijoje vienas atvejis užfiksuotas 2015 m. Tai buvo *Enterobacter aerogenes* bakterija, kuri sintetino imipenemazę GIM. Latvijoje užfiksuoti trys atvejai, kurie susiję su VIM produkuojančiomis bakterijų padermėmis, o Lietuvoje nustatyta net trylika invazinių atvejų: du iš jų susiję su *K.*

*pneumoniae* (sintetinas fermentas OXA-48), devyni – *Enterobacter cloacae* (NDM), po vieną – *E. aerogenes* (NDM) ir *E. cloacae* (VIM) [1].



7 pav. Karbapenemazes sintetinančių bakterijų paplitimas Europoje 2014–2015 m. (EuSCAPE tyrimo rezultatai) (Albiger *et al.*, 2015)

#### 1.6.4. *Pseudomonas* genties karbapenemazių geografinis paplitimas

Metalo- $\beta$ -laktamazės produkuojančios *Pseudomonas aeruginosa* bakterijos (MPPA) yra vieni dažniausių hospitalinių infekcijų sukėlėjų. MPPA sintetina įvairių tipų metalo- $\beta$ -laktamazės: IMP, VIM, SPM, GIM, NDM ir FIM. Šiuos fermentus koduojantys genai išsidėstę integronuose, transpozonuose, plazmidėse ir chromosomose. Visus šiuos elementus jie perduoda kitoms gramneigiamoms bakterijoms ir padidina komplikacijų tikimybę. Taigi, norint užkirsti kelią globaliai sveikatos krizei ir kontroliuoti infekcijų plitimą, svarbu žinoti MPPA epidemiologiją [16].

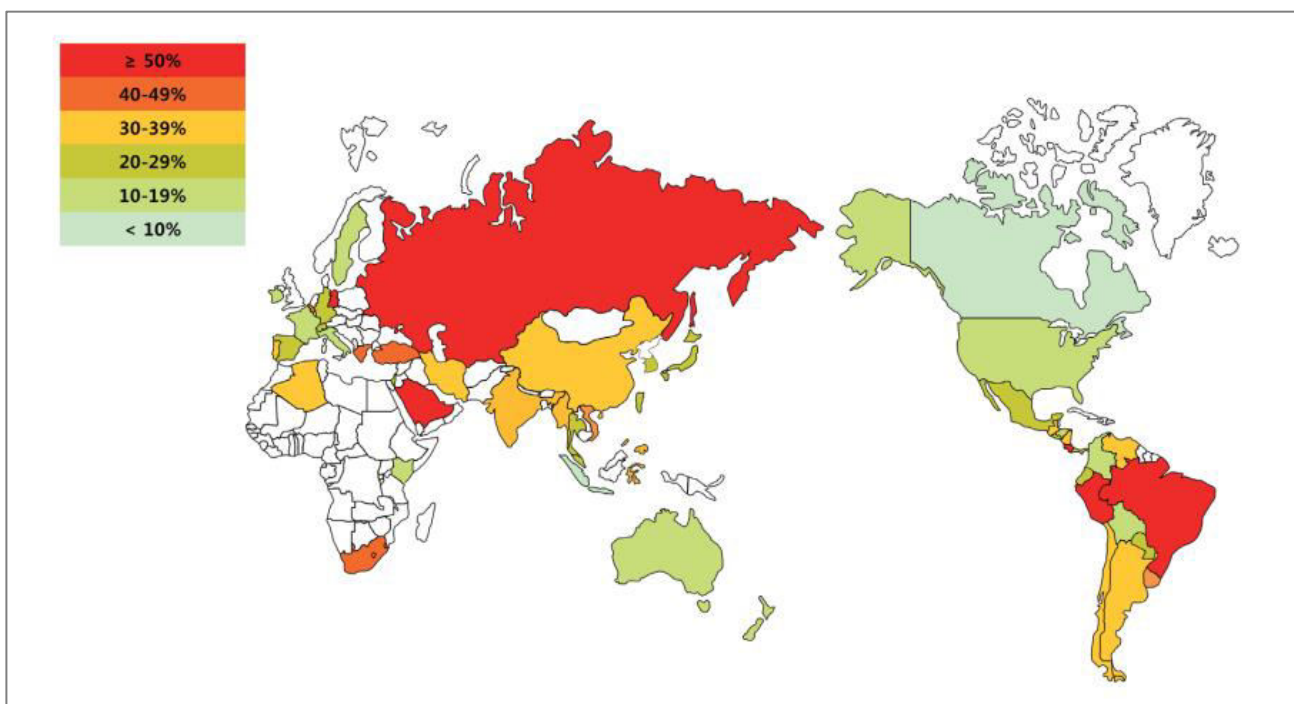
IMP ir VIM tipo metalo- $\beta$ -laktamazės, kurias sintetina *P. aeruginosa*, pirmą kartą atrastos Japonijoje (1988 m.) ir Italijoje (1999 m.). Tik šie du fermentų tipai plačiai paplito visame

pasaulyje, o visi kiti liko geografiškai apriboti: SPM-1 aptiktas Brazilijoje (1997 m.), GIM-1 ir AIM-1 Vokietijoje bei Australijoje (2002 m.), o NDM-1 – Serbijoje (2011 m.) [16, 24, 27].

Vėliausiai atrasta *P. aeruginosa* gaminama karbapenemazė yra FIM-1, kuri užfiksuota 2012 m. Italijoje, Florencijos regione. Nustatyta, kad šis fermentas savo cheminėmis savybėmis panašus į NDM tipo karbapenemazes [16].

Remiantis moksline literatūra ir įvairių šalių pateiktais duomenimis, Azijos tyrėjų grupė sudarė karbapenemams atsparių *P. aeruginosa* padermių geografinio paplitimo žemėlapi (8 pav.) [16]. Nustatyta, kad daugelyje pasaulio šalių, šių patogenų santykis svyravo nuo 10 iki 50%. Mažiausi rodikliai užfiksuoti Kanadoje ir Dominikos Respublikoje (atitinkamai 3,3 ir 8%). Tačiau, Brazilijoje, Peru, Kosta Rikoje, Rusijoje, Graikijoje, Lenkijoje, Irane ir Saudo Arabijoje šis santykis buvo didesnis nei 50% (tiriant kiekvieną karbapenemo klasės antibiotiką atskirai) [16].

Epidemiologinio tyrimo rezultatai parodė, kad Rusija, pietvakarių Azija ir Pietų Amerika yra pagrindiniai antibakterinio atsparumo plitimo šaltiniai. Manoma, kad *P. aeruginosa* atsparumas ligoninėse didėja dėl karbapenemų vartojimo ir medicininių įrankių naudojimo, kurie pagreitina atsparių mikroorganizmų selekciją. Šie veiksniai priklauso nuo sveikatos priežiūrų įstaigų politikos, kurios skiriasi įvairiose šalyse [16].



8 pav. Geografinis karbapenemams atsparių *Pseudomonas aeruginosa* paplitimas. Baltos spalvos regionai nepateikė savo šalies duomenų (Hong *et al.*, 2015)

A klasės karbapenemazės (KPC), kurias gamina *P. aeruginosa*, užfiksuotos Kolumbijoje. Įdomu tai, kad šis patogenas sintetina šio tipo karbapenemazes tik Lotynų Amerikos dalyje. Tačiau, šis fermentas pavojingas tuo, kad gali deaktivuoti net aztreonamą [27].

D klasės karbapenemazės OXA retai aptinkamos *P. aeruginosa* bakterijose. Nustatyta, kad tai mutavusios OXA-10 ir OXA-2 tipų  $\beta$ -laktamazės [24, 27].

## 1.7. Karbapenemazių nustatymo metodai

Greitas ir nebrangus atsparumo antibiotikams nustatymo metodas yra svarbi prielaida parenkant tinkamus vaistus [29, 37]. Karbapenemazės gali būti nustatomos naudojant molekulinis ir nemolekulinius metodus. Ligoninių mikrobiologijos laboratorijose dažniau naudojami nemolekuliniai nustatymo metodai, nes šie lengviau atliekami ir nereikalauja brangios įrangos ir reagentų [9].

Tradiciniai jautrumo nustatymo metodai trunka mažiausiai dvi dienas. Gera žinia ta, jog automatizuotu būdu rezultatai gaunami jau po kelių valandų [36]. Tačiau, molekuliniai ir genetiniai karbapenemazių tyrimai brangūs bei sudėtingi, reikalauja gerų specialistų ir tikslios interpretacijos [31].

Fenotipiniai bakterijų jautrumo tyrimai atliekami diskų difuzijos metodu, naudojant E-testus (nustatoma minimali inhibuojanti koncentracija MIK) arba automatizuotas mikrobiologines sistemas Phoenix ir Vitek 2 [36]. Diskų difuzijos metodas naudojamas rutiniame laboratorijos darbe, o E-testas – tai patvirtinamasis metodas ir pagrindinis atrankinis kriterijus įtariant karbapenemazių aktyvumą. Specifinių karbapenemazių inhibitorių (EDTA, DPA ir kt.) priemaišos lemia disko zonos didėjimą ir MIK vertės mažėjimą, o diagnostinės ribinės vertės (>5 mm disko zona ir trigubai ar daugiau kartų sumažėjusi MIK) tik patvirtina fermentų buvimą [35].

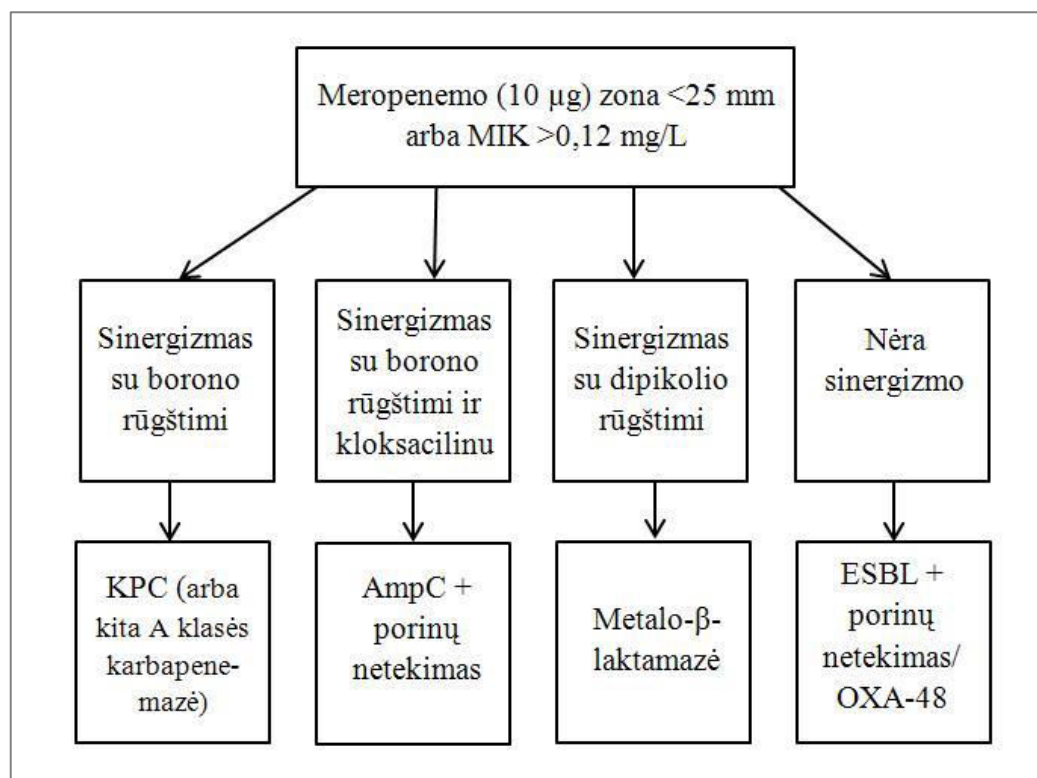
### 1.7.1. Mikrobiologiniai metodai su inhibitoriais

#### 1. Dviejų diskų sinergizmo metodas

Sinergizmo metodas pagrįstas karbapenemazių inhibicija *in vitro*, papildomai naudojant specifinius skirtingų fermentų klasių inhibitorius [15].

Šiuo metu Europoje paplito kombinuotas fenotipinis metodas – *Neo-Sensitabs*. Neseniai atliktų tyrimų rezultatai rodo, kad visos KPC fermentą gaminančios bakterijų padermės lengvai identifikuojamos naudojant kombinuotą meropenemo-meropenemo/APBA diską. Visos kitos metalo- $\beta$ -laktamazes produkuojančios padermės nustatytos naudojant dviejų rūšių kombinuotus diskus: meropenemo ir dipikolino rūgšties (MEM-MEM/DPA) bei imipenemo ir etilendiamintetraacto rūgšties (IMP-IMP/EDTA). Tačiau, pastaruoju disku gautas klaidingai teigiamas rezultatas. Manoma, kad tai susiję su mažu EDTA specifiškumu nustatant metalo- $\beta$ -laktamazes [15].

Kombinuotų diskų metodas yra pranašesnis už diskų difuzijos metodą. Schemoje pateikti diskų arba plokštelių su meropenemo ir kitų inhibitorių pavyzdžiais veikimo rezultatai (9 pav.). Nustatyta, kad borono rūgštis inhibuoja A klasės karbapenemazes, o dipikolio rūgštis – B klasės. Deja, bet D klasės karbapenemazių inhibitoriai dar nėra atrasti. Kloksacilinas, kuris inhibuoja AmpC  $\beta$ -laktamazes, pridėtas norint diferencijuoti porinų praradimą nuo karbapenemazių sintezės. Didžiausias šio metodo trūkumas yra ilga tyrimo trukmė (18 val.) [11].



9 pav. Kombinuotų diskų metodo veikimo algoritmas (EUCAST, 2013)

## 2. Gradiento testas (dvigubas E-testas)

Rinkoje egzistuoja kombinuoti imipenemo ir imipenemo-EDTA E-testai. Jeigu MIK vertė yra trigubai ar daugiau kartų mažesnė, reiškia testas teigiamas ir bakterijos sintetina metalo- $\beta$ -laktamazės. Šio testo jautrumas ir specifiškumas atitinkamai siekia 94% ir 95%. Šiuo atveju, EDTA taip pat gali lemti klaidingai teigiamus rezultatus [35].

### 1.7.2. Modifikuotas *Hodge testas*

Modifikuotas *Hodge testas* (MHT) panašus į diskų difuzijos metodą ir pagrįstas karbapenemazių sinteze *in vivo*. Šiuo testu galima nustatyti enterobakterijų sintetinas karbapenemazes, bet neįmanoma nustatyti fermentų klasių. Šis metodas kol kas plačiai naudojamas tik JAV, jis reikalauja daug laiko (1–2 d.), yra nepakankamo jautrumo ir specifiškumo [9, 30].

### 1.7.3. Kolorimetrinis metodas

Carba NP (*Carbapenemase Nordmann-Poirel*) testas skirtas greitai identifikuoti enterobakterijas ir patvirtinti karbapenemazių sintezę. Šio metodo jautrumas ir specifiškumas siekia 100%, jis pigus ir užtrunka tik porą valandų [31].

Metodo principas pagrįstas pH pokyčiais, kuriuos lemia imipenemo hidrolizė. Jeigu patogenai sintetina karbapenemazes, fenolio raudonojo tirpalo raudona spalva keičiasi į geltoną. Nustatyta, kad Carba NP metodą galima taikyti tik ant Mueller-Hinton, kraujo agarų ir selektyvių terpių, skirtų karbapenemazių aptikimui. Tuo tarpu Drigalski ir McConkey agarai netinkami šiam testui [11].

### 1.7.4. Molekuliniai metodai

Referentiniai molekuliniai metodai pagrįsti polimerazės grandininė reakcija (PGR) ir sekvenavimu (svarbu epidemiologijoje). Jų tikslas – karbapenemazes koduojančių genų detekcija. Šie metodai yra didelio jautrumo ir specifiškumo, o tyrimai atliekami per 4–6 val. ar net greičiau. Šiuo metu yra sukurta daugybė pradmenų, kurie plačiai naudojami PGR nustatant įvairias karbapenemazių šeimas ir pogrupius. Kai kuriose laboratorijose taip pat naudojamas *Southern blot* hibridizacijos metodas, kuris leidžia atskirti plazmidėse ir chromosomose išsidėsčiusius

karbapenemazių genus [35]. Tačiau, molekuliniai metodai yra brangūs, tyrimams atlikti reikalingas apmokytas personalas ir neįmanoma aptikti naujų karbapenemazių genų. Dėl šių priežasčių ieškoma vis naujesnių detekcijos būdų, kurie būtų pigūs, greiti ir specifiški [30].

- **MALDI-TOF MS**

MALDI-TOF MS metodu identifikuojamos įvairios mikroorganizmų grupės: gramneigiamos ir anaerobinės bakterijos, mieliagrybiai, lepios ir aukšto patogeniškumo bakterijos, mikobakterijos, daugialąsteliniai grybai ir patogeniniai dumbliai [20]. Nustatyta, kad sudėtingiausia identifikuoti viridinių streptokokų grupę, pneumokokus ir anaerobines bakterijas. Taip yra dėl to, jog duomenų bazėse trūksta informacijos, todėl neįmanoma palyginti jų masių spektrus. Grybų identifikavimas MALDI-TOF MS metodu yra dar sudėtingesnis dėl jų storos sienelės. Dažnai reikia naudoti trifluoroacto, skruzdžių rūgštis arba acetonitrilą norint ją suardyti. Dažniausiai nustatomi mieliagrybiai iš *Candida* genties, o taip pat pelėsiniai grybai – *Penicillium*, *Aspergillum*, *Fusarium*, *Trichoderma* genčių ir įvairūs dermatofitai [22]. Gera žinia ta, jog šie patogenai dažnai neturi fermentų, skaidančių vaistus, todėl jautrumas nustatomas klasikiniiais nemolekuliniiais metodais [36].

MALDI-TOF MS nauda virusologijoje nėra didelė. Pagrindinės priežastys yra mažas baltymų kiekis virusuose, didesnė šių baltymų molekulinė masė (> 20 kDa) ir ląstelių nuolaužos, kuriose virusai augo *in vitro*. Tačiau, daugelis tyrėjų naudoja šį metodą enterovirusų, žmogaus papilomos viruso (ŽPV), *Herpes*, hepatito ir gripo virusų bei jų padermių diagnostikai. Įdomu tai, jog šiam tyrimui reikalingi virusų genetinės medžiagos amplikonai. Taigi, virusų nustatymas MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu glaudžiai siejamas su PGR [36].

Patogeniniai mikroorganizmai ir grybai nustatomi iš įvairių žmogaus organizmo skysčių: kraujo, šlapimo, smegenų skysčio, pleuros, pilvaplėvės ir sąnario skysčių. Tačiau, trūkumas yra tas, jog šiuose mėginiuose bakterijų kiekis yra ribotas. MALDI-TOF MS ne visais atvejais nustato bakterijų rūšį, todėl kartais atliekami papildomi DNR tyrimai [22, 26, 36].

Masių spektrometrijos metodas pagrįstas peptidų mišinio analize, kuris gaunamas skaidant baltymus proteoliziniiais fermentais. Nustatomi tik dujinės fazės jonai ir jų pokyčiai, kurie priklauso nuo skirtingo masės ir krūvio santykio. Taigi, MALDI-TOF MS metodas skirtas tiriamos medžiagos jonizacijai [22, 26, 29]. Šis naujai atrastas būdas vadinamas „švelniu ju“ jonizacijos metodu, kadangi tiriami medžiaga tiesiogiai nesugeria lazerio šviesos energijos ir nesukelia tiesioginės peptidų fragmentacijos [25].

Masės spektrometrą sudaro 3 dalys [7, 8, 22, 25]:

- 1) Jonų šaltinis, kuris jonizuoja ir paverčia mėginio jonus dujomis;
- 2) Masės analizatorius, kuris atskiria jonus pagal jų masės ir krūvio santykį ( $m/z$ );
- 3) Detektorius (jonų gaudyklė), kuris fiksuoja skirtingu metu atskriejančius jonus.

Bakterijų tiriamoji medžiaga ištirpinama TFA (trifluoroacto rūgšties vandeniniame) tirpale, imama 1  $\mu$ l paruošto tirpalo ir sumaišoma su vandens prisotinta matrica ant laidžios metalinės plokštelės. Tirpiklis garuodamas formuoja kristalus. Plokštelė įvedama į masės spektrometrą ir apšviečiama nitrogenu lazeriu. Matrica absorbuoja šviesos energiją, o tai lemia mėginio desorbciją – garuodamas jonizuojasi į dujinę fazę. Šis procesas skatina molekules įgauti krūvį. Jonizuotų molekulių judėjimas pagreitinamas elektrostatiniu lauku. Vėliau jos išmetamos pro metalinį, vakuuminį skrydžio vamzdį ir juda tol, kol pasiekia detektorių. Mėginio dalelės atskiriamos pagal jų lėkio trukmę, kuri priklauso nuo jų masės [7, 8, 22, 25].

Lėkio trukmės analizė pagrįsta jonų skrydžiu detektoriaus pusėn. Visi jonai įgauna tą patį energijos kiekį, bet dėl skirtingos savo masės, skirtingu metu pasiekia detektorių. Mažesni jonai lengvesni ir skrieja greičiau [26, 29]. Detektoriaus pasiekimo laikas priklauso nuo masės, krūvio ir kinetinės jonų energijos. Pagal tai sukuriamas masių spektras, atitinkantis molekulių masės ( $m$ ) ir krūvio ( $z$ ) santykį ( $m/z$ ). Kadangi dažniausiai jonų krūvis yra 1, tad mėginio masės ir jonų santykis ( $m/z$ ) lygus jo masei [25]. Spektro rezultatai varijuoja nuo 1 000 iki 20 000  $m/z$ , pikai yra skirtingo aukščio ir intensyvumo [22].

Matricos parinkimas yra vienas svarbiausių etapų, nuo kurio priklauso tyrimo sėkmė. Norint išskirti peptidus arba oligosacharidus, dažniausiai naudojamos benzoinė, cinamono rūgštys, panašių aromatinių rūgščių tirpalai ir kitos silpnos organinės rūgštys [7, 8, 22, 25]. Matrica taip pat dalyvauja reakcijoje kaip protono donoras bei recipientas, kuris jonizuoja mėginį atitinkamai teigiamai arba neigiamai. Jonizacija priklauso nuo matricos ir mėginio kombinacijos, bet nepriklauso nuo rūgščių ar bazių grupių mėginyje [7, 26].

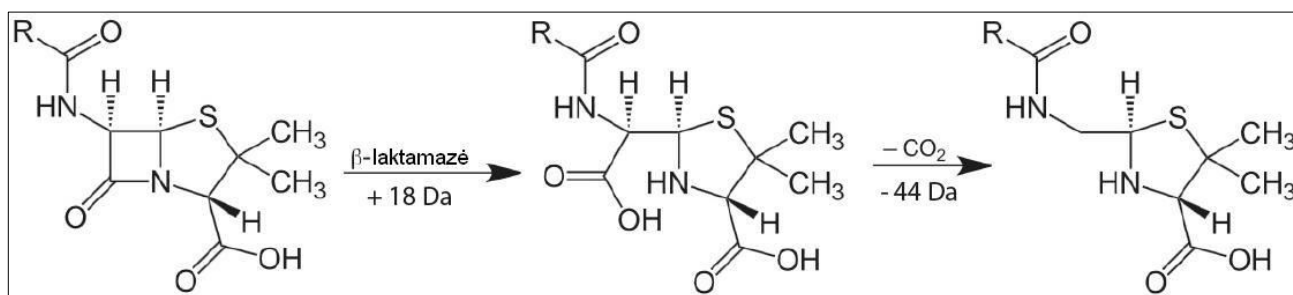
Ant plokštelės su mėginiu turi būti užneštas matricos perteklius (santykis su mėginiu varijuoja nuo 100:1 iki 10 000:1). Taip yra dėl to, jog ši medžiaga sugeria lazerio spinduliuotę ir greitai pereina į dujinę fazę. Be to, didelis matricos ir mėginio santykis sumažina molekulių asociaciją ir užtikrina protonų produktų susidarymą, kurie jonizuoja molekules [22, 25, 26, 37].

Sėkmingai atliktas MALDI-TOF MS tyrimas leidžia identifikuoti patogenus dviem būdais: pirmuoju atveju lyginami masių spektrai su duomenų bazių duomenimis. Šie duomenys pastoviai pildomi ir yra globaliai prieinami. Toks variantas yra greitesnis, paprastesnis ir lengviau įdiegiamas



mikrobiologijos laboratorijose. Antrasis būdas yra naudojamas rečiau, nes masių vertės lyginamos su proteomų duomenimis, o tam reikalinga nusekvenuoti mikroorganizmų genomus. Be to, šis metodas taikomas molekulėms, kurių masės ir krūvio santykis ( $m/z$ ) didesnis nei 4 000 [26].

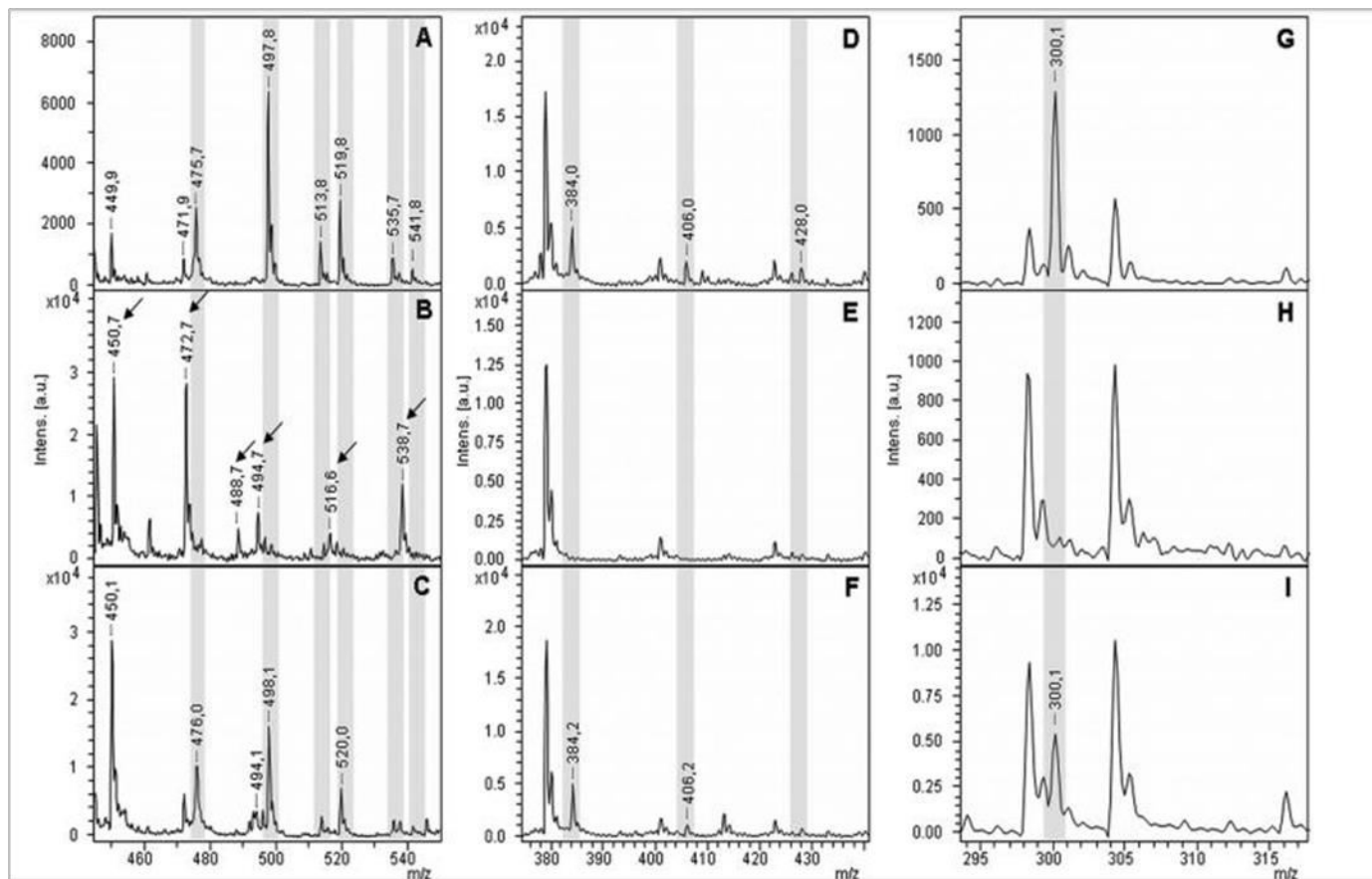
MALDI-TOF masių spektrometrija taip pat gali būti naudojama tiriant  $\beta$ -laktaminių antibiotikų (penicilino, ampicilino, piperacilino, ceftazidimo, cefotaksimo, ertapenemo, meropenemo ir imipenemo) hidrolizę [20, 36]. Šiuo metu vis dažniau atliekami „masės spektrometrijos  $\beta$ -laktamazių tyrimai“ (MSBL) [13, 18, 20, 36]. Tiriamasis objektas yra  $\beta$ -laktamazių produktai, o ne bakterijų proteomas [13]. Fermentinis  $\beta$ -laktamo žiedo skaidymas vyksta dėl nedidelio vandens kiekio priemaišos, kuri padidina antibiotiko molekulinę masę (+18 Da) (10 pav.). Šis masės pokytis ir nustatomas MALDI-TOF MS metodu. Antibiotiko molekulinės masės pokyčio aptikimas nurodo, kad bakterija gamina fermentus, skaidančius antibiotiko  $\beta$ -laktamini žiedą [17, 20].



10 pav. Karbapenemų cheminės struktūros pokyčiai hidrolizės (+18 Da) ir dekarboksilinimo (-44 Da) metu, kurie lemia molekulinės masės pokyčius (Kostrzewa *et al.*, 2013)

Bakterijos, kurios negamina  $\beta$ -laktamazių, nepakeičia antibiotiko molekulinės masės [17, 20]. Dažniausiai tiriami antibiotikai yra ampicilinas, piperacilinas, cefotaksimas, ceftazidimas, ertapenemas, imipenemas ir meropenemas [13, 17]. Šis karbapenemazių aktyvumo nustatymo metodas turi daug privalumų: rezultatai gaunami per 1–2 valandas, nes metodas pagrįstas fermentų aktyvumu, o ne bakterijų augimo greičiu (išskyrus OXA-48 tipo fermentus, kurių hidrolizė trunka ilgiau, apie 3–4 val.). MSBL vertinimas nėra sudėtingas, nes hidrolizuotų ir nehidrolizuotų antibiotikų formas apibūdina specifinės masės spektrų smailės (11 pav.). Šis tyrimas labai svarbus identifikuojant bakterijų gaminamus fermentus iš teigiamų kraujo kultūrų ir skiriant ankstyvą gydymą [13, 20, 36].

Nepaisant visų metodo privalumų, mikroorganizmų atsparumo mechanizmai vis dar iškreipia rezultatus. Porinių defektai ir specifiniai membranos siurbliai, būdingi *Pseudomonas* spp. ir *Acinetobacter* spp., neleidžia antibiotikui prisijungti prie  $\beta$ -laktamo žiedo – nevyksta hidrolizė. Tyrėjo Hrabák mokslininkų grupė nustatė, kad pridėjus į tiriamąją medžiagą natrio dodecilsulfato (0,1%), šis veikdamas kaip detergantas praduria išorinę membraną ir ji tampa pralaidi antibiotikui nepriklausomai nuo porinių ir siurblių. Kitas būdas yra tirti jau lizuotas ląsteles [17, 20].



11 pav. MALDI-TOF MS masių spektras. *Klebsiella pneumoniae* padermės inkubuotos kartu su skirtingais karbapenemais: ertapenemu (A, B, C), meropenemu (D, E, F), imipenemu (G, H, I). A, D, G – karbapenemams jautrios *Klebsiella pneumoniae* padermės. B, E, H – karbapenemams atsparios *K. pneumoniae* padermės. C, F, I – karbapenemams atsparios padermės su antibiotikų inhibitoriumi aminofenilboronine rūgštimi. Rodyklės žymi antibiotiko hidrolizę (smailės, atsirandančios dėl  $\beta$ -laktamazių gamybos ir po to sekančios antibiotiko hidrolizės). Pilkos juostos žymi nehidrolizuotas formas (Sparbier *et al.*, 2012)

Šis naujas karbapenemazių aktyvumo nustatymo metodas svarbus ne tik diagnostikoje, bet ir farmacijos srityje. Tačiau, nepaisant visų minėtų privalumų, visus MALDI-TOF MS tyrimo rezultatus verta palyginti su tradiciniais jautrumo nustatymo metodų rezultatais [29, 37].

- **Kombinuotas genetinis ir masės spektrometrijos metodas**

PGR metu gauti amplikonai tiriami masės spektrometrijos metodu. MALDI-TOF MS jonizacijos metu amplikonai verčiami dujinės fazės junginiais. Pagrindinis šio metodo privalumas yra atsparumo genų detekcija. Šio kombinuoto metodo pagalba nustatytos devynios skirtingos KPC tipo karbapenemazės, *gyrA* ir *parC* taškinės mutacijos, kurios lemia *Acinetobacter baumannii* atsparumą chinolonams. Be to, šiuo metodu galima identifikuoti bakterijų porūšius. Tai svarbu diferencijuojant tuberkuliozę nesukeliančias bakterijas nuo *Mycobacterium tuberculosis* ir nustatant atsparumą rifampicinui, izoniazidui, etambutoliui ir fluorochinolonui [13].

- **Aminorūgščių žymėjimas stabiliaisiais izotopais**

MALDI-TOF MS karbapenemazių tyrimas apribotas įvairių veiksnių, todėl sukurta nauja technologija, leidžianti efektyviau atlikti šiuos tyrimus. SILAC – tai metodas, paremtas aminorūgščių žymėjimu stabiliaisiais izotopais ląstelių kultūroje. Šis metodas vizualizuoja bakterijų augimą veikiant antibiotikui. Svarbu tai, jog tik metaboliškai aktyvios bakterijos gali įsisavinti (prijungti prie savo baltymų) žymėtą aminorūgštį ir tą rodo būdingas smaيليų poslinkis masių spektre. Nustatyta, kad jeigu bakterija deaktyvuojama antibiotiko, masių spektras lieka nepakitęs [13, 18, 20].

Iki šiol ištirti tik trys skirtingo veikimo antibiotikai (meropenemas, tobramicinas ir ciprofloksacinas). Modeliniu organizmu išrinktas *Pseudomonas aeruginosa*, kadangi jis kliniškai svarbus ir turi didelę atsparumo mechanizmų įvairovę. Lizinas yra labiausiai tinkama aminorūgštis, kadangi sudaro didžiąją dalį ribosomų subvienetų. Lyginant aprašytus metodus, MALDI-TOF MS būdu nustatomas  $\beta$ -laktamazių aktyvumas, o SILAC technologija skirta įvertinti patogenų metabolinį aktyvumą veikiant antibiotikams [13, 18, 20].

## 2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODIKA

Programinė įranga MBT STAR-BL skirta identifikuoti bakterijų  $\beta$ -laktamazių aktyvumą, bet tai nėra priemonė, leidžianti analizuoti jų jautrumą antibiotikams. Alternatyvūs bakterijų atsparumo mechanizmai, tokie kaip porinų mutacijos arba išmetimo siurblių padidėjusi ekspresija, gali užgožti fermentų aktyvumą ir sąlygoti klaidingai neigiamus rezultatus. Taigi, kol kas ši metodika skirta tik moksliniams tyrinėjimams ir negali būti naudojama klinikinėje diagnostikoje [3, 17, 20].

Remiantis keliais publikuotais mokslininkų straipsniais [3, 17, 20], o taip pat bendradarbiaujant su Rytų Talino Centrine ligonine ir Bruker įmonės atstovais, Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK) Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje sukurta panaši programinė įranga, gebanti nustatyti  $\beta$ -laktamazių aktyvumą. Tačiau, iki šiol Lietuvoje nebuvo atliekami jokie karbapenemazių detekcijos tyrimai su MALDI-TOF masių spektrometru, tad 2016 m. rugpjūčio 12–13 d. Rytų Talino Centrinėje ligoninėje dalyvavau 10 valandų trukmės apmokymuose tema “Masių spektrometrija paremtas metodas, skirtas  $\beta$ -laktamazių aktyvumo detekcijai bakterijų kultūrose” (4 priedas). Teorinius ir praktinius užsiėmimus finansavo Lietuvos Laboratorinės Medicinos Draugija.

### 2.1. Tyrimo medžiagos ruošimas

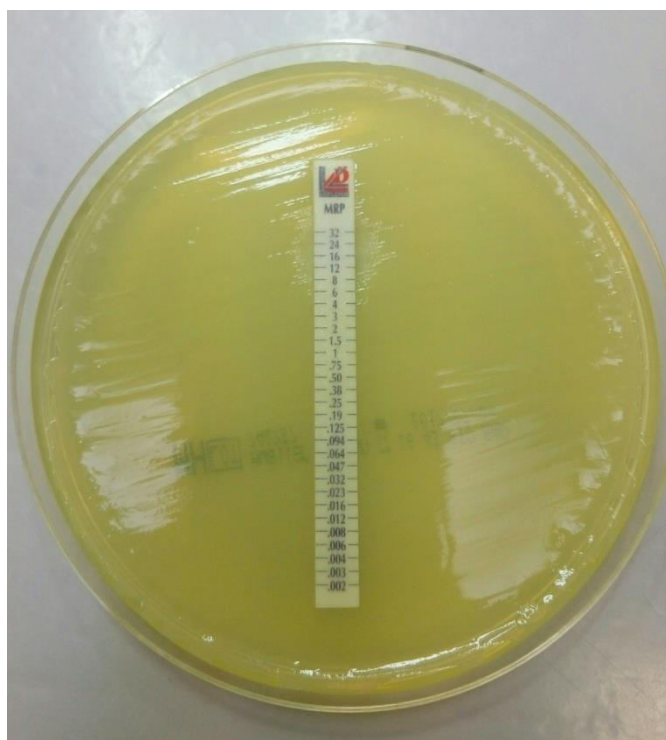
- **Karbapenemams atsparių *Pseudomonas* padermių kultūrų atranka**

Pacientų ligos istorijų duomenys, *Pseudomonas* spp. bakterijų E-testų ir diskų difuzijos tyrimų rezultatai surinkti iš VUL SK mikrobiologinių tyrimų duomenų bazės. Remiantis 2015–2017 m. duomenimis, atrinktos karbapenemams atsparios bakterijos ir atlikta duomenų analizė (žr. 3. Tyrimo rezultatai).

Karbapenemams atsparios *Pseudomonas* spp. bakterijos atrinktos remiantis EUCAST nustatytomis epidemiologinėmis ribinėmis jautrumo reikšmėmis (1 lentelė). Jeigu E-testo MIK vertė buvo didesnė už 8 mg/L (12 pav.), o diskų difuzijos zonos skersmuo mažesnis už 18 mm, tokios bakterijos laikytos atspariomis meropenemui. Pagal šias ribines vertes nustatytos atsparios *Pseudomonas* spp. bakterijos ir toliau tirtos dėl galimos karbapenemazių gamybos.

1 lentelė. Jautrumo karbapenemams ribinės vertės *Pseudomonas* spp. padermėms (simboliai: J – „jautru“, A – „atsparu“) (pagal EUCAST, 2017)

Karbapenemas	MIK (mg/L)		Diskų difuzijos zonos skersmuo (mm) su 10 µg diskais	
	J ≤	A >	J ≥	A <
Doripenemas	1	2	25	22
Ertapenemas	-	-	-	-
Imipenemas	4	8	20	17
Meropenemas	2	8	24	18



12 pav. Meropenemui atspari *Pseudomonas aeruginosa* kultūra su E-testu (MIK > 8 mg/L)

- **Bakterijų kultūrų paruošimas**

*Pseudomonas* spp. bakterijų kultūros išskirtos iš įvairių ligoninių skyrių ir pacientų kūno vietų. Norint išsaugoti bakterijas su nepakitusiomis biocheminėmis savybėmis, visos kultūros persėtos į specialius šaldymo mėgintuvėlius ir užšaldytos  $-80^{\circ}\text{C}$  laipsnių šaldiklyje.

Karbapenemazių detekcijos tyrimas masių spektrometru visada turi būti atliekamas tik su šviežia (24 val.) tiriamąja medžiaga, tad dieną prieš numatytą tyrimą, kelios bakterijų kultūros buvo ištraukiamos iš šaldiklio, išsėjamos ant kraujo agarų ir inkubuojamos 18–24 valandų  $+36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  laipsnių termostate. Jeigu tyrime naudotos nešaldytos *Pseudomonas* spp. kultūros, bakterijos buvo

taip pat persėjamos nuo Mueller-Hinton terpės ant kraujo agaro. Tokiu pačiu būdu ruoštos kontrolinės bakterijų kultūros: teigiama (atspari karbapenemams ir produkuojanti  $\beta$ -laktamazes) ir neigiama (jautri karbapenemams, negaminanti  $\beta$ -laktamazių). Kaip teigiamos kontrolės buvo naudotos *Enterobacteriaceae* šeimos ir *Pseudomonas* genties bakterijos su žinoma karbapenemazių gamyba. Kontrolinės kultūros gautos iš Baltijos šalių antibakterinio atsparumo tinklo (angl. *BARN*), esančio Švedijoje.

## 2.2. Tyrimo eiga

Tyrimas atliktas remiantis komerciškai prieinamu standartinės MBT STAR-BL procedūros aprašymu, kurį parengė Bruker įmonės tyrėjai. Jame detalai aprašytas tirpalų ruošimas ir tikslios jų koncentracijos, tyrimo eiga ir masių spektrų interpretavimas. Ši procedūra skirta tik moksliniams tyrimams.

- **Tyrimo priemonės:**

1. Vienkartinės mikrobiologinės kilpelės (1  $\mu$ L)
2. Vienkartiniai švirkštai su adata (2 mL)
3. Kintamo tūrio vienkanalės mechaninės pipetės su vienkartiniais antgaliais
4. Eppendorf tipo mėgintuvėliai (1,5 mL)
5. Termostatas (+37°C)
6. Mėgintuvėlių maišyklė
7. Analitinės svarstyklės
8. Mikrocentrifuga
9. MALDI-TOF MS metalinės plokštelės
10. MALDI-TOF masių spektrometras (gamintojas Bruker)

- **Tyrimo medžiagos:**

1. Acetonitrilas (ACN)
2. Trifluoroacto rūgštis (TFA)
3. Dejonizuotas vanduo
4. Matrica ( $\alpha$ -ciano-4-hidroksicinamono rūgštis (HCCA) (gamintojas Bruker)
5. Rezerpinas ( $C_{33}H_{40}N_2O_9$ )

6. Fiziologinis NaCl tirpalas (0,9 %)
7. Cinko chloridas ( $ZnCl_2$ )
8. Amonio bikarbonatas ( $NH_4HCO_3$ )
9. Meropenemo tirpalas
10. „Invanz“ milteliai (ertapenemas) infuzinio tirpalo koncentratui (gamintojas Merck Sharp & Dohme (MSD))

- **Tirpalų ruošimas:**

- 1. Kalibravimo tirpalas**

Programinės įrangos kalibravimas užtikrina tyrimo rezultatų patikimumą, todėl šiam tyrimui pagamintas specialus kalibravimo tirpalas iš įvairių cheminių junginių. Nustatyta, kad meropenemo, ertapenemo bei jų molekulinė formų masės svyruoja nuo 300 iki 600 Da, tad šio tirpalo paruošimui parinkti junginiai, kurių molekulinės masės taip pat svyruoja nuo 100 iki 700 Da (2 lentelė). Jų masių spektras vertintas kaip standartas (13 pav.).

2 lentelė. Kalibravimo tirpalo junginių molekulinės masės

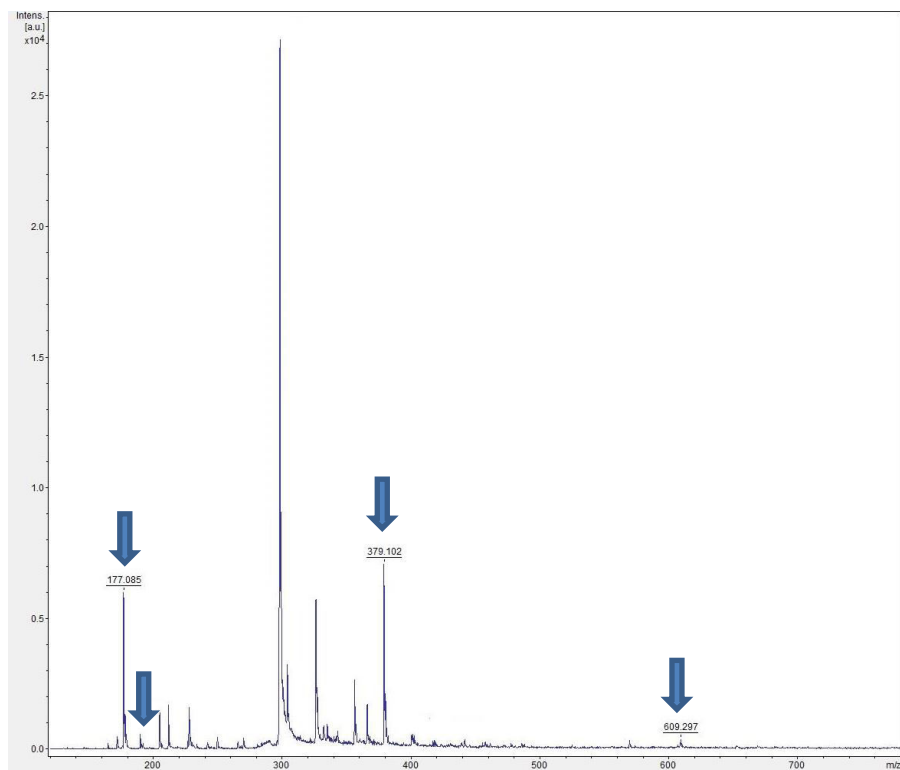
<b>Junginys</b>	<b>Molekulinė masė (Da)</b>
Cmp1 + [H]	177,06
CCA + [H]	190,05
2CCA + [H]	379,09
Rezerpinas + [H]	609,27

- 2. Standartinis tirpiklis (SS)**

Šis tirpiklis buvo reikalingas matricos ruošimui. 500  $\mu$ L acetonitrilo (ACN) sumaišyta su 25  $\mu$ L trifluoroacto rūgštimi (TFA) ir 475  $\mu$ L dejonizuoto vandens.

- 3. Matricos tirpalas**

300  $\mu$ L SS supilta į gamintojo paruoštą  $\alpha$ -ciano-4-hidroksicinamono rūgšties (HCCA) mėgintuvėlį ir maišyta tol, kol rūgšties milteliai visiškai ištirpo.



13 pav. Kalibravimo tirpalo masių spektras. Rodyklės žymi cheminių junginių masių smailes

#### 4. Inkubaciniai tirpalai

Karbapenemai yra nestabilūs, greitai degraduojantys vaistai, todėl tyrimas turėjo būti atliktas per 4 valandas nuo antibiotikų praskiedimo. Dėl šios priežasties kiekvieno tyrimo atlikimo laikas derintas su VUL SK 3-iojo Reanimacijos ir intensyviosios terapijos skyriaus kolektyvu, iš kurio buvo gaunamas skiestas meropenemo tirpalas ir iš karto ruošiamas inkubacinis tirpalas. Tyrime naudoti du skirtingi karbapenemai, tad jų inkubacijos tirpalai taip pat skyrėsi.

##### a) Meropenemas

Kiekvieną kartą ruoštas skirtingas galutinio meropenemo tirpalo kiekis, bet visada tuo pačiu būdu: reanimacijos skyriuje 20 mg meropenemo skiesta su 1000 mL fiziologinio NaCl tirpalu (0,9 %), tad pirminė antibiotiko tirpalo koncentracija buvo 50 mg/mL. Pagal mokslininkų rekomendacijas, karbapenemazių nustatymui reikalinga 50 kartų mažesnė koncentracija – 1 mg/mL (3 lentelė). Dėl to iš reanimacijos skyriaus gautas tirpalas dar kartą buvo skiestas fiziologiniu NaCl tirpalu (0,9 %), o galiausiai – dejonizuotu vandeniu, nes inkubaciniame tirpale NaCl koncentracija turėjo būti dvigubai mažesnė nei fiziologiniame tirpale.



3 lentelė. Skirtingų antibiotikų tirpalų ruošimo rekomendacijos

<b>Antibiotikas</b>	<b>Galutinė antibiotiko tirpalo koncentracija (mg/mL)</b>	<b>Inkubacijos laikas (val.)</b>
Ampicilinas	3	2
Piperacilinas	0,5	2
Cefotaksimas	0,5	2
Ceftazidimas	0,25	3–4
Ertapenemas	0,1	2
Meropenemas	1	2

### **b) Ertapenemas**

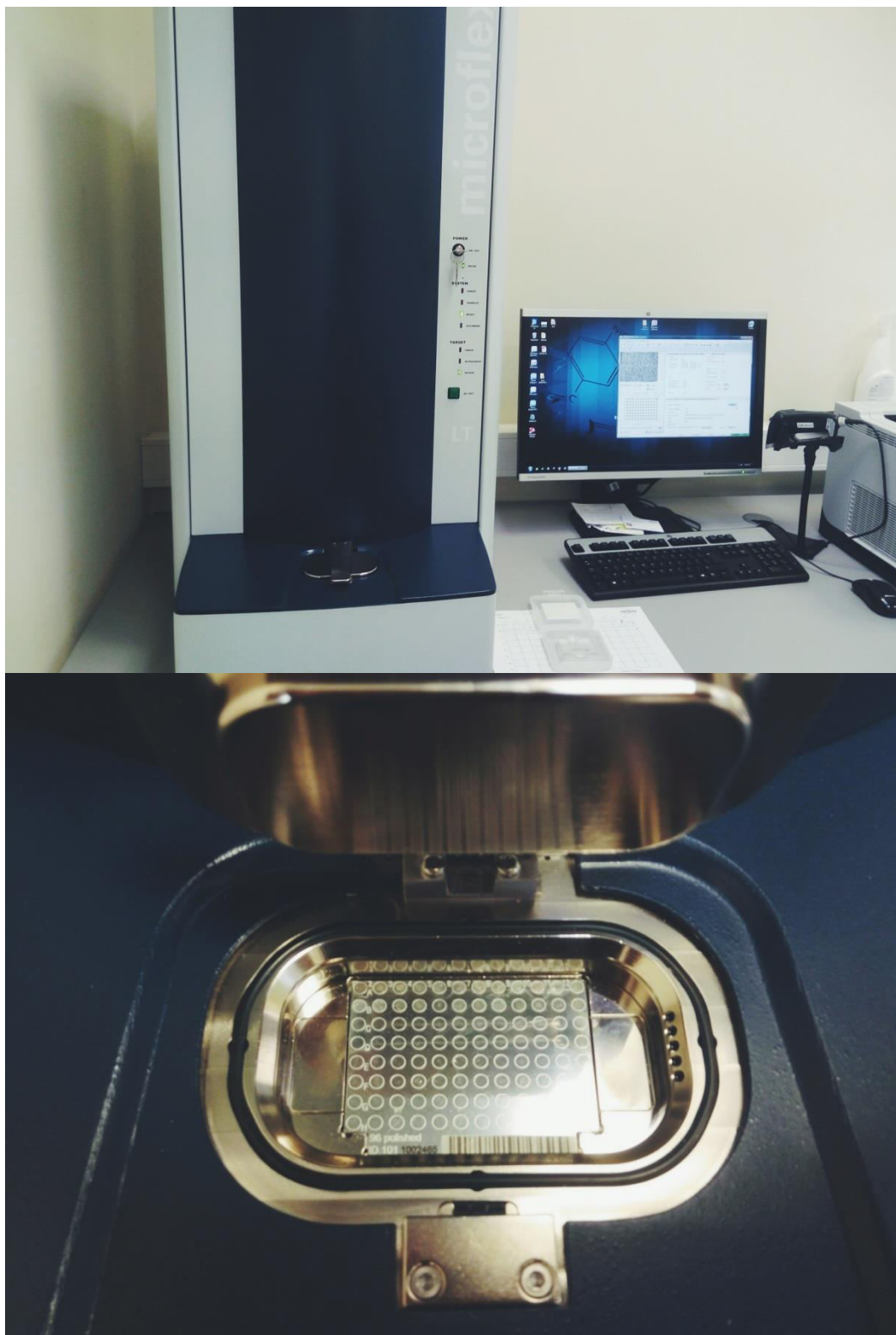
Ertapenemo milteliai skiesti inkubaciniame cinko chlorido ir amonio bikarbonato tirpale, kuris prieš tai buvo ruošiamas laboratorijoje. Galutinė cinko chlorido koncentracija tirpale turėjo būti 10 µg/mL, o praskiesto ertapenemo – 0,1 mg/mL (3 lentelė). Šiuo atveju amonio bikarbonatas naudotas kaip šarminis buferis (pH=8–9).

- **Paruoštų mėginių inkubacija**

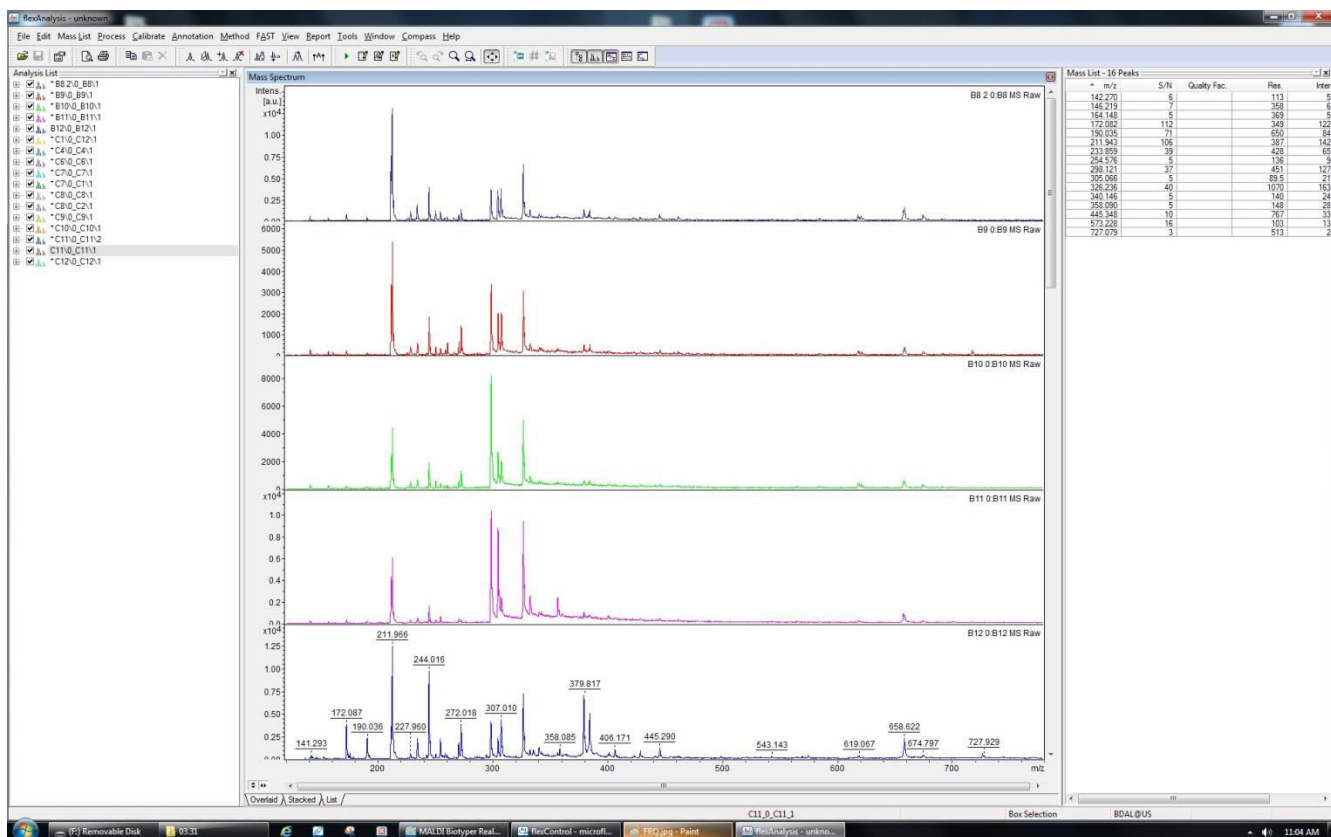
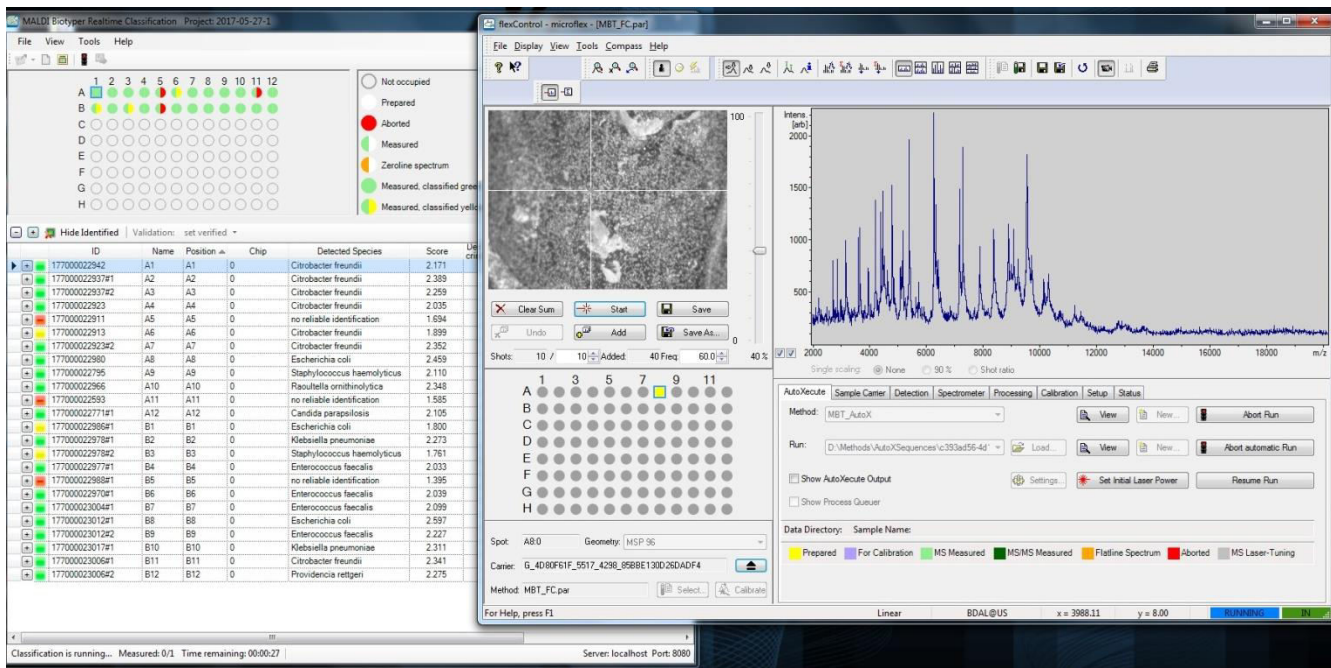
Su steriliomis mikrobiologinėmis kilpelėmis buvo imama po 1 µL bakterijų kultūros ir sumaišoma su 50 µL meropenemo tirpalu Eppendorf tipo mėgintuvėlyje. Visi paruošti mėginiai 5 sekundes maišyti mėgintuvėlių maišyklėje ir vėliau inkubuoti 2 valandas +36°C±1°C laipsnių termostate. Praėjus inkubacijos laikui, mėginiai buvo centrifuguojami (2 minutes, 13 000 apsisukimų/min.). Tokiu pačiu būdu bakterijos inkubuotos ertapenemo tirpale.

- **MALDI-TOF MS plokštelės pildymas**

Kiekvienam mėginiui buvo skiriama po 2 plokštelės laukelius. Iš pradžių lašinti teigiamos ir neigiamos kontrolių bei kalibravimo tirpalai, o vėliau pildyti mėginių laukeliai. Į kiekvieną iš jų lašinta po 1 µL supernatanto ir buvo laukiama, kol išdžius kambario temperatūroje. Vėliau ant išdžiūvusių laukelių lašinta po 0,5 µL matricos ir taip pat laukta išdžiūvimo. Tyrimui paruošta plokštelė buvo dedama į MALDI-TOF masės spektrometrą (14 pav.). Toliau eksperimentas atliktas su trimis programinėmis įrangomis: *flexControl*, *Biotyper RTC* (automatizuoto tyrimo paleidimas) bei *flexAnalysis* (masių spektrų analizė) (15 pav.)



14 pav. MALDI-TOF masės spektrometras (viršuje) ir metalinė plokštelė su mėginiais (apačioje)



15 pav. MALDI-TOF programinės įrangos: *flexControl* ir *Biotyper RTC* (viršuje) bei *flexAnalysis* su masių spektrais (apačioje)

### 3. TYRIMO REZULTATAI

Iš viso tyrimo laikotarpiu per 2015–2017 m. atrinkta 165 *Pseudomonas* spp. bakterijų atsparių karbapenemams. Pagal rūšinę sudėtį 97% sukėlėjų buvo *P. aeruginosa*, 1,8% – *P. putida*, po 0,6% – *P. monteillii* ir *P. veronii*. MALDI-TOF MS metodu nustatytos 34 teigiamos bakterijų kultūros (20,61%) iš 165, kurios sintetino karbapenemazes ir eksperimento metu sugebėjo hidrolizuoti karbapenemų klasės antibiotikus.

#### 3.1. MALDI-TOF masių spektrų analizė

Kiekvienos *P. aeruginosa* bakterijų kultūros masių spektras analizuotas pagal Bruker įmonės parengtas MBT STAR-BL programinės įrangos masių verčių lenteles (4 ir 5 lentelės). Skirtingos  $\beta$ -laktamų hidrolizuotų formų masių vertės apibūdina karbapenemazių aktyvumą arba jų nebuvimą bakterijose. Interpretuojant gautus rezultatus, visos nustatytos masių vertės vertintos tik kaip sveikieji skaičiai (dešimtainės reikšmės nevertintos).

Analizuojant meropenemo tirpale inkubuotų bakterijų masių spektrus, ieškota trijų masių smaيليų:

- 1) 384,5 Da (prisijungus protonui prie  $\beta$ -laktamo žiedo);
- 2) 406,5 Da (prisijungus Na molekulei);
- 3) 428,5 Da (prisijungus dviem Na molekulėms) (16 pav.).

Jeigu šios vertės buvo aptinkamos, *P. aeruginosa* bakterijų kultūra laikyta nehidrolizuojančia meropenemo ir negaminančia karbapenemazių. Be to, toks masių spektras turėjo atitikti neigiamos kontrolės masių spektrą.

Teigiamos kultūros nustatytos pagal dvi masių smailes:

- 1) 358,5 Da (prisijungia protonas);
- 2) 380,5 Da (prisijungia Na molekulė) (17 pav.).

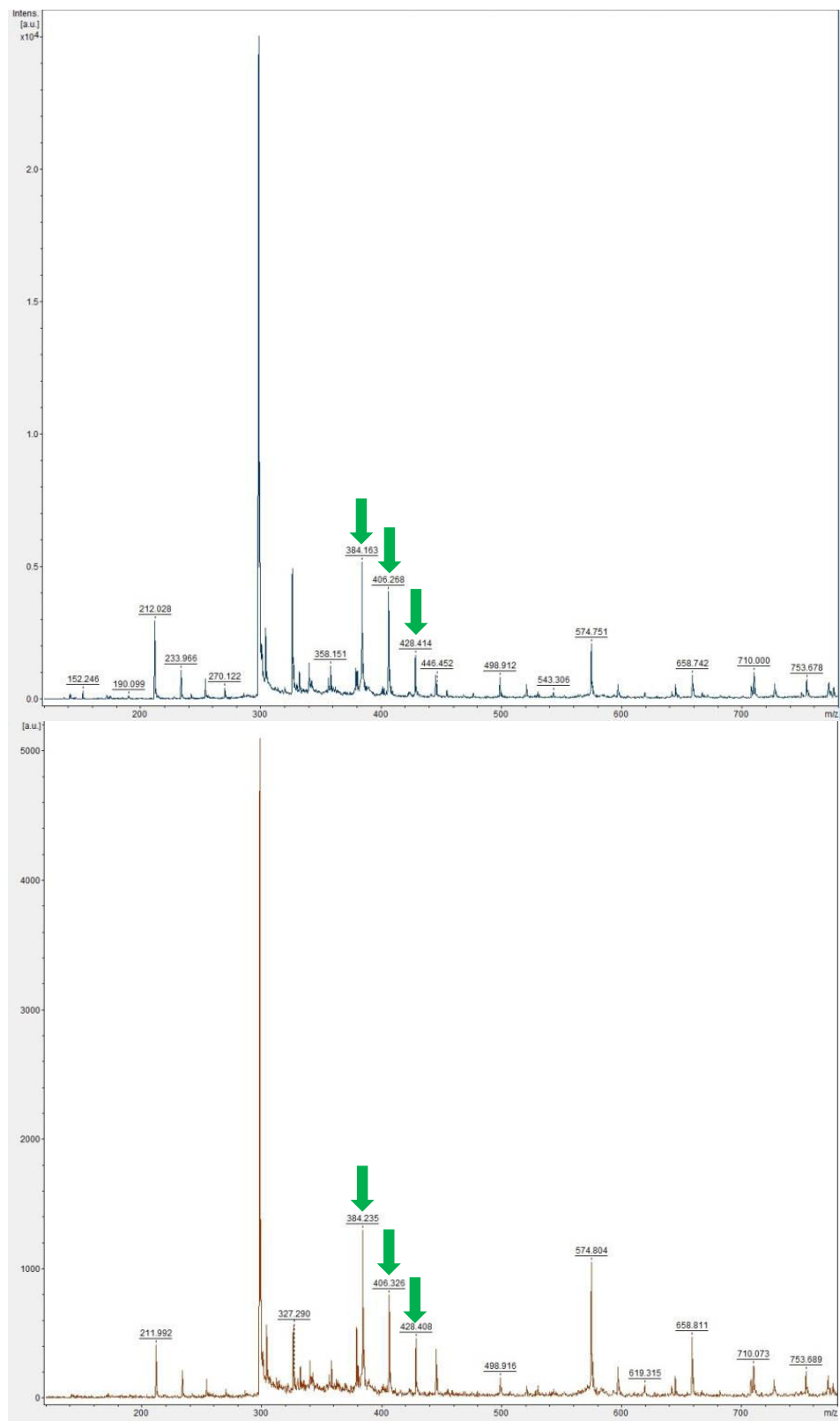
Jeigu šios vertės buvo aptinkamos masių spektre, o nehidrolizuoto meropenemo smailių neužfiksuota, tokia *P. aeruginosa* bakterijų kultūra laikyta teigiama – hidrolizuojančia meropenemą ir gaminančia karbapenemazes. Toks pats masių spektras nustatytas teigiamoje kontrolėje.

4 lentelė. Antibiotikų molekulinės formos ir jų masės (Da), rodančios nehidrolizuotus antibiotikus (\* X = acetilas cefotaksimui; X = piridinas ceftazidimui)

Antibiotikas	Nehidrolizuotus antibiotikus apibūdinančios masių vertės							
	[g/mol]	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	[M+2Na] <sup>+</sup>	[M+Na+K] <sup>+</sup>	[M+3Na] <sup>+</sup>	[M-X*+H] <sup>+</sup>
Ampicilinas	349,4	350,4	372,4		394,4			
Piperacilinas	517,5	518,5	540,5		562,5			
Cefotaksimas	455,5	456,5	478,5					396,5
Ceftazidimas	546,6	547,6						468,6
Ertapenemas	475,5	476,5	498,5	514,5	520,5	536,5	542,5	
Meropenemas	383,4	384,5	406,5		428,5			

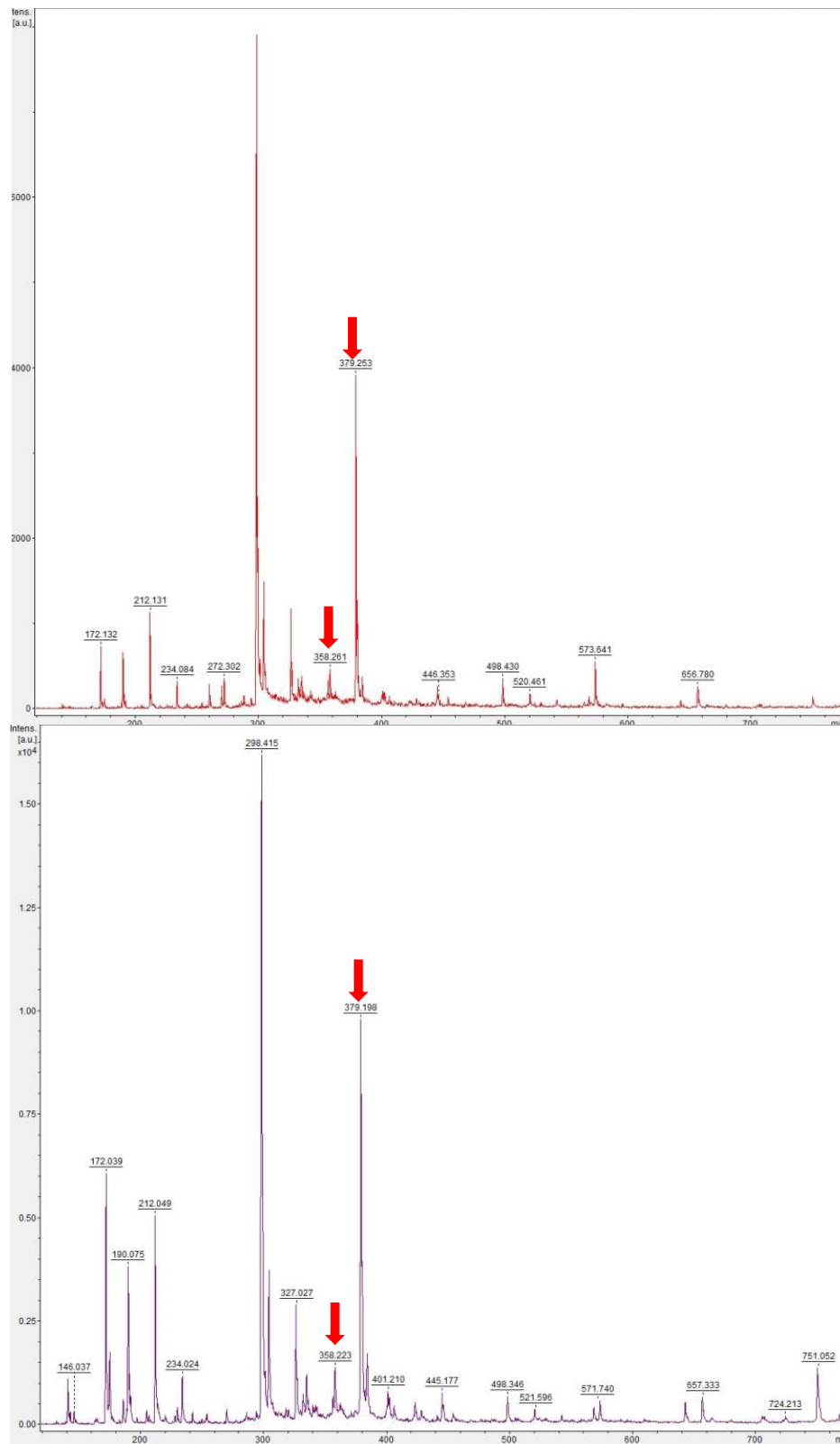
5 lentelė. Antibiotikų molekulinės formos ir jų masės (Da), apibūdinančios antibiotiko cheminį pokytį paveikus karbapenemazėms (hidr. = hidrolizuotas; dekarb. = dekarboksilintas)

Antibiotikas	Atsparumą antibiotikams apibūdinančios masių vertės								
	[M <sub>hidr.</sub> +H] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr.</sub> +Na] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr.</sub> +2Na] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr.</sub> +Na+K] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr./dekarb.</sub> +H] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr.</sub> -X*+H] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr./dekarb.</sub> -X*+H] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr./dekarb.</sub> +Na] <sup>+</sup>	[M <sub>hidr./dekarb.</sub> +K] <sup>+</sup>
Ampicilinas	368,4	390,4	412,4		324,4				
Piperacilinas	536,5	558,5	580,5		(492,5)				
Cefotaksimas						414,5	370,5		
Ceftazidimas						486,6	442,6		
Ertapenemas	494,5	516,5	538,5	554,5	450,5			472,5	488,5
Meropenemas					358,5			380,5	



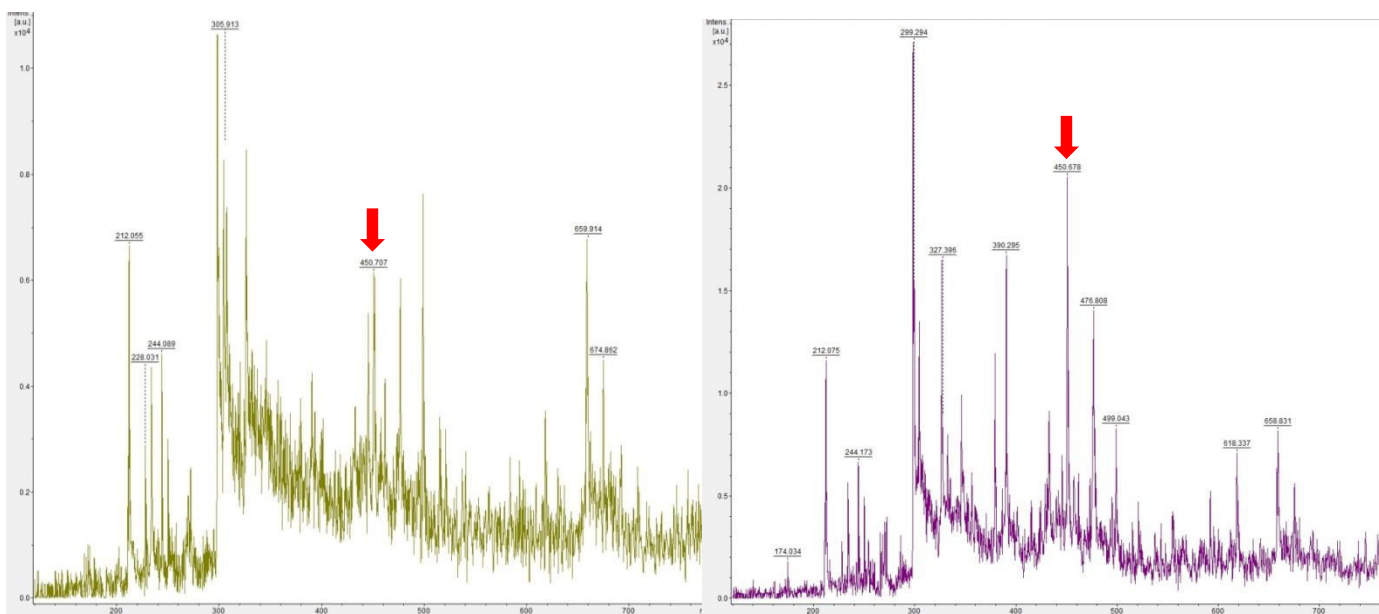
16 pav. Karbapenemazių negaminančių *Pseudomonas aeruginosa* masių spektrų pavyzdžiai.

Rodyklės žymi nehidrolizuoto antibiotiko masių smailes



17 pav. Karbapenemazes gaminančios *Pseudomonas aeruginosa* masių spektrų pavyzdžiai.  
Rodyklės žymi hidrolizuoto meropenemo masių smailes

Norint palyginti skirtingų karbapenemų masių spektrus, visos *P. aeruginosa* kultūros inkubuotos su ertapenemu. Tačiau, šio tyrimo dalis nebuvo vertinama ir analizuojama, kadangi visuose mėginiuose aptiktas aukšto lygio triukšmo fonas (18 pav.). Be to, visuose spektruose nustatyta nespecifinė hidrolizė rodanti smailė (450,5 Da), nors jokių kitų hidrolizė apibūdinančių verčių nenustatyta. Taip galėjo atsitikti dėl pašalinių junginių, esančių ertapenemo milteliuose, kurie galėjo reaguoti su antibiotiku ir jį suskaidyti. Ar bakterija hidrolizuoja antibiotiką turėtų rodyti mažiausiai trys atitinkamos masių vertės. Šiuo atveju, masių spektrai nebuvo įtraukti į tyrimo rezultatų analizę.



18 pav. *Pseudomonas aeruginosa* masių spektrai po inkubacijos su ertapenemu. Rodyklės žymi ertapenemo nespecifinę hidrolizę

## 3.2. Preanaliziniai veiksniai

### 3.2.1. Antibiotiko koncentracija

Kiekvieno tiriamo antibiotiko koncentracija turi būti tiksli ir atitikti metodikos reikalavimus (3 lentelė). Jeigu vaistų koncentracija yra per didelė, mėginių rezultatai bus klaidingai neigiami, nes 1  $\mu$ L atsparių bakterijų nesugebės hidrolizuoti tokio didelio antibiotiko



kiekio. Jeigu vaistų koncentracija per maža, visi rezultatai bus klaidingai teigiami – antibiotikas nepaveiks net jautrių bakterijų.

### **3.2.2. Antibiotiko cheminės savybės**

Svarbiausias veiksnys, kuris lemia tyrimo sėkmę ir rezultatų tikslumą yra antibiotikų cheminės savybės. Karbapenemai aktyvūs 8 valandas nuo jų praskiedimo laiko, tačiau tyrimo rezultatai parodė, jog jau po 4 valandų antibiotikas tampa neveikliu. Tokiu atveju, skiedžiant vaistą, reikia kuo greičiau paruošti mėginius tyrimui ir sunaudoti visą paruoštą antibiotiko tirpalą. Šiame etape labai svarbus buvo slaugytojų vaidmuo, kurios skiedavo ir atnešdavo antibiotiką iš reanimacijos į laboratoriją.

Remiantis moksline literatūra, ertapenemas yra mažiau stabilus už meropenemą [17, 33]. Manome, kad tai viena iš priežasčių, kodėl tikslesni tyrimo rezultatai gauti tiriant *P. aeruginosa* su meropenemu. Taip pat yra prielaida, kad ertapenemo milteliai galėjo būti užteršti kitais junginiais (nepilnai išvalyti nuo priemaišų), kurie iškreipė masių spektrą ir nespecifiškai hidrolizavo vaistą bei užgožė hidrolizės reakciją su karbapenemazėmis.

Taip pat nerekomenduojama šaldyti karbapenemų šaldiklyje ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) arba laikyti juos šaldytuve ( $+4^{\circ}\text{C}$ ), nes jie vis tiek suyra arba kristalizuojasi. Tokie antibiotikai netinkami tyrimui.

### **3.2.3. Inkubacinio tirpalo sudėtis**

Tiriant karbapenemazių aktyvumą MALDI-TOF MS metodu, neįmanoma nustatyti sintetinių fermentų klasių. Yra žinoma, kad skirtingų klasių karbapenemazės turi skirtingą aktyvų centrą, todėl jų aktyvinimui reikalingi nevienodi inkubaciniai tirpalai. Pavyzdžiui, B klasės fermentams reikalingi cinko jonai, todėl inkubacinio tirpalo sudėtyje turi būti cinko chloridas. Tačiau, jeigu bakterijos sintetina kitos klasės karbapenemazės, tokiu atveju cinko jonai gali jungtis prie antibiotiko ir iškreipti rezultatus – masių spektre bus matomos nespecifinės masių smailės. Dėl šios priežasties, kiekvieno tyrimo metu patartina ruošti dviejų tipų inkubacinius tirpalus (su fiziologiniu tirpalu ir su cinko chloridu) ir kiekvieną mėginį tirti dviejuose skirtinguose tirpaluose.

### **3.2.4. Matricos tirpalo sudėtis**

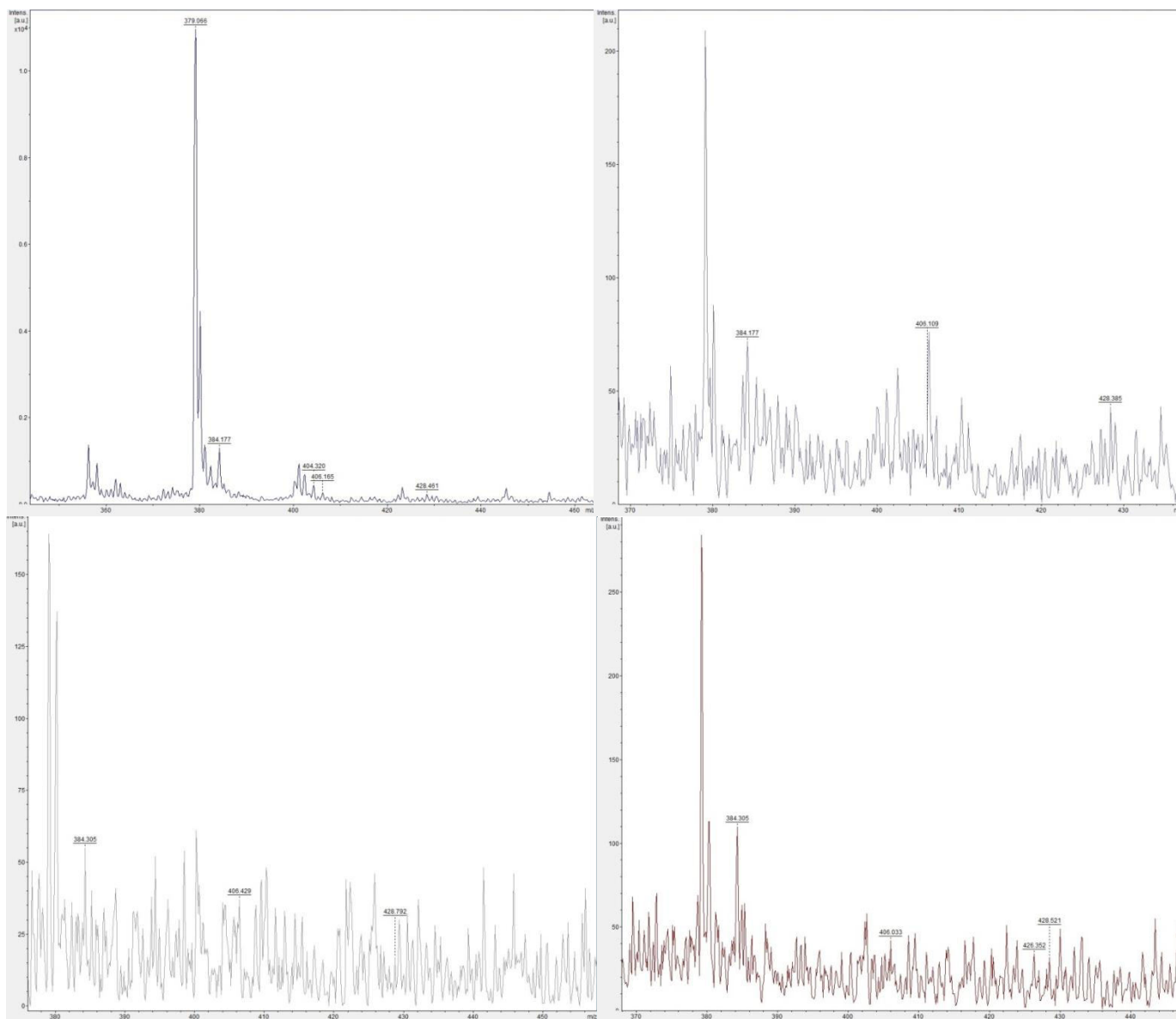
Rutininiame darbe naudojamas matricos tirpalas, kurio sudėtyje yra 50% ACN ir 2,5% TFA. Tačiau, pagal MBT STAR–BL metodiką, pastarosios rūgšties turi būti žymiai mažiau – 0,1%. Tokiu atveju bakterijos yra mažiau pažeidžiamos ir karbapenemazės ilgesnį laiką išlieka

veiklios. Taip pat pastebėta, kad kiekvienas tyrimas turi būti atliekamas su tą pačią dieną paruoštu matricos tirpalu. Tuomet masių spektrai būna ryškūs, vertės tikslesnės, o tai didina rezultatų patikimumą. Tyrimo metu pastebėta, kad rezultatai priklauso nuo matricos tirpalo paruošimo ir jo sunaudojimo laiko, bet ne nuo lašinamo tūrio. Tokiu atveju, galima naudoti rutininio darbo matricos tirpalą, bet užtat mažesniais kiekiais (vietoje 1  $\mu\text{L}$ , lašinama 0,2–0,5  $\mu\text{L}$  – sumažinamas TFA rūgšties poveikis tiriamoms bakterijoms).

### **3.2.5. Kalibravimo tirpalo sudėtis**

Pats svarbiausias tyrimo etapas yra kalibravimas. Jeigu MALDI-TOF masių spektrometro detekcijos rodmenų patikrinimas nepavyksta, kokybiškai įvertinti rezultatų neįmanoma. Atliekant karbapenemazių aktyvumo nustatymą MALDI-TOF MS metodu, kalibravimą geriausia atlikti su specialiu antibiotikų kalibravimo tirpalu (MBT STAR-ACS) arba bakterijų standartinio testo (BTS) tirpalu. Abu šie tirpalai yra pagaminti Bruker įmonės ir skirti atlikti masių spektrometro kokybės kontrolę. Tai pat galima pagaminti tirpalą su skirtingos molekulinės masės junginiais. Svarbiausia yra tai, jog šių junginių masių ribos nebūtų mažesnės už 100 Da ir neviršytų 1000 Da. Atsižvelgiant į tiriamo antibiotiko ir jo molekulinę formų masių vertes, parenkami tik panašios molekulinės masės junginiai.

Dėl įvairių preanalizinių ir cheminių veiksnių, kurie buvo aptarti šiame skyriuje, kai kurie masių spektrai buvo nekokybiški, be konkrečių masių smailių ir visiškai netinkami analizei (inkubacija su meropenemu) (19 pav.). Tokiu atveju, tyrimas buvo kartojamas.



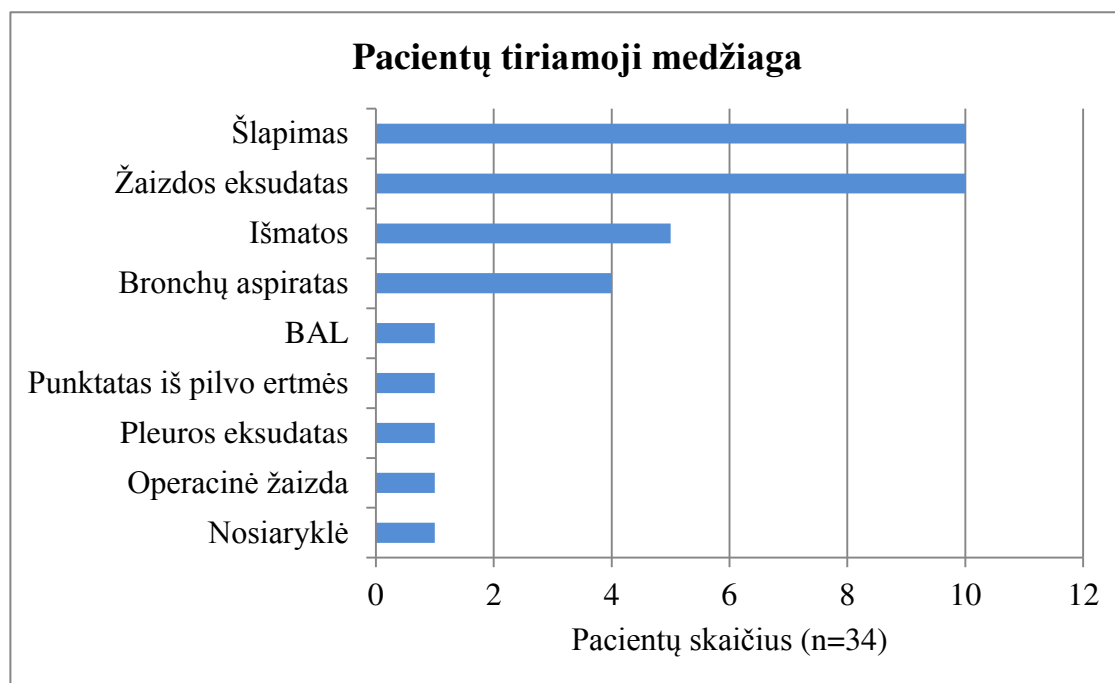
19 pav. Netinkamų analizei *Pseudomonas aeruginosa* bakterijų masių spektrų pavyzdžiai

### 3.3. Pacientų duomenų analizė

Duomenų analizė atlikta tik su teigiamų (karbapenemazes gaminančių) *P. aeruginosa* kultūrų grupe (n=34). Visi mėginių ir pacientų duomenys pateikti 1–3 prieduose.

Šiame tyrime naudotos 2015–2017 m. bakterijų kultūros: 44,12% visų teigiamų *P. aeruginosa* buvo iš 2015 m. mėginių, 47,06% – 2016 m. ir tik 8,82% – 2017 m.

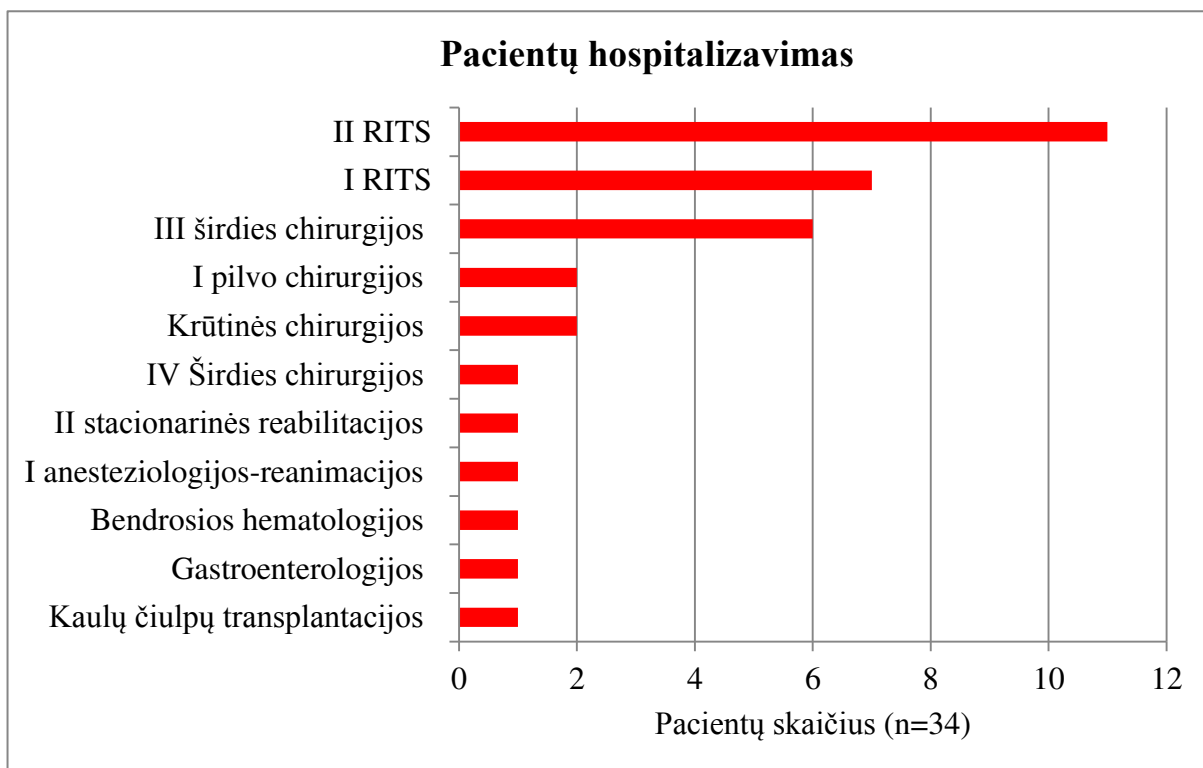
Analizuojant duomenis pagal pacientų tiriamąją medžiagą, iš 34 karbapenemazėms teigiamų bakterijų kultūrų, daugiausiai *P. aeruginosa* nustatyta šlapime ir žaizdų eksudatuose (20 pav.). Pagal tai galima spręsti, kad šie patogenai dažniausiai sukėlė šlapimo takų infekcijas ir kolonizavo žaizdas.



20 pav. *Pseudomonas aeruginosa* pasiskirstymas pagal tiriamąją medžiagą

Analizuojant pacientų hospitalizavimą VUL SK ligoninėje, nustatyta, kad daugiausiai ligonių su karbapenemazes gaminančiomis *P. aeruginosa* sukeltomis infekcijomis gydyta I ir II reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriuose (21 pav.). Reanimuotų pacientų imunitetas dažniausiai nusilpęs, jie gydomi stipresnio poveikio ir platesnio veikimo spektro antibiotikais, o tai yra *P. aeruginosa* atsparumo išsivystymo ir infekcijų plitimo predisponuojantys veiksniai [39].

Taip pat daug tiriamosios grupės pacientų gydėsi įvairiuose chirurgijos skyriuose. Jie galėjo užsikrėsti šiomis bakterijomis operacijų metu per kateterius, intubacinius vamzdelius arba per atviras žaizdas.

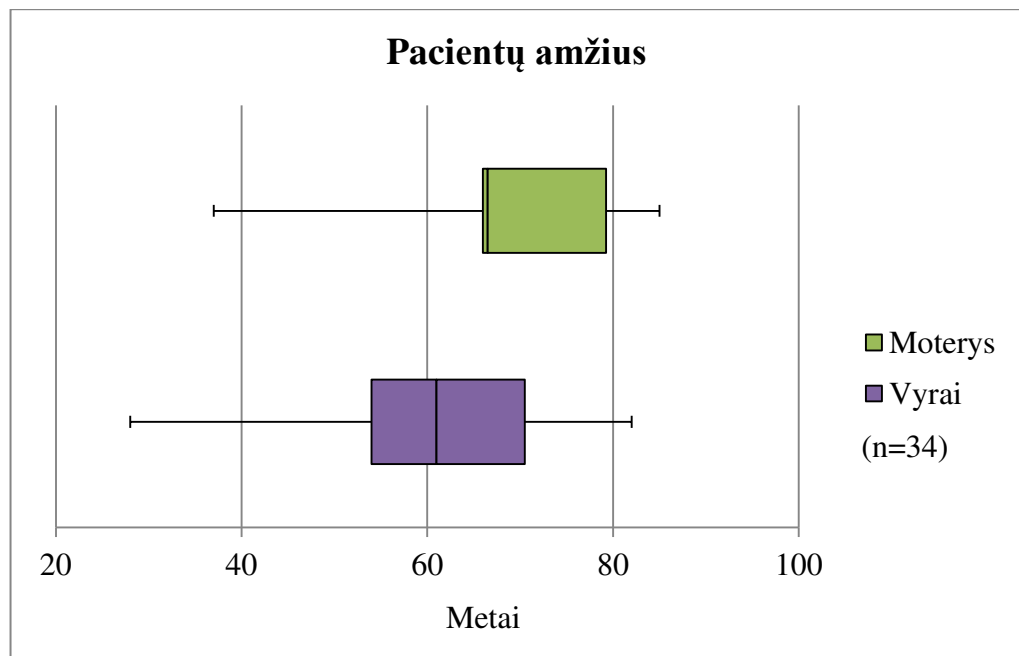


21 pav. Pacientų, su karbapenemazes gaminančiomis *Pseudomonas aeruginosa* bakterijomis, pasiskirstymas pagal ligoninės skyrius

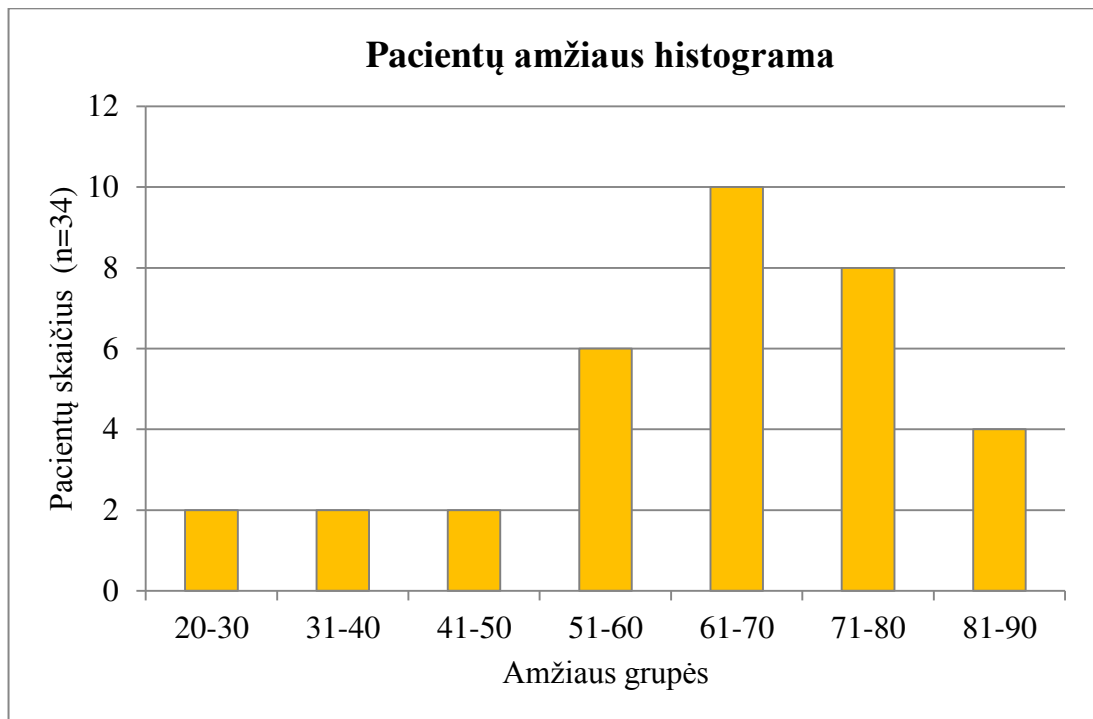
Pacientai taip pat buvo suskirstyti pagal lytį ir amžių (22 ir 23 pav.). Nustatyta, kad didžiąją ligonių dalį (70,59%) sudarė vyrai, o trečdalį (29,41%) – moterys. Amžiaus vidurkiai ir dispersijos tarp vyrų ir moterų skyrėsi statistiškai nereikšmingai (atitinkamai  $p=0,785$  ir  $p=0,127$ ).

Pusę visų tiriamųjų (52,94%) sudarė pacientai, kurių amžius svyruoja nuo 61 iki 80 metų (22 pav.). Vidutinis visų tirtų žmonių amžius buvo 62 metai (moterų amžiaus vidurkis siekė 68 m., vyrų – 60 m.). Jauniausias pacientas – 28 m., o vyriausias – 85 m.

Įvertinus šiuos duomenis galima daryti išvadą, jog vyrai yra labiau linkę sirgti *P. aeruginosa* sukeltomis infekcijomis nei moterys, o pagal amžių – vyresni nei 60 metų amžiaus žmonės.



22 pav. Pacientų, su karbapenemazes gaminančiomis *Pseudomonas aeruginosa* bakterijomis, pasiskirstymas pagal lytį ir amžių



23 pav. Pacientų, su karbapenemazes gaminančiomis *Pseudomonas aeruginosa* bakterijomis, amžiaus grupės

## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Tyrimo metu iš 165 *P. aeruginosa* bakterijų, karbapenemazes gamino tik penktadalis. Nėra žinoma, kokios priežastys galėjo nulemti tokius rezultatus, nes tai buvo kokybinis tyrimas ir visas dėmesys skirtas naujo MALDI-TOF MS metodo įdiegimui ir tobulinimui. Tačiau, priešasčių galėjo būti daug: įvairūs preanaliziniai veiksniai, silpnas antibiotikų poveikis tiriamų *P. aeruginosa* padermėms arba kiti bakterijų atsparumo mechanizmai, kurių neįmanoma nustatyti MALDI-TOF MS metodu.

Daugiausiai *P. aeruginosa* nustatyta šlapime ir žaizdų eksudatuose. Žaizdose *P. aeruginosa* galėjo atsirasti nuo nesterilių medicininių prietaisų arba dėl pacientų ir ligoninės personalo higienos stokos. Žinoma, jog šios lazdelės gali būti komensalai žmonių virškinamajame trakte, todėl dideli jų kiekiai gali būti randami išmatose [24, 39]. Taip pat įrodyta, kad *P. aeruginosa* nesunkiai kolonizuoja kvėpavimo takus [39]. Mūsų tyrimas patvirtina kitų autorių duomenis: iš išmatų buvo išskirta 5 *Pseudomonas* spp., o iš bronchų aspirato - 4. Tokie ligoniai dažniausiai vartoja imunosupresantus arba serga gretutinėmis ligomis [24, 27, 39].

Kalbant apie pacientų su karbapenemazes gaminančiomis *P. aeruginosa* bakterijomis hospitalizavimą, tyrimo rezultatai rodo, jog *P. aeruginosa* aktyviau plinta ligoninėse nei visuomenėje, o jų sukeltos ligos priskiriamos prie hospitalinių susirgimų. Ligoninėse šis patogenas ant sausų paviršių gali išgyventi nuo 6 valandų iki 16 mėnesių – tai sąlygoja jo atsparumo mechanizmų įvairovė [39].

*P. aeruginosa* atsparumas gali būti paveldėtas arba įgytas. Paveldėtas atsparumas siejamas su pagrindiniais mechanizmais: sumažėjusio membranos pralaidumu, suaktyvėjusiais arba mutavusiais išmetimo siurbliais ir antibiotikus hidrolizuojančių fermentų sinteze [21, 27]. MALDI-TOF MS metodu galima nustatyti tik karbapenemazių aktyvumą, bet kiti mechanizmai gali užgožti fermentų veikimą ir rezultatai gali būti klaidingai neigiami. Remiantis moksline literatūra, aptariami keli pagrindiniai mechanizmai, kurie stipriau veikia antibiotikus nei  $\beta$ -laktamazės.

Žinoma, jog *P. aeruginosa* ekspresuoja skirtingus išmetimo siurblius. Jie sudaryti iš trijų dalių: transporterio, esančio citoplazminėje membranoje ir naudojančio protoną kaip energijos šaltinį; jungiančio baltymo, esančio periplazminiame sluoksnyje; išorinės membranos porino (Opr). Tačiau, OprD porino praradimas susijęs tik su atsparumu imipenemui. Įdomu ir tai, jog praradus šį poriną, meropenemas vis tiek paveikia patogeną. Tai reiškia, kad skirtingi karbapenemai patenka per skirtingus porinus ir skirtingus antibiotikus veikia skirtingi atsparumo mechanizmai: meropenemas

deaktyvuojamas išmetimo siurbliais, o imipenemas – negali praeiti pro mutavusį OprD poriną [21, 27].

Kitas mechanizmas, kuris būdingas *P. aeruginosa* bakterijoms ir trukdo aptikti karbapenemazes yra porinai. Nors didžioji dalis bakterijų turi daug nespecifinių porinų, praleidžiančių visas hidrofilines molekules, bet *P. aeruginosa* atveju yra atvirkščiai – daugiausiai yra specifinių. Šie geba keisti vaistų įsiskverbimo kryptį, todėl aktyviai išmeta juos iš ląstelės [24, 27].

Tiriant įvairius karbapenemus ir jų poveikį *P. aeruginosa* bakterijoms, pastebėta, kad ertapenemas silpniau veikia nei meropenemas ar imipenemas. Taip pat žinoma, kad atsparumas ertapenemui išsivysto daug greičiau nei kitiems karbapenemams [17, 33]. Pagal EUCAST rekomendacijas, karbapenemazių nustatymo tyrimui geriausiai tinka meropenemas, nes jis pasižymi geriausiu jautrumo ir specifiškumo santykiu. Ertapenemas yra labiau nestabilus, reikalauja jautresnio metodo ir labiau tinkamas tirti *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijas [11]. Dėl visų šių priežasčių, meropenemas geriausiai atspindi karbapenemazių aktyvumą ir tai įrodo šio tyrimo rezultatai.

Didžiausią grėsmę pacientams kelia įgytas *P. aeruginosa* atsparumas, kurį lemia mutavusių nechromosominių elementų importas. Taip pat žinoma, kad net per vieną gydymo kursą, *P. aeruginosa* gali įgyti atsparumą antibiotikams [14]. Norint užkirsti kelią atsparių bakterijų plitimui, tikslinga profilaktiškai tirti imunosupresinius, reanimuotus ligonius ir pacientus po transplantacijos. Tiriamuosius reikėtų izoliuoti bent jau iki rezultatų gavimo. Taip pat reikėtų nebevartoti neefektyvių antibiotikų, dažniau plauti rankas, o ligoninės personalui laikytis griežtų higienos taisyklių ir dirbti steriliai.

Kai kurie mokslininkai teigia, kad atsižvelgus į atsparumo antibiotikams riziką, kol kas geriausias  $\beta$ -laktaminis vaistas gydant *P. aeruginosa* sukeltas infekcijas yra meropenemas [24]. Taip yra dėl to, jog atsparumą meropenemui lemia ne viena, o mažiausiai dvi mutacijos – porino OprD praradimas ir pakitę išmetimo siurbliai [21, 24, 27]. Tačiau, meropenemas turi įtakos *P. aeruginosa* morfologijos pokyčiams, kurie gali sąlygoti atsparumo išsivystymą (susidaro siūlinės ląstelės, keičiasi membrana ir vaistas negali jungtis prie PBP). Šie pokyčiai priklauso nuo meropenemo koncentracijos ir vartojimo laiko [21, 27].

Kalbant apie antrąją tyrimo dalį, kuri buvo skirta naujo MALDI-TOF MS metodo įdiegimui VUL SK mikrobiologijos laboratorijoje, reikia pabrėžti, kad šis karbapenemazių detekcijos metodas jau plačiai taikomas užsienio šalyse. Nors šiuo metu publikuota daugiau nei 1 000 įvairių



karbapenemazių detekcijos protokolų, iki šiol nenustatyta vieno veikimo algoritmo, o visi rekomenduojami metodai turi savų trūkumų [35].

Lyginant tradicinius karbapenemazių nustatymo metodus ir naują MALDI-TOF MS analizės būdą, rezultatai reikšmingai nesiskiria [37]. Šis metodas pagreitina ligų diagnostiką, nes tą pačią dieną bakterijos identifikuojamos ir nustatoma jų karbapenemazių gamyba. Tyrimas yra automatizuotas ir užtrunka vos porą valandų, o rezultatų interpretavimas nėra sudėtingas. Taip yra dėl to, jog kiekvieno vaisto masių spektras yra unikalus, tad jų nereikia lyginti tarpusavyje. Be to, rezultatų analizė yra tiksli – vertinamos skaitinės reikšmės, kurias nustato masių spektrometras, o ne žmogus. Tačiau, yra keli metodo trūkumai: tuo pačiu metu negalima identifikuoti bakterijos rūšies ir nustatyti kitų atsparumo mechanizmų, kurie taip pat ir užgožia karbapenemazių veikimą, sąlygoja klaidingai neigiamus rezultatus.

Yra nuomonių, jog šis metodas neturi jokios klinikinės reikšmės, nes vien tik karbapenemazių detekcija bakterijose nėra jų atsparumo įrodymas. Tačiau, šių fermentų nustatymas leidžia parinkti efektyviausią gydymo taktiką. Visų pirma, reikėtų atidžiai įvertinti E-testų MIK vertes arba diskų difuzijos zonų skersmenis. Jei *Enterobacteriaceae* šeimos atstovų tyrimo atveju meropenemo MIK daugiau nei 0,12 mg/L arba disko zonos skersmuo didesnis nei 27 mm, tada šią bakteriją būtina tirti dėl karbapenemazių aktyvumo. Antra, nustačius antibiotikus hidrolizuojančius fermentus bakterijose, šį faktą būtina pranešti klinacistams ir infekcijų kontrolės specialistams. Tokiu atveju, pacientams turėtų būti taikoma kombinuota terapija su mažiausiai dviem vaistais (vienas iš jų turi būti karbapenemas). Nustatyta, jog kombinuota terapija yra efektyvesnė nei monoterapija [28]. Tačiau, tokios terapijos efektyvumas priklauso nuo infekcijos židinio vietos, sukėlėjo, pasirinko karbapenemo, vaistų dozavimo ir gretutinių ligų.

Nepaisant visų privalumų, naujas  $\beta$ -laktamazių aktyvumo nustatymo būdas MALDI-TOF masių spektrometru nepakeis referentinių metodų, nes atsparumo antibiotikams mechanizmas yra kompleksinis ir reikia kritiškai vertinti rezultatus.

## IŠVADOS

1. Masių spektrometrijos metodu MALDI-TOF ištyrus VUL Santaros klinikų atsparias karbapenemams *P. aeruginosa* bakterijas nustatyta, kad šių padermių karbapenemazių sintezė nėra dažnas reiškinys, o atsparumas turėtų būti sietinas su kitais mechanizmais.

2. Remiantis skirtingų karbapenemų (meropenemo ir ertapenemo) palyginamąja analize nustatyta, kad tikslesni rezultatai gauti tiriant meropenemą. *P. aeruginosa* gaminamos karbapenemazės sugebėjo deaktyvuoti antibiotiką, o jo molekulinės masės pokytis užfiksuotas masių spektre.

3. MALDI-TOF MS karbapenemazių aktyvumo nustatymo metodas yra greitas ir tikslus, o masių spektrų interpretavimas nesudėtingas. Tačiau, tyrimo sėkmė priklauso nuo preanalizinių veiksnių ir kitų atsparumo mechanizmų.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Albiger B., Glasner C., Struelens M. J., Grundmann H., Monnet D. L., the European Survey of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(45).
2. Bassetti M., Righi E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? *Hematology*, 2013. p. 428-432.
3. Burckhardt I., Zimmermann S. Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2,5 hours. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2011, p. 3321–3324.
4. Cantón R., Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L., Baquero F., Coque T. M. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbial Infect* 2008; 14 (Suppl. 1): 144–153.
5. Cantón R., Akova M., Carmeli Y., Giske C. G., Glupczynski Y., Gniadkowski M. et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbial Infect* 2012; 18: 413–431.
6. Coque T. M., Baquero F., Cantón R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Eurosurveillance*, Vol. 13, Issue 47, 20 November (2008).
7. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology reviews* 36 (2012): 380–407.
8. De Carolis E., Vella A., Vaccaro L., Torelli R., Spanu T., Fiori B., Posteraro B., Sanguinetti M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(9): 1081–1088.
9. Doi Y., Peterson D. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Author manuscript. *Semin Respir Crit Care. Med.* 2015 February; 36(1):74–84.
10. Donskey C.J. Antibiotic Regimens and Intestinal colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:S62–9.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Eucast guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0, 2013.

12. Falagas M. E., Lourida P., Poulidakos P., Rafailidis P. I., Tansarli G. S. Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Systematic Evaluation of the Available Evidence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 58, No. 2, February (2014): 654–663.
13. Frickmann H., Masanta W. O., Zautner A. E. Emerging Rapid Resistance Testing Methods for Clinical Microbiology Laboratories and Their Potential Impact on Patient Management. *BioMed Research International*, Vol. 2014. Article ID: 375681
14. Fusté E., López-Jiménez L., Segura C., Gainza E., Vinuesa T., Viñas M. Carbapenem-resistance mechanisms of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology* (2013), 62:1317–1325.
15. Hansen F., Hammerum A. M., Skov R. L., Giske Ch. G., Sundsfjord A., Samuelsen O. Evaluation of Rosco Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *The Authors AMPIS*, 2012; 120:724–732.
16. Hong D.J., Bae I.K., Jang I., Jeong S.H., Kang H.-K., Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 2015; 47(2):81–97.
17. Hrabak J., Chudačková, R. Walkova. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 26, No. 1, January (2013): 103-114.
18. Jung J.S., Eberl T., Sparbier K., Lange C., Kostrzewa M., Schubert S., Wieser A. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *Eur J Clin Microbial Infect Dis*, 2013.
19. Kanj S. S., Kanafani Z. Current concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing *Enterobacteriaceae*, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clinic Proceedings*, March 2011;86(3):250–259.
20. Kostrzewa M., Sparbier K., Maier T., Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin. Appl.* 2013, 7, 768–778.

21. Lambert P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the Royal Society of Medicine, 2002, Supplement No. 41, Vol. 95: 22–26.
22. Lewis J.K., Wei J., Siuzdak G. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry; 2000. p. 5880–5894.
23. Lima T. B., Pinto M. F. S., Ribeiro S. M., de Lima L. A., Viana J. C., Junior N. G. et al. Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. The FASEB Journal article fj. 12-221127; 2013 Vol. 27.
24. Livermore D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Antimicrobial Resistance CID 2002:34.
25. Makuška R. Polimerų tyrimo metodai. Metodinė priemonė. Vilnius; 157–162 p.
26. Marvin L.F., Roberts M.A., Fay L. B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Clinica Chimica Acta 334 (2003): 11–21.
27. Meletis G., Exindari M., Vavatsi N., Sofianov D., Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. 2012, Hippokratia; 16,4:303–307.
28. Morrill H. J., Pogue J. M., Kaye K. S., LaPlante K. L. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. CRE Treatment, OFID: 1–15.
29. Murray P. R. What is new in clinical microbiology – microbial identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 14, No. 5, September 2012: 419–423.
30. Nordmann P., Naas T., Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerging Infectious Diseases, Vol. 17, No. 10, October (2011): 1791–1798.
31. Nordmann P., Poirel L., Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerging Infectious Diseases, Vol. 18, No. 9, September (2012): 1503–1507.
32. Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C. G., Poirel L., Woodford N., Miriagou V. and the European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbial Infect 2012; 18:432–438.

33. Papp-Wallace K. M., Endimiani A., Taracila M. A., Bonomo R. A. Carbapenems: Past, Present and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Vol. 55, No. 11 (2011): 4943–4960.
34. Perez F., Van Duin D. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A menace to our most vulnerable patients. *Cleve Clin J Med*. 2013 April; 80(4):225–233.
35. Quennan A. M., Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, July 2007: 440–458.
36. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Viridi J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* Vol. 6 2015; 6:791.
37. Sparbier K., Schubert S., Weller U., Boogen Ch., Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay of Rapid Detection of Resistance against  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *J. Clin. Microbiol.* 2012, 50(3):927–937.
38. Tanwar J., Das Sh., Fatima Z., Hameed S. Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* Volume 2014, Article ID 541340.
39. Trautmann M., Halder S., Hoegel J., Royer H., Haller M. Point-of-use filtration reduces endemic *Pseudomonas aeruginosa* infections on a surgical intensive care unit. *Am J Infect Control.* 2008; 36:421–429.
40. Xu Y., Gu B., Huang M., Liu H., Xu T., Xia W., Wang T. Epidemiology of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) during 2000–2012 in Asia. *Journal of Thoracic Disease*, 2015;7(3):376–385.

## Karbapenemazių fenotipinis nustatymas masių spektrometrijos metodu

### Santrauka

Šio darbo tikslas buvo nustatyti karbapenemazių aktyvumą masių spektrometrijos metodu *Pseudomonas* genties bakterijose, išskirtose VUL Santaros klinikų pacientams.

Remiantis Bruker įmonės rekomendacijomis, šiam tyrimui atlikti sukurta nauja MALDI-TOF programinė įranga, gebanti nustatyti karbapenemazių aktyvumą. Masių spektrai analizuoti pagal gamintojų parengtą metodiką – ieškota specifinių masių smailių, kurios atitiktų skirtingų karbapenemų molekulinę formų molekulinės mases. Pagal šias masių vertes bakterija vertinta kaip jautri (negaminanti karbapenemazių) arba atspari (gaminanti karbapenemazes).

Tyrimo metu (2015–2017 m.) iš 165 karbapenemams atsparių *P. aeruginosa* bakterijų kultūrų, 34 (20,61%) gamino antibiotikus hidrolizuojančius fermentus. Daugiausiai patogenų išskirta iš šlapimo ir žaizdų eksudatų (po 10 bakterijų), mažiau iš išmatų ir bronchų aspirato (atitinkamai 5 ir 4 bakterijos). Tyrimo rezultatai taip pat parodė, kad didžioji dalis pacientų su karbapenemazes gaminančiomis *P. aeruginosa* bakterijomis gydyti reanimacijos ir intensyvios terapijos (52,94%) bei chirurgijos (32,35%) skyriuose. Daugiau nei pusę tiriamųjų (70,59%) sudarė vyrai, o įvertinus pacientų amžių nustatyta, kad vyresni nei 60 metų amžiaus žmonės turi didžiausią riziką susirgti *P. aeruginosa* sukeltomis infekcijomis.

Tyrimo metu pastebėta, kad rezultatai priklauso nuo įvairių preanalizinių veiksnių: antibiotiko koncentracijos ir jo praskiedimo laiko; karbapenemų cheminių savybių; inkubacinio, kalibravimo ir matricos tirpalų sudėties. Taip pat svarbu žinoti, kad MALDI-TOF masių spektrometras nesugeba nustatyti visų *P. aeruginosa* atsparumo mechanizmų, dėl kurių karbapenemazių aktyvumas gali būti užgožtas.

Nepaisant visų MALDI-TOF MS karbapenemazių aktyvumo nustatymo privalumų (tyrimas trunka 2 valandas, o masių spektrai lengvai interpretuojami), kol kas šis metodas nėra pritaikytas diagnostikoje.

## **Application of Mass Spectrometry in Phenotypic Detection of Carbapenemases**

### Summary of Master's thesis

The aim of this thesis was to determine activity of carbapenemases in *Pseudomonas* spp. isolates using mass spectrometry.

There was created a new MALDI-TOF software based on Bruker's recommendations, which was able to detect activity of carbapenemases. Mass spectra were analyzed according to Bruker's procedure: there was been searching for the specific mass peaks which corresponded to the molecular weight of different carbapenem molecular forms. According to these values bacteria were assessed as sensitive (non-producing carbapenemases) and resistant (producing carbapenemases).

During study period in 2015–2017 there was collected 165 carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolates and 34 of them (20,61%) were producing hydrolyzing enzymes. Most of microorganisms were isolated from urine and wound exudate, less from stool and bronchial aspirate. The results also showed that majority of patients with carbapenem resistant *P. aeruginosa* strains were treated in units of intensive care (52,94%) and surgery (32,35%). More than a half of patients (70,59%) were men. Furthermore, the highest risk to be infected with *P. aeruginosa* had patients, who were over 60 years old.

It was found that results of this study depended on lots of factors: concentration of antibiotic and its dilution time; chemical properties of carbapenems; composition of matrix, incubation and calibration solutions. It is important to note that MALDI-TOF mass spectrometer could not detect all the mechanisms of resistance in *P. aeruginosa*, so they could interfere detection of carbapenemases.

Despite all the advantages of MALDI-TOF mass spectrometry in detection of carbapenemases (it lasts about 2 hours and it is easy to analyse mass spectra), this method has not being used in diagnostics yet.



## PRIEDAI

1 priedas: Pacientų skaičius su karbapenemazes gaminančiomis *Pseudomonas aeruginosa* bakterijomis įvairiuose ligoninės skyriuose ir poskyriuose

VUL SK skyriai (poskyriai)	Pacientų skaičius
I reanimacijos ir intensyvios terapijos (RITS)	17
II reanimacijos ir intensyvios terapijos (RITS)	17
Kaulų čiulpų transplantacijos	11
I pilvo chirurgijos	9
Bendrosios hematologijos	7
Krūtinės chirurgijos	7
III širdies chirurgijos	7
Pulmonologijos ir alergologijos	6
Nefrologijos ir inkstų transplantologijos	5
Dermatovenerologo konsultacijų kabinetas	5
Nefrologo konsultacijų kabinetas	4
Urologo konsultacijų kabinetas	4
Autologinės kaulų čiulpų transplantologijos	4
Dermatovenerologijos	3
Intensyvios kardiologijos, reanimacijos ir intensyvios terapijos	3
Ortopedijos traumatologijos	3
Hepatologijos ir gastroenterologijos	3
Urologijos	3
IV širdies chirurgijos	2
Intensyvios pulmonologijos	2
Diagnostikos centras	2
Kraujagyslių chirurgijos	2
II vidaus ligų	2
LOR ligų gydytojo konsultacijų kabinetas	2
II stacionarinės reabilitacijos	2
Akių ligų gydytojo konsultacijų kabinetas	2
I stacionarinės reabilitacijos	1
Hematologijos ir onkologijos dienos stacionaro	1
Plastinės ir rekonstrukcinės chirurgijos	1
Gastroenterologijos	1
III reanimacijos ir intensyvios terapijos (RITS)	1
II pilvo chirurgijos	1
Vidaus ligų diagnostikos	1
I anesteziologijos ir reanimacijos	1
II anesteziologijos ir reanimacijos	1
III anesteziologijos ir reanimacijos	1
Mokami tyrimai	4

1 priedo tęsinys

<b>VUL SK Vaikų ligoninės skyrius</b>	<b>Pacientų skaičius</b>
I vaikų intensyvios terapijos	1
<b>Nacionalinio vėžio instituto skyriai</b>	
Krūtinės chirurgijos ir onkologijos	4
Anesteziologijos, reanimacijos ir operacinės	3
Onkoginekologijos	2
Onkourologijos	1
Chemoterapijos	1
<b>Kitos ligoninės</b>	
<b>Pacientų skaičius</b>	
VšĮ Mykolo Marcinkevičiaus ligoninė	5
VšĮ Respublikinė Vilniaus psichiatrijos ligoninė	2

2 priedas: Tiriamosios medžiagos įvairovė ir pacientų skaičius su karbapenemazes gaminančiomis *Pseudomonas aeruginosa* bakterijomis

<b>Tiriamoji medžiaga</b>	<b>Pacientų skaičius</b>
Šlapimas	35
Žaizdos eksudatas	29
Išmatos	23
Bronchų aspiratas	18
Iš trofinės opos	12
Kraujas	9
Skrepliai	8
Punktatai	7
Iš išorinės ausies landos	4
Bronchoalveolinis lavažas (BAL)	3
Stentas	2
Pleuros eksudatas	1
Skystis iš dreno	1
Tracheostomos skystis	1
Operacinė žaizda	1
Nuo liežuvio	1
<b>Kita</b>	
<b>Pacientų skaičius</b>	
Pūliai	3
Pilvo ertmė	2
Kvėpavimo takai	2
Nosis, nosiaryklė	2
Akis	1

3 priedas: Visų pacientų, su karbapenemazes gaminančiomis *Pseudomonas aeruginosa* bakterijomis, amžiaus duomenys

<b>Lytis</b>	<b>Vyrai</b>	<b>Moterys</b>
Pacientų skaičius	100	65
Jauniausias pacientas	3 m.	21 m.
Vyriausias pacientas	87 m.	90 m.
Vidutinis amžius	56 m.	65 m.
Bendras vidutinis amžius	59 m.	



## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

**EVELINA GORBIKOVA**

was attending the training of

**MASS SPECTROMETRY-BASED METHOD FOR RAPID  
DETECTION OF BETA-LACTAMASE ACTIVITY IN  
MICROBIAL CULTURES (INCLUDING THEORETICAL  
BACKGROUND AND PRACTICAL APPLICATION)**

10 hours

August 12-13, 2016

Tallinn, Estonia



Anne Sirge

Head of the Department of Education and Training  
East Tallinn Central Hospital

Tallinn, 13.August 2016