

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.847>

<https://orcid.org/0009-0000-3768-9401>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Karolina Bielskė

Bakterijų atsparumą antibiotikams lemiančių veiksnių nustatymas imunologiniais metodais

DAKTARO DISERTACIJA

Technologijos mokslai,
Chemijos inžinerija (T 005)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2020–2024 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Europos regioninės plėtros lėšos (EUREKA, projekto nr. 01.2.2-MITA-K-702-05-0003) pagal dotacijos sutartį su Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra (MITA).

Mokslinė vadovė – prof. dr. Aurelija Žvirblienė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Edita Sužiedėlienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

Dr. Rima Budvytytė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005),

Prof. dr. Rimantas Daugelavičius (Vytauto Didžiojo universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005),

Dr. Algirdas Grevys (Thermo Fisher Scientific, technologijos mokslai, chemijos inžinerija, T 005),

Prof. dr. Modestas Ružauskas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, agrariniai mokslai, veterinarija, A 002).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. gruodžio mėn. 4 d. 11 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje ir/arba nuotoliniu būdu. Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekose ir VU interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

VILNIUS UNIVERSITY

Karolina Bielskė

Immunodetection of Factors Conferring Bacterial Resistance to Antibiotics

DOCTORAL DISSERTATION

Technological Sciences,
Chemical Engineering (T 005)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2020 and 2024 at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biotechnology.

The research was supported by European Regional Development Fund (Project EUREKA No. 01.2.2-MITA-K-702-05-0003) under grant agreement with Agency for Science, Innovation and Technology.

Academic supervisor – Prof. Dr. Aurelija Žvirblienė (Vilniaus University, Technological Sciences, Chemical Engineering (T 005).

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

Chairman – Prof. Dr. Edita Sužiedėlienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

Members:

Dr. Rima Budvytytė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005),

Prof. Dr. Rimantas Daugelavičius (Vytautas Magnus University, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005),

Dr. Algirdas Grevys (Thermo Fisher Scientific, Technological Sciences, Chemical Engineering, T 005),

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

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 11 hour on 4 December 2025 in Room R401 of the Life Sciences Center (Vilnius University). Address: Sauletekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	8
ĮVADAS.....	10
MOKSLINIS NAUJUMAS	12
GINAMIEJI TEIGINIAI	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Atsparumas antimikrobiniam junginiam.....	14
1.1.1. Kovos su antimikrobinio atsparumu veiksmų planas.....	16
1.1.2. Efektyvių antibiotikų trūkumo problema	17
1.1.3. Antibiotikai ir jų klasifikavimas.....	19
1.1.4. Bakterijų atsparumo antibiotikams mechanizmai	21
1.1.5. β -laktamazės.....	24
1.1.6. AmpC β -laktamazės.....	28
1.1.7. Metalo β -laktamazės	31
1.2. Bakterijų atsparumo antibiotikams klinikinė diagnostika	32
1.2.1. AmpC ir metalo β -laktamazių klinikinė diagnostika	36
1.2.2. MAK ir jų taikymas	38
1.2.3. Imunochromatografijos testo taikymas diagnostikai.....	40
1.2.4. Dviejų fotonų sužadinimo technologijos (TPX) taikymas diagnostikai	41
1.2.5. Biojutiklių taikymas diagnostikai	43
1.2.6. Bakteriofago baltymas gp39 ir jo taikymas chimerinių baltymų konstravimui.....	44
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI.....	46
2.1. Medžiagos	46
2.1.1. Reagentai.....	46
2.1.2. Buferiniai tirpalai ir terpės	46
2.1.3. Rekombinantiniai baltymai	49
2.1.4. Antikūnai.....	49
2.1.5. Rinkiniai.....	49
2.1.6. Fermentai, žymės	50
2.1.7. Molekulinės masės standartai	50
2.1.8. Pradmenys, genai ir vektoriai.....	50

2.1.9. Sintetiniai peptidai	52
2.1.10. Ląstelių linijos.....	53
2.1.11. Eksperimentiniai gyvūnai	53
2.1.12. Genų inžinerijos darbams naudoti bakterijų kamienai.....	54
2.1.13. Bakterijų izoliatai.....	54
2.2. Metodai	55
2.2.1. MAk kūrimui naudoti metodai.....	55
2.2.2. MAk apibūdinimo ir baltymų tyrimų metodai	57
2.2.3. Genų inžinerijos ir molekulinės biologijos metodai	63
2.2.4. Antikūnų ir baltymų sąveikos modeliavimas	69
2.2.5. Duomenų bazės ir programiniai įrankiai.....	69
3. Rezultatai	71
3.1. MAk prieš β -laktamazes kūrimas, apibūdinimas ir taikymas diagnostinių sistemų kūrimui	71
3.1.1. Rekombinantinių β -laktamazių sintezė ir gryninimas.....	71
3.1.2. MAk prieš β -laktamazes kūrimas	73
3.1.3. MAk specifiskumo ir giminingumo tyrimai imunocheminiais metodais	74
3.1.5. MAk atranka imunologinių analitinių sistemų kūrimui	80
3.1.6. MAk reaktyvumo su natyviomis β -laktamazėmis tyrimas, naudojant bakterijų izoliatus	82
3.1.7. MAk kryžminio specifiskumo tyrimas.....	85
3.1.8. MAk neutralizuojančių savybių tyrimas	94
3.1.9. MAk variabiliųjų sričių nustatymas.....	95
3.1.10. MAk taikymas dviepitopės IFA kūrimui	97
3.1.11. MAk taikymas imunochromatografinio testo kūrimui.....	101
3.1.12. MAk taikymas TPX sistemoje	105
3.2. Plataus reaktyvumo MAk prieš β -laktamazes kūrimas ir apibūdinimas	110
3.2.1. Chimerinio antigeno sintezė ir apibūdinimas.....	110
3.2.2. Plataus reaktyvumo MAk kūrimas ir apibūdinimas imunocheminiais metodais	112
3.2.3. Plataus reaktyvumo MAk epitopų patikslinimas ir analizė.....	117
REZULTATŲ APTARIMAS	127

IŠVADOS.....	134
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	135
PRIEDAI	153
<i>SUMMARY</i>	175
PADĖKA.....	180
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	181
PRANEŠIMŲ KONFERENCIJOSE SĄRAŠAS.....	181
GYVENIMO APRAŠYMAS.....	182

SANTRUMPOS

ACT – AmpC tipo β -laktamazė (angl., *AmpC-type-lactamase*);
AMR – antimikrobinis atsparumas (angl., *antimicrobial resistance*);
Ar. – aminorūgštis;
AST – jautrumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymas (angl., *antimicrobial susceptibility testing*);
BLDB – β -laktamazių duomenų bazė (*Beta-Lactamase DataBas*);
BSA – jaučio serumo albuminas;
 β -ME – β -merkaptioetanolis;
CDR1–3 – hipervariabiliosios sritys (angl., *complementarity-determining regions 1–3*);
CHAPS – 3-((3-cholamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfonatas;
CLSI – Klinikinių laboratorinių standartų institutas (angl., *Clinical Laboratory Standards Institute*);
CMY – cefamiciną hidrolizuojanti β -laktamazė (angl., *CephaMYcin-hydrolyzing-lactamase*);
DHA – Dahrano ligoninės Saudo Arabijoje β -laktamazė (angl., *Dhahran Hospital in Saudi Arabia-lactamase*);
DHA-1_{77–93} – DHA-1 β -laktamazės homologiškas 77–93 ar. regionas;
DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle terpė (angl., *Dulbecco's Modified Eagle Medium*);
DMSO – dimetilsulfoksidas;
DTT – ditionitritolis;
EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidis;
ESBLs – padidinto spektro β -laktamazės (angl., *extended-spectrum β -lactamases*);
FVS – fetalinis veršelio serumas (angl., *foetal calf serum*);
HAT – hipoksantinas, aminopterinas ir timidinas;
HRP – krienų peroksidazė (angl., *horseradish peroxidase*);
HT – hipoksantinas ir timidinas;
IFA – imunofermentinė analizė;
IgG – imunoglobulinų G klasės antikūnai;
IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas;
 K_d – tariamoji disociacijos konstanta;
kDNR – kopijinė DNR;
KT – kambario temperatūra;
LB – Luria Bertani mitybinė terpė;
MAk – monokloninis antikūnas;
MAk-Au – MAk ir aukso nanodalelių konjugatas;
MAk-HRP – MAk ir krienų peroksidazės konjugatas;

MBL – metalo β -laktamazė (angl., *metallo- β -lactamase*);
 MBP – maltozę surišantis baltymas (angl., *maltose binding protein*);
 MIC – minimali augimą slopinanti koncentracija (angl., *minimum inhibitory concentration*);
 NDM – Naujojo Delio metalo β -laktamazė (angl., *New Delhi metallo- β -lactamase*);
 NFA – nepilnas Freundo adjuvantas;
 OT – optinis tankis;
 PBP – su penicilinu besijungiantis baltymas (angl., *penicillin binding protein*);
 PBS – fosfatų buferinis tirpalas;
 PBST – fosfatų buferinis tirpalas su 0,1 % *Tween-20*;
 PDC – angl. trump. *Pseudomonas-Derived Cephalosporinases*;
 PEG – polietilenglikolis;
 PFA – pilnas Freundo adjuvantas;
 PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas;
 PSO – Pasaulio sveikatos organizacija;
 PVDF – polivinildifluoridas;
 rACT-14 – rekombinantinė ACT-14 β -laktamazė;
 RAK – rekombinantiniai antikūnai;
 rCMY-34 – rekombinantinė CMY-34 β -laktamazė;
 rDHA-1 – rekombinantinė DHA-1 β -laktamazė;
 RE – restrikcijos endonukleazė;
 rMBP-ADC-144 – su maltozę surišančiu baltymu sulieta rekombinantinė ADC-144 β -laktamazė;
 rNDM-1 – rekombinantinė NDM-1 β -laktamazė;
 rPDC-195 – rekombinantinė PDC-195 β -laktamazė;
 SDS-PAGE – angl. trump. *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*;
 SPR – paviršiaus plazmonų rezonansas (angl., *surface plasmon resonance*);
 Sulfo-NHS – N-hidroksisulfosukcinimidas;
 TAE – Tris-acetatinis buferinis tirpalas;
 TEMED – tetrametiletilendiaminas;
 TK – timidinkinazė;
 TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas;
 TPX – dviejų fotonų sužadinimo mikrofluorimetrinė technologija (angl., *two-photon microfluorometric technology*);
 VH – sunkiosios grandinės variabilioji sritis;
 VL – lengvosios grandinės variabilioji sritis.

IVADAS

Bakterijų atsparumas antimikrobiniais vaistams, remiantis Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, yra viena didžiausių šio amžiaus grėsmių žmogaus sveikatai pasaulyje. Šiuo metu apie 4,95 mln. mirčių per metus yra siejamos su antibiotikams atsparių bakterijų sukeltomis infekcijomis. Prognozuojama, kad šis skaičius iki 2050 m. išaugs iki 10 mln. ir viršys šiuo metu daugiausiai gyvybių nusinešančio vėžio sukeltų mirčių skaičių. Visuomenėje, sveikatos priežiūros įstaigose bei žemės ūkyje plačiai naudojant antimikrobinis preparatus, bakterijos sparčiai įgyja naujus atsparumo antibiotikams mechanizmus. Problemą taip pat didina naujų ir veiksmingų antibiotikų trūkumas bei sudėtinga jų paieška ir licencijavimas. Todėl bakterijų įgyjamas atsparumas antibiotikams lemia šių vaistų neveiksmingumą ir kelia grėsmę plačiai paplitusių infekcinių ligų išgydymo galimybei. Ateityje antimikrobinio atsparumo (AMR) problema gali lemti sunkiai valdomus bakterinių infekcijų protrūkius.

Siekiant spręsti AMR problemą, remiantis PSO rekomendacijomis, reikalingi inovatyvūs ir veiksmingi atsparumo antibiotikams tyrimai ir diagnostiniai įrankiai. Šiuo metu sveikatos priežiūros sistemoje apie 60 % naudojamų antibiotikų sudaro β -laktaminiai antibiotikai, todėl diagnostiniais taikiniai gali būti pasirenkami šiuos antibiotikus hidrolizuojantys bakterijų atsparumo antibiotikams veiksniai – β -laktamazės. Pažangių diagnostinių sistemų kūrimui, kaip molekuliniai įrankiai, gali būti naudojami β -laktamazės specifiški monokloniniai antikūnai (MAK). MAK taikymas imunologiniams detekcijos metodams leistų greitai, nesudėtingai ir atrankiai nustatyti β -laktamazės antibiotikams atsparių bakterijų mėginiuose. Šie antikūnai paremti β -laktamazių nustatymo testai gali būti taikomi epidemiologiniams ar atsparumo antibiotikams mechanizmų tyrimams.

Šiame darbe, remiantis PSO pateiktu prioritetinių antibiotikams atsparių patogenų sąrašu, pagal aktualumą ir svarbą buvo atrinkti diagnostiniai taikiniai – bakterijų atsparumą antibiotikams lemiančios AmpC ir metalo β -laktamazės. MAK kūrimui buvo pasitelktos dvi strategijos. Taikant pirmąją, panaudojant *Escherichia coli* susintetintas ir išgrynintas rekombinantines β -laktamazes, hibridomų technologija buvo sukurtos 4 MAK kolekcijos prieš ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34 β -laktamazes. Taikant antrąją strategiją, sukurta plačiu reaktyvumu AmpC β -laktamazės pasižyminčių MAK kolekcija, kurios kūrimui imunogenu buvo panaudotas rekombinantinis chimerinis nanovamzdelius formuojantis bakteriofago baltymas gp39 su įterpta dideliu konservatyvumu tarp AmpC pasižyminčia DHA-1 β -laktamazės 17 aminorūgščių ilgio seka. Sukurtų antikūnų kolekcijos buvo detalai apibūdintos, nustatant jų giminingumą antigenams, reaktyvumą su natyviomis β -laktamazėmis bakterijų izoliatuose, įvertinant šių antikūnų kryžmines reakcijas bei identifikuojant atpažinimo regionus antigenuose. Atrinkti dideliu giminingumu antigenams pasižymintys MAK išbandyti įvairiose imunologinėse analitinėse sistemose, tokiose kaip: kiekybinė

dviepitopė imunofermentinė analizė, greitas imunochromatografinis testas ir dviejų fotonų sužadinimo technologija paremta sistema. Šiems metodams pritaikytų MAk diagnostinis potencialas buvo patvirtintas, juos testuojant su natūralias β -laktamazes produkuojančiais bakterijų izoliatais.

Darbo tikslas: sukurti antikūnus ir imunologinius analitinius metodus bakterijų atsparumą antibiotikams lemiančių veiksnių – β -laktamazių – nustatymui ir juos išbandyti su biologiniais mėginiais.

Uždaviniai:

1. Sukurti monokloninius antikūnus (MAk) prieš rekombinantines *Escherichia coli* bakterijose susintetintas β -laktamazes: ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34.
2. Sukurti plačiu reaktyvumu AmpC β -laktamazėms pasižyminčius MAk, naudojant mielėse susintetintą chimerinį bakteriofago baltymą su įterpta konservatyvia AmpC β -laktamazių seka.
3. Išsamiai apibūdinti sukurtuosius MAk – ištirti jų specifiškumą, giminingumą, epitopų lokalizaciją, taikant imunocheminius, fizikinius ir bioinformatinius tyrimo metodus.
4. Atrinkti tinkamomis savybėmis pasižyminčius MAk ir juos pritaikyti kuriant β -laktamazių nustatymui skirtus imunologinius analizės metodus.
5. Įvertinti MAk diagnostinį potencialą, taikant sukurtus imunologinius metodus β -laktamazes produkuojančių bakterijų izoliatų analizei.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Dėl netinkamo ir perteklinio antibiotikų naudojimo medicinoje ir gyvulininkystėje, bakterijos sparčiai įgyja naujus atsparumo antibiotikams mechanizmus. Todėl bakterijų atsparumo antibiotikams veiksnių – β -laktamazių – nustatymas bakterijų izoliatuose yra svarbus klinikinei diagnostikai, epidemiologiniams ir atsparumo antibiotikams mechanizmų tyrimams. AmpC β -laktamazės vis dažniau aptinkamos sveikatos priežiūros įstaigose, gyvulių ūkiuose ar iš laukinių gyvūnų izoliuotose gramneigiamose bakterijose [1]. Nepaisant to, Klinikinių laboratorinių standartų institutas (angl., *Clinical Laboratory Standards Institute*) iki šiol nėra patvirtinęs AmpC detekcijai skirtų metodinių rekomendacijų. Todėl AmpC β -laktamazės specifiški MAK ir jų taikymas šių baltymų nustatymui turi potencialią diagnostinę vertę. Atsižvelgiant į problematiką, šiame darbe buvo sukurtos ir detalios apibūdintos 4-ios AmpC priklausančioms ACT-14, PDC-195 ir CMY-34 β -laktamazės specifiskų MAK kolekcijos. Taip pat, kaip diagnostinis taikinytis, MAK kūrimui pasirinkta plačiai pasaulyje išplitusi metalo β -laktamazė – NDM-1. Svarbu ir tai, jog MAK prieš ACT-14, PDC-195 ir CMY-34 iki šiol nebuvo aprašyti.

Šiame darbe buvo kryptingai sukurti ir detalios apibūdinti plataus reaktyvumo MAK prieš unikalią DHA β -laktamazių šeimos fermentams būdingą aminorūgščių seką. Ši seka pasižymi dideliu konservatyvumu tarp AmpC β -laktamazių, todėl sukurti MAK, kaip universalūs molekuliniai įrankiai, turi didelę diagnostinę vertę. Šiuo metu identifikuota daugiau nei 63 AmpC β -laktamazių šeimų, kurias sudaro daugiau nei 6780 šių fermentų alelinių variantų, o iš jų daugiau nei 37 priklauso DHA šeimai [2]. Plataus reaktyvumo MAK taikymas β -laktamazių nustatymui suteiktų galimybę vienu molekulinio įrankio nustatyti didelę AmpC baltymų įvairovę. Šiame darbe, antikūnų kūrimo procese imunizacijai panaudotas mielėse susintetintas chimerinis, multimerinę struktūrą formuojantis bakteriofago vB_EcoS_NBD2 uodegėlės baltymas gp39 su įterpta konservatyvia AmpC β -laktamazių seka. Ankstesniais tyrimais parodyta, jog mielėse susintetintas gp39 oligomerizuojasi ir sudaro stabilias nanovamzdenių struktūras bei sukelia stiprų imuninį atsaką laboratorinėms pelėms. Dėl šių ypatybių, nanovamzdeliai, kaip nešikliai, gali būti panaudoti tikslinių baltymų, pavyzdžiui, β -laktamazių, fragmentų eksponavimui [3], [4]. Taigi, šiame darbe aprašytas metodas parodo chimerinių nanovamzdelių taikymo kryptingam MAK kūrimui galimybes. Svarbu pabrėžti, kad iki šiol plataus reaktyvumo MAK prieš β -laktamazes, jų kūrimo strategija ir taikymas šių fermentų nustatymui nebuvo aprašyti.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. *E. coli* susintetintos rekombinantinės β -laktamazės ir mielėse susintetintas chimerinis bakteriofago baltymas gp39 su įterpta konservatyvia β -laktamazių seka sukelia stiprų imuninį atsaką laboratorinėms pelėms ir yra tinkami antigenai MAk kūrimui, taikant hibridomų technologiją.
2. Sukurti MAk prieš β -laktamazes pasižymi dideliu giminingumu ir specifiškumu antigenams bei geba atpažinti natyvias β -laktamazes bakterijų izoliatuose.
3. MAk prieš ACT, NDM, PDC ir CMY β -laktamazes gali būti pritaikyti kuriant imunologinius analitinius metodus, skirtus β -laktamazių kokybiniam arba kiekybiniam nustatymui bakterijų izoliatuose.
4. Plataus reaktyvumo MAk prieš AmpC β -laktamazes gali būti pritaikyti imunojutiklių, skirtų šių β -laktamazių nustatymui, kūrimui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Atsparumas antimikrobiniams junginiams

Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, antimikrobinis atsparumas (angl., *antimicrobial resistance*, AMR) yra viena didžiausių grėsmių žmogaus sveikatai [5]. Antimikrobinės medžiagos, tokios kaip antibiotikai, priešvirusiniai, priešgrybeliniai ar priešparazitiniai vaistai, plačiai naudojamos medicinoje ir žemės ūkyje įvairių infekcinių ligų gydymui ar jų prevencijai. AMR atsiranda, kai bakterijos, virusai, grybeliai ar pirmuonys išvysto atsparumo mechanizmus antimikrobiniaiems vaistams. Todėl antibiotikai ar kiti antimikrobiniai junginiai tampa neveiksmingi, o tai sumažina infekcinių ligų išgydymo galimybes. Įprastos medicininės procedūros, tokios kaip: chirurginės operacijos ar vėžio chemoterapija, tampa rizikingesnėmis, kyla ligų plitimo, pacientų negalios ir mirties rizika [5]. Nustatyta, jog 2019 m. apie 4,95 mln. mičių pasaulyje buvo siejamos, o iš jų 1,27 mln. buvo tiesiogiai susijusios, su antibiotikams atsparių bakterijų sukeltomis infekcijomis (1.1 pav.) [6].



1.1 pav. 2050 m. prognozuojamas žmonių mirčių, siejamų su AMR, skaičius per metus įvairiuose pasaulio regionuose. Modifikuota pagal [7].

Atsparumą antibiotikams lemia bakterijų įgyjami atsparumo šiems junginiams mechanizmai, apsaugantys bakterijas nuo antibiotikų poveikio. Antibiotikams atsparių mikroorganizmų sukeltų infekcijų gydymas yra sudėtingas ir ilgai trunkantis procesas [8], [9]. Remiantis AMR epidemiologiją vertinantinančių ir iš bendradarbiaujančių šalių sudarytų tinklų EARS-Net (angl., *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) ir CAESAR (angl., *Central Asia and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance*) informacija, antibiotikams atsparių bakterijų paplitimas per

pastarąjį dešimtmetį ženkliai išaugo [10]. Remiantis Ligų kontrolės ir prevencijos centrų informacija, kiekvienais metais vien tik Jungtinėse Amerikos Valstijose apie 2 mln. žmonių susiduria su antibiotikams atsparių bakterijų sukeltomis infekcijomis, o iš jų – 23 tūkst. miršta. Vertinant šios problemos mastą, prognozuojama, kad kiekvienais metais apie 700 tūkst. mirčių pasaulyje bus susijusios su AMR. Manoma, kad iki 2050 m. šis skaičius gali išaugti iki 10 mln. mirčių per metus (1.1 pav.) [9]. Svarbu ir tai, kad antibiotikams atsparių bakterijų, pavyzdžiui, plačiam antibiotikų spektrui atsparių *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, sukeltų infekcijų gydymas reikalauja ilgesnės pacientų hospitalizacijos ir didesnių sveikatos priežiūros sistemos resursų, todėl papildomai didina našta sveikatos priežiūros sistemai ir valstybės ekonomikai [9].

AMR yra natūraliai gamtoje sutinkamas procesas, laikui bėgant patogenuose besivystantis dėl įgaunamų pokyčių jų genetinėje medžiagoje. Tačiau, naujų AMR mechanizmų vystymąsi ir paplitimą spartina žmonių veikla [5]. Patogenų įgyjamas atsparumas antibiotikams siejamas su didelio masto ir neatsakingu antimikrobinių preparatų naudojimu medicinoje, žemdirbystėje, gyvulininkystėje ir pramonėje [11]. Skaičiuojama, kad pasaulyje per metus profilaktiniais ir gydymo tikslais vien tik gyvulininkystėje sunaudojama apie 60 000 tonų antimikrobinių preparatų [5].



1.2 pav. „Vienos sveikatos“ principo, pagal kurį žmonių, gyvūnų ir juos supančios aplinkos sveikatos yra glaudžiai susijusios, vizualizacija. Paveiksle pateikiama po keletą žmonių, gyvūnų ir aplinkos sveikatą veikiančių veiksnių pavyzdžių. Modifikuota pagal [12].

Taigi, AMR yra kompleksinė problema, kurios sprendimui reikalingi konkretūs veiksmai žmonių sveikatos, maisto gamybos, gyvūnų ir

aplinkosaugos sektoriuose. Vis dažniau akcentuojamas „Vienos sveikatos“ (angl., *One Health*) integruotas ir įvairius sektorius, disciplinas bei bendruomenes telkiantis požiūris. Šiuo principu pabrėžiama, kad žmonių, naminių ir laukinių gyvūnų, augalų bei mus supačios aplinkos sveikata yra glaudžiai susijusi (1.2 pav.) [13]. Inicatyva siekiama sumažinti naudojamų antibiotikų kiekį ir subalansuoti žmonių, gyvūnų ir ekosistemų sveikatą AMR problemos kontekste.

1.1.1. Kovos su antimikrobinio atsparumu veiksmų planas

AMR yra pasaulinio masto problema, todėl jos sprendimui reikalingi koordinuoti ir strategiškai suplanuoti veiksmai. Remiantis PSO, šiuo metu yra prioritizuojami keli šios problemos sprendimo keliai. Vienas iš jų – infekcinių ligų prevencijos užtikrinimas, siekiant sumažinti netinkamo antibiotikų vartojimo mastą. Taip pat skatinamas prieinamumo prie moderniosios diagnostikos ir tinkamo infekcinių ligų gydymo užtikrinimas bei AMR stebėsena ir inovacijų užtikrinimas, pavyzdžiui, AMR paplitimo ir antimikrobinų preparatų naudojimo stebėsena, naujų vakcinų, diagnostinių metodų ir vaistų kūrimas [5].

Sprendžiant AMR problemą, reikalingi kompleksiški veiksmai medicinos, maisto pramonės, gyvūnų ir kituose su antibiotikų naudojimu susijusiuose sektoriuose. Šiuos veiksmus papildo ne tik anksčiau minėtas „Vienos sveikatos“ principas, bet ir kuriami visuotiniai veiksmų planai, buriamos pasaulinės asamblėjos, rengiami informaciniai renginiai. 2023 m. 178 pasaulio šalys buvo įpareigosios parengti nacionalinius AMR veiksmų planus, kuriais remiantis, šalys turi sukurti ir integruoti daugiasektorinį AMR valdymo mechanizmą, prioritetizuoti kovos su šia problema veiksmus bei sutelkti turimus išteklius šio plano įgyvendinimui [5].

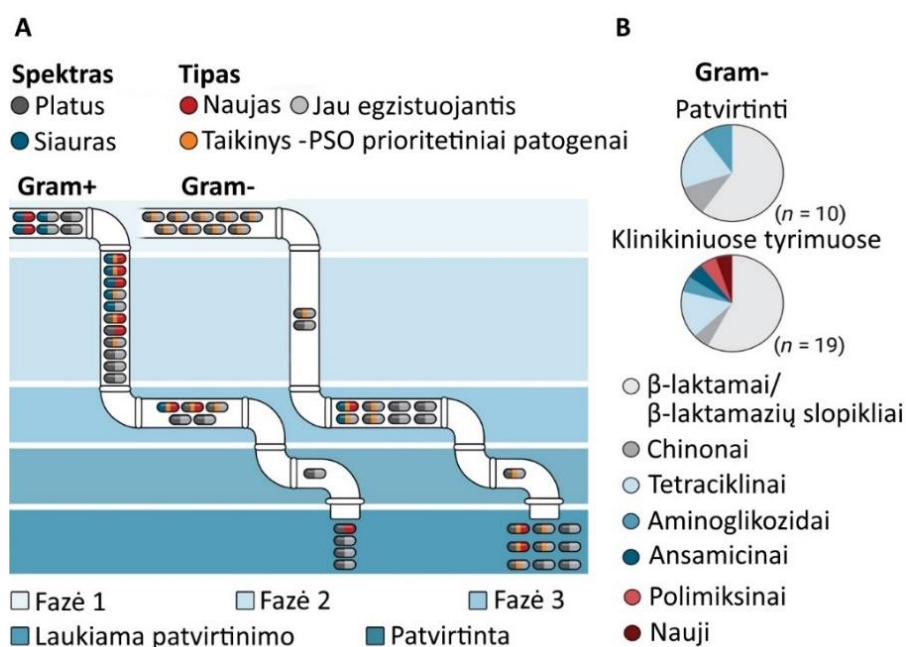
Vis daugiau dėmesio pasaulyje skiriama tinkamam ir veiksmingam infekcinių ligų gydymo užtikrinimui. AMR kontekste siekiama šviesti ir skatinti sveikatos įstaigas remtis moksliniais tyrimais paremtomis antibiotikų ir kitų antimikrobinų preparatų skyrimo ir vartojimo rekomendacijomis. Siekdama pagerinti gydymo prieinamumą bei sumažinti netinkamo antibiotikų naudojimo mastą, PSO išleido *AwaRe* (angl., *Access, Watch, Reserve*) – išsamiai antibiotikus, jų dozes, skyrimą ir vartojimą aprašantį informacinio pobūdžio leidinį [5].

Dėdama pastangas inicijuoti ir tinkama linkme nukreipti naujų antimikrobinų preparatų, diagnostinių metodų ir vakcinų kūrimą bei tyrimus, 2017 m. (su 2023 m. papildymu) PSO išleido antimikrobinams preparatams atsparių prioritetinių bakterinių patogenų ir 2022 m. – prioritetinių grybelinių patogenų, sąrašus [14], [15].

Nepaisant dedamų globalių pastangų, sprendžiant AMR problemą, reikalingas aktyvesnis šalių įsitraukimas, didesnės inovacijos bei investicijos į AMR epidemiologinius tyrimus.

1.1.2. Efektyvių antibiotikų trūkumo problema

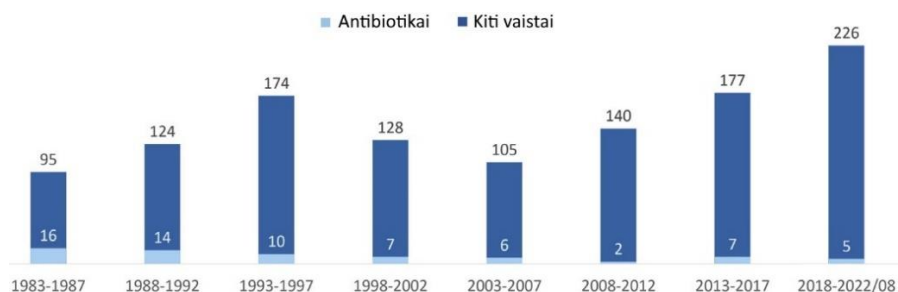
Atradus ir plačiai pradėjus naudoti antibiotikus, vystosi ir plinta bakterijų atsparumo antibiotikams mechanizmai. Šis procesas – nesibaigiantis ciklas, kuriame sukurtų ir patvirtintų antibiotikų poveikis palaipsniui susilpninamas naujai atsirandančių ir išplintančių atsparumo antibiotikams mechanizmų bakterijose. Įprastais atvejais, atsižvelgdama į šią padėtį, farmacija rūpinasi nenutrūkstamu visuomenės aprūpinimu naujais ar anksčiau sukurtais, tačiau modifikuotais ir pagerintomis antimikrobinėmis savybėmis pasižyminčiais, antibiotikais. Tačiau šiuo metu dėl spartaus AMR išplitimo pasaulyje šis ciklas yra sutrikdytas [16]. Skaičiuojama, kad 2020 m. pabaigoje, pirmoje, antroje ir trečioje klinikinių tyrimų stadijose bei galutinio patvirtinimo laukė tik 43 nauji antibiotikai (1.3 pav.).



1.3 pav. Naujų antibiotikų kūrimo ir testavimo klinikiniuose tyrimuose etapai. (A) 2014–2020 m. laikotarpyje tirti ir patvirtinti antibiotikai. Antibiotikai skirstomi pagal jų veikimo spektrą, cheminės struktūros naujumą ir veiksmingumą prieš pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) atrinktus prioritetinius bakterinius patogenus. (B) Patvirtinti arba klinikiniuose tyrimuose esantys nauji antimikrobiniai junginiai, skirti gramneigiamų bakterijų sukeltų infekcijų gydymui. Modifikuota pagal [16].

Palyginimui 2020 m. šiose tyrimų stadijose buvo vertinama daugiau nei 1300 priešvėžinių vaistų [16]. Pavyzdžiui, laikotarpiu nuo 2018 iki 2022 m. rugpjūčio buvo patvirtinti tik 5 nauji antibiotikai (1.4 pav.) [17]. Skaičiuojama, kad net trys ketvirtadaliai kuriamų antibiotikų yra jau

egzistuojančių antibiotikų pirmtakai, o likusią dalį sudaro naujos cheminės struktūros ar prieš naujus taikinius kuriami preparatai [16].



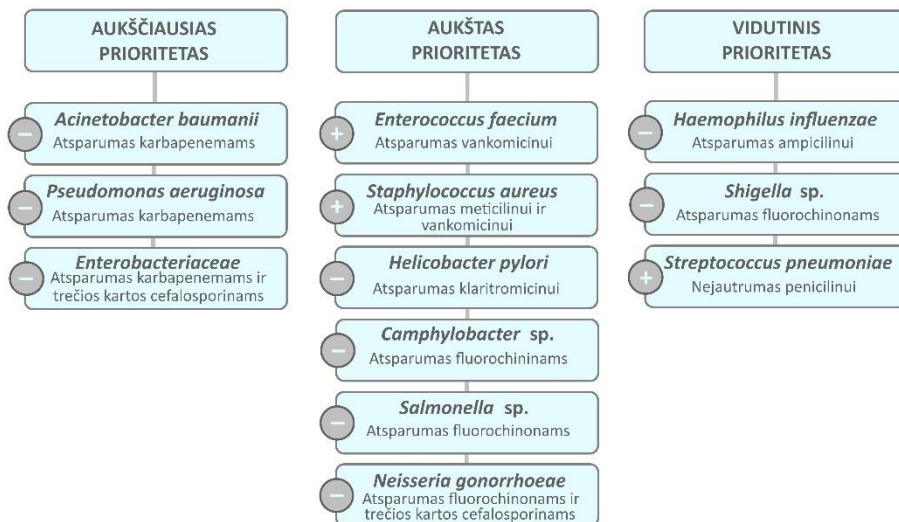
1.4 pav. Laikotarpyje nuo 1983 iki 2022 m. rugpjūčio mėn. patvirtinti nauji antibiotikai ir kiti vaistai. Modifikuota pagal [17].

Naujų ir veiksmingų antibiotikų paieškos ir kūrimo procesas šiuo metu susiduria su inovacijų trūkumu bei mokslo ir tyrimų, ieškant naujų antibiotikų kandidatų, iššūkiais, kurie siejami su per mažu tyrimų finansavimu (1.4 pav.). Dėl šių iššūkių antibiotikų kūrimas ir pateikimas rinkai kelia didelę finansinę riziką farmacijos įmonėms. Naujų ir kliniškai reikšmingų antibiotikų kūrimą ir taikymą riboja per mažas farmacijos įmonių susidomėjimas ir ribotas antibiotikų kūrimo bei jų klinikinių tyrimų finansavimas [17].

Siekdama kovoti su AMR problema ir veiksmingų antibiotikų trūkumu, 2017 m. (su 2023 m. papildymu) PSO paskelbė prioritetinių antibiotikams atsparių bakterijų sąrašą, sudarytą iš 12 didžiausių grėsmę pasaulyje žmonių sveikatai keliančių bakterijų šeimų. Šiuo sąrašu siekiama suteikti gaires mokslui ir jo vystymui naujų vakcinų, diagnostinių sistemų ir antibiotikų kūrimo procese. Pagal naujų antibiotikų poreikio svarbą, patogenai sąraše suskirstyti į aukščiausio, aukšto ir vidutinio prioriteto grupes (1.5 pav.) [15].

Remiantis PSO, aukščiausio prioriteto patogenai kelia didelę grėsmę ligoninių ir slaugos namų pacientams. Didelės rizikos grupę sudaro pacientai, kurių gydymui reikalingas dirbtinio kvėpavimo palaikymas ar gydymui naudojami kateteriai. Aukščiausiam prioritetui priskiriamos bakterijos gali sukelti sunkias ir dažnai mirtinas infekcijas, tokias kaip: kraujo užkrėtimas ar pneumonija. Šioms bakterijoms yra būdingas atsparumas plačiam antibiotikų spektrui, įskaitant ir šiuo metu daugybiniu atsparumu pasižyminčių bakterijų sukeltų infekcijų gydymui naudojamiems karbapenemams ar naujausios kartos cefalosporinams [15].

Aukšto ir vidutinio prioriteto grupėms priskiriamos bakterijos, kurios sukelia plačiai paplitusias infekcines ligas, tokias kaip gonorėja ar salmonelių sukeltas apsinuodijimas maistu. Tarp šių bakterijų taip pat sparčiai plinta atsparumo antibiotikams mechanizmai [15].



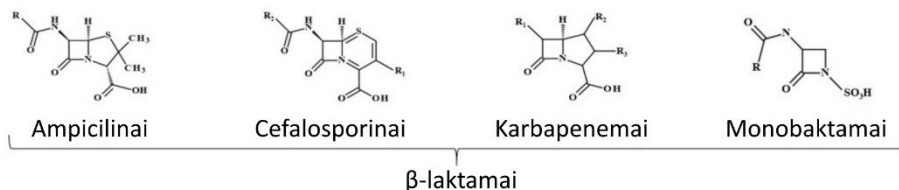
1.5 pav. PSO sudarytas antibiotikams atsparių prioritetinių bakterinių patogenų sąrašas. „–“ nurodo gramneigiamas bakterijas; „+“ nurodo gramteigiamas bakterijas. Parengta pagal [15].

Sprendžiant AMR problemą, reikalingi ne tik nauji ir veiksmingi antibiotikai, tačiau svarbu imtis infekcinių ligų prevencijos veiksmų. Todėl, reikalingas tinkamo antibiotikų skyrimo ir vartojimo užtikrinimas bei racionalus naujų ir būsimų antibiotikų taikymas gydymui [18].

1.1.3. Antibiotikai ir jų klasifikavimas

Antibiotikų atradimas XX a. pradžioje ir jų taikymas infekcinių ligų gydymui yra vienas svarbiausių laimėjimų medicinos istorijoje. Šių vaistų dėka padidėjo infekcinių ligų išgydymo tikimybė, todėl pagerėjo žmonių gyvenimo kokybė bei trukmė. Antibiotikai plačiai naudojami bakterijų sukeltų infekcijų gydymui ar prevencijai medicinoje ir gyvulininkystėje [18].

Pagal cheminę struktūrą antibiotikai skirstomi į šias klases: β -laktamai, makrolidai, tetraciklinai, aminoglikozidai ir chinonai. Dėl savo efektyvumo β -laktamai sudaro du trečdalius medicinoje naudojamų antibiotikų. Šių antibiotikų cheminei struktūrai būdingas β -laktaminis žiedas. Skirtingoms klasėms priklausančios β -laktaminiai antibiotikai savo struktūroje gali turėti papildomas šonines grupes ar heterociklinius žiedus (1.6 pav.). β -laktamams priklauso penicilinai (būdingas tiazolidino žiedas ir papildoma šoninė grupė), cefalosporinai (turi dihidrotiazino žiedą ir dvi papildomas šonines grupes), karbapenemai (struktūroje yra modifikuotas tiazolidino žiedas) ir monobaktamai (būdingas β -laktaminis žiedas be papildomų gretimų šoninių grupių) [19].



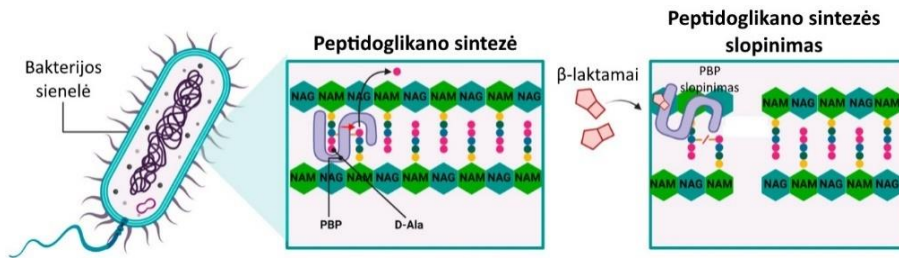
1.6 pav. Skirtingų klasių β-laktaminių antibiotikų cheminės struktūros. Modifikuota pagal [19].

Didelė antibiotikų struktūros įvairovė lemia skirtingus šių junginių veikimo mechanizmus. Šiais remiantis, antibiotikai gali būti klasifikuojami pagal bakterijų dalijimuisi svarbių molekulinį procesų slopinimą. Tai gali būti ląstelės sienelės, baltymų ar nukleorūgščių sintezės ar ląstelės sienelės funkcijų palaikymo sutrikdymas [20]. Antibiotikų klasifikavimas pagal jų veikimo mechanizmą pateiktas 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Pagrindinės antibiotikų klasės ir jų skirstymas pagal veikimo mechanizmą. Parengta pagal [21]

Veikimo mechanizmas	Antibiotikų klasės
Ląstelės sienelės sintezės slopinimas	Penicilinai, cefalosporinai, karbapenemai, daptomicinas, monobaktamai, glikopeptidai
Baltymų sintezės slopinimas	Tetraciklinai, aminoglikozidai, oksazolidononai, streptograminai, ketolidai, makrolidai, linkozamidai
DNR sintezės slopinimas	Fluorochinonai
Folio rūgšties sintezės slopinimas	Sulfonamidai
RNR sintezės slopinimas	Rifampinai
Kiti	Metronidazolas

Pavyzdžiui, β-laktaminių antibiotikų veikimo mechanizmas yra pagrįstas bakterijų sienelės sintezės sutrikdymu, šiam antibiotikui kovalentiškai jungiantis transpeptidazės, dar kitaip vadinamos su penicilinu besijungiančiu baltymu (ang., *penicillin binding protein*, PBP), aktyviajame centre. PBP dalyvauja galutiniuose peptidoglikano sintezės etapuose, kryžmiškai tarpusavyje sujungiant peptidoglikano molekules (1.7 pav.). Skirtingoms bakterijų rūšims būdingi joms specifiški PBP baltymai. Paprastai, rūšiai priklauso 3–8 šio baltymo variantai. Peptidoglikano sluoksnio sintezė yra gyvybiškai svarbi gramneigiamų ir gramteigiamų bakterijų augimui ir dalijimuisi [22]. β-laktamai, prisijungdami PBP aktyviajame centre, imituoja natūralų transpeptidazės substratą – *D*-Ala-*D*-Ala dipeptidą, todėl PBP fermentinis aktyvumas yra nuslopinamas, sutrinka peptidoglikano sintezė, pažeidžiamas ląstelės sienelės integralumas ir ląstelės žūva (1.7 pav.) [22].



1.7 pav. β -laktamų veikimo mechanizmo gramneigiamose bakterijose schematinis vaizdas. β -laktamo molekulė jungiasi su penicilinu besijungiančio baltymo (PBP) aktyviajame centre, todėl sutrinkama peptidoglikano sintezė, pažeidžiamas bakterijos sienelės integralumas ir ląstelė žūva. NAG – *N*-acetilgliukozaminas, NAM – *N*-acetilmuramo rūgštis. Modifikuota pagal [18].

Pagal veikimą antibiotikai gali būti grupuojami į plataus ir siauro veikimo spektro antibiotikus. Plataus veikimo spektro antibiotikai, pavyzdžiui, ampicilinas, amoksicilinas, eritromicinas, yra veiksmingi tiek prieš gramteigiamas, tiek prieš gramneigiamas bakterijas. Tuo tapu siauro veikimo spektro antibiotikai, tokie kaip: penicilinai, cefalosporinai, vankomicinas ir kiti, yra nukreipti tik prieš gramteigiamas arba gramneigiamas bakterijas. Siauro spektro antibiotikai yra specifiskesni, todėl jų taikymas gydymui mažina naujų atsparumo antibiotikams mechanizmų atsiradimo riziką. Dėl šios priežasties, lyginant su plataus spektro antibiotikais, šie antibiotikai yra laikomi tinkamesniais antimikrobiniais agentais bakterinių infekcijų gydymui [21], [23].

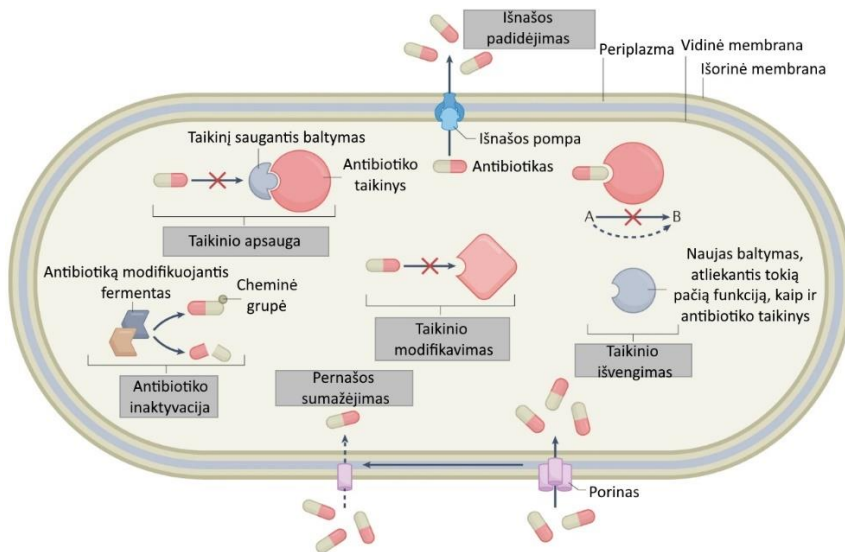
Taigi, antibiotikai yra gyvybiškai svarbi šiuolaikinės medicinos dalis, tačiau jų poveikį silpnina bakterijų įgyjami ir sparčiai tarp šių patogenų plintantys atsparumo antibiotikams mechanizmai.

1.1.4. Bakterijų atsparumo antibiotikams mechanizmai

Pagrindiniai antibiotikų veikimo ir bakterijų atsparumo antibiotikams mechanizmai yra detalai ištirtini. Siekdamas išvengti antibiotikų poveikio, bakterijos pasitelkia įvairius atsparumo antibiotikams mechanizmus. Vieni iš šių mechanizmų gali būti koduojami bakterijų chromosomose lokalizuotuose genuose, todėl, esant antibiotikų poveikiui, gali būti tiesiogiai panaudoti apsaugai ir išgyvenimui. Kiti mechanizmai gali būti įgyti iš bakterijas supančios aplinkos mobiliųjų genetinių elementų pagalba, pavyzdžiui, plazmidėmis, kurios, aplinkoje atsiradus antibiotiko, šiuos genetinius elementus turinčioms bakterijoms suteikia išgyvenimo pranašumą. Pagrindinius bakterijų atsparumo mechanizmus apibendrinanti schema pateikta 1.8 paveiksle [8].

Dauguma antimikrobinų vaistų taikinių yra lokalizuoti bakterijų citoplazmoje, todėl, prieš patekdami į ląstelės vidų, šie junginiai turi pereiti ląstelės sienelę. Antibiotikų transportas per ląstelės sienelę yra itin svarbus gramneigiamų bakterijų atveju, kadangi šių mikroorganizmų sienelė sudaryta

iš dviejų membranų ir tap jų esančio peptidoglikano sluoksnio. Dėl šių ypatybių, gramneigiamų bakterijų sienelė yra santykinai nepralaidi antibiotikams ir saugo šio tipo bakterijas nuo daugumos prieš gramteigiamas bakterijas nukreiptų antibiotikų poveikio [8]. Bakterijos, keisdamos sienelės struktūrą, pavyzdžiui, keičiant porinų atrankumą, modifikuodamos fosfolipidų ir riebalų rūgščių sąstatą citoplazminėje membranoje, sutrikdo antibiotikų patekimą į ląstelę [24]. Pavyzdžiui, *K. pneumoniae* atsparumas karbapenemams yra iš dalies nulemtas OmpK35 ir OmpK36 porinų stuktūros pokyčių, kurie susilpnina pralaidumą karbapenemams [25].



1.8 pav. Pagrindiniai bakterijų atsparumo antibiotikams mechanizmai. Modifikuota pagal [8].

Bakterijos geba ne tik apsisaugoti nuo antibiotikų patekimo į ląstelę, bet ir aktyviai juos šalinti iš ląstelės, naudojant išnašos mechanizmus. Bakterijų sienelėje lokalizuotos išnašos pompas gali būti efektyviai naudojamos iš citoplazmos atgal į aplinką vykdomam antibiotikų transportavimui. Šios pompas gali pernešti įvairios cheminės struktūros antibiotikų molekules, todėl prisideda prie daugybiniu atsparumu pasižyminčių bakterijų, tokių kaip: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* ir *A. baumannii*, atsiradimo [26], [27].

Bakterijos geba išvengti antibiotikų poveikio keisdamos ir modifikuodamos antibiotikų taikinius. Paprastai antibiotikai slopina ląstelei gyvybiškai svarbias funkcijas, dideliu giminingumu jungdamiesi prie savo taikinių – bakterijos komponentų. Šiuo būdu slopinamas bakterijų augimas arba jos žūva [28]. Jei antibiotikų taikinio struktūra pakinta ar taikiny yra chemiškai modifikuojamas, sumažinamas antibiotikų jungimosi prie taikinių giminingumas ir slopinimo efektyvumas, todėl bakterijos įgyja atsparumą

šiems antibiotikams. Pavyzdžiui, jungdamiesi šalia ląstelei gyvybiškai svarbių topoizomazijų aktyviojo centro, chinonams priklausantys antibiotikai slopina šių fermentų aktyvumą. Aminorūgščių pasikeitimai antibiotikų jungimosi srityje, išsugo topoizomazijų fermentinį aktyvumą, tačiau sumažina chinonų jungimosi efektyvumą [29]. Antibiotikų taikinių cheminis modifikavimas gali erdviškai apsunkinti antibiotiko molekulių patekimą ir jungimąsi prie reikiamos taikinio srities. Vienas iš pavyzdžių – atsparumo makrolidams mechanizmas, kuriam esant, metiltransferazė metilina antibiotikų taikinį – 16S rRNR – tokiu būdu apsaugodama rRNR nuo antibiotikų jungimosi, o bakterijos tampa atspariomis šio tipo antibiotikams [30].

Kitas plačiai tarp antibiotikams atsparių bakterijų paplitęs atsparumo mechanizmas – antibiotikų modifikavimas arba inaktyvavimas [8]. Šiuo atveju atsparumas yra užtikrinamas panaudojant pačių bakterijų susintetintus, antibiotikus inaktyvuojančius fermentus. Todėl, siekiant išvengti antibiotikų poveikio, bakterijoms nereikalingi ląstelei svarbių komponentų ir procesų pokyčiai. Vienas dažniausiai identifikuojamų šio tipo atsparumo mechanizmų yra antibiotikų inaktyvavimas, pavyzdžiui, juos hidrolizuojant [31]. Vienas iš pavyzdžių – β -laktamazių vykdoma β -laktamų hidrolizė. Šie fermentai bakterijas apsaugo nuo β -laktaminių antibiotikų poveikio, hidrolizuodami ir tokiu būdu inaktyvuodami antibiotikų struktūroje esantį β -laktaminį žiedą [32]. Bakterijos taip pat išvengia antibiotikų poveikio chemiškai modifikuodamos jų molekules. Identifikuoti aminoglikozidus, makrolidus ir kitus antibiotikus modifikuojantys fermentai [8]. Nustatyta, kad bakterijų acetiltransferazės, fosfotransferazės ar nukleotidiltransferazės, modifikuodamos antibiotiko hidroksi- ar aminogrupes, sumažina šių agentų jungimosi prie taikinio giminingumą [33], [34].

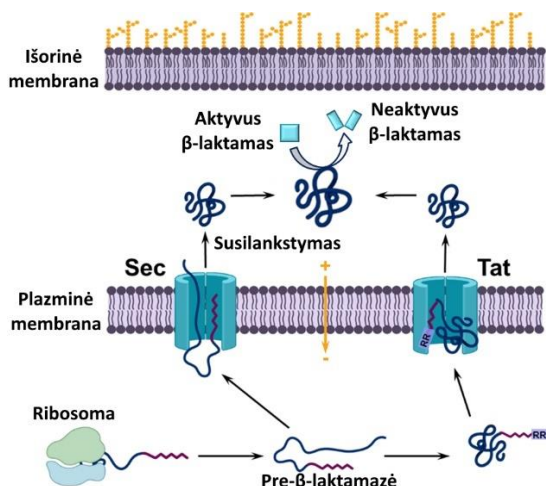
Bakterijos apsisaugo nuo antibiotikų poveikio antibiotikų taikinius pakeisdamos kitais alternatyviais komponentais, kurie atlieka panašią ar tą pačią funkciją ląstelėje. Šio mechanizmo išsivystymas yra siejamas su bakterijų įgyjamais naujais alternatyviais genais, koduojančiais antibiotiko taikinio alternatyvą, kurios funkcija, kitaip nei taikinio, nėra slopinama [35]. Vienas geriausiai ištirtinėtų pavyzdžių – *S. aureus* atsparumas meticilinui. β -laktaminiai antibiotikai, tokie kaip meticilinas, jungiasi prie PBP baltymo, slopindami baltymo aktyvumą, todėl išreguliuojama ląstelės sienelės sintezė. Mobilųjų genetinių elementų pagalba *S. aureus* gali įgyti PBP2a koduojantį *mecA* geną. Šos bakterijos tampa atsparios antibiotikams ne dėl β -laktamazių sintezės, bet dėl iš kitų mikroorganizmų įgyto papildomo PBP baltymo varianto – PBP2a – produkavimo. Antibiotikai prie PBP2a baltymo jungiasi žemesniu giminingumu, todėl *S. aureus* įgyja atsparumą visai β -laktaminių antibiotikų klasei [8], [36].

Taigi, įgaudamos įvairius atsparumo antibiotikams mechanizmus, bakterijos geba prisitaikyti ir išvengti plačiai infekcinių ligų gydymui naudojamų antibiotikų poveikio. Šių mechanizmų identifikavimas, jų supratimas ir detalus tyrinėjimas yra itin svarbūs kuriant naujas infekcinių ligų

gydymo strategijas, veiksmingus antibiotikus, kitus antimikrobinius junginius ar jų kombinacijas.

1.1.5. β -laktamazės

β -laktamazės yra β -laktaminį žiedą molekulėje turinčius junginius, pavyzdžiui, β -laktامينius antibiotikus, hidrolizuojantys fermentai, aptinkami įvairių rūšių bakterijose. Tai natūraliai gamtoje sutinkami baltymai, kurių atsiradimas siejamas su bakterijų gynybos mechanizmais prieš mikroorganizmus, gaminančius β -laktamus. Šie fermentai gali būti koduojami bakterijų chromosomose arba mobiliuosiuose genetiniuose elementuose lokalizuotų genų [37]. Nesubrendusios ir neaktyvios β -laktamazės (pre- β -laktamazės) yra sintetamos bakterijų citoplazmoje, N-gale prijungiant signalinę seką (1.9 pav.).

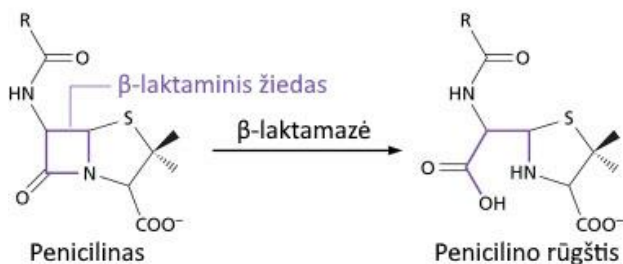


1.9 pav. β -laktamazių biogenezės gramneigiamose bakterijose schematinis vaizdas. Sec ir Tat – translokacijos sistemos. Modifikuota pagal [38].

Šios sekos motyvai yra atpažįstami Sec sekrecijos sistemos arba Tat translokacijos komponentų, kurie pre- β -laktamazes perneša į periplazmą gramneigiamose bakterijose (1.9 pav.) arba, gramteigiamų bakterijų atveju, sekretuojamos į užląstelinę erdvę [39]. Subrendę fermentai geba inaktyvuoti β -laktامينius antibiotikus (1.9 pav.), hidrolizuodami β -laktaminiam žiede esantį amidinį ryšį [40]. Pavyzdžiui, hidrolizuodamos peniciliną, β -laktamazės jį verčia į biologiškai neaktyvią penicilino rūgštį (1.10 pav.).

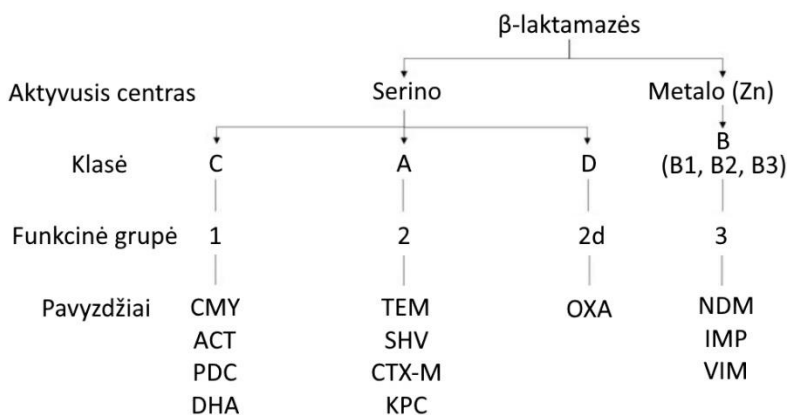
Detalūs β -laktamazių tyrinėjimai pradėti 1940 m. Nuo tyrimų pradžios bakterijose identifikuotų ir apibūdintų β -laktamazių sąrašas ženkliai išsiplėtė [8]. Remiantis β -laktamazių duomenų baze (*Beta Lactamase DataBase*, BLDB), šiuo metu identifikuota daugiau nei 11 530 β -laktamazių alelinių variantų (pagal 2025 m. rugpjūčio mėn. duomenis) [2]. Dažniausiai, β -laktamazės klasifikuojamos pagal ar. sekos panašumus, remiantis Ambler

klasifikacija. Pagal šią klasifikaciją, β -laktamazės skirstomos į A, B, C ir D klases (1.11 pav.) [41].



1.10 pav. β -laktamazės katalizuojama penicilino hidrolizės reakcija. Modifikuota pagal [42].

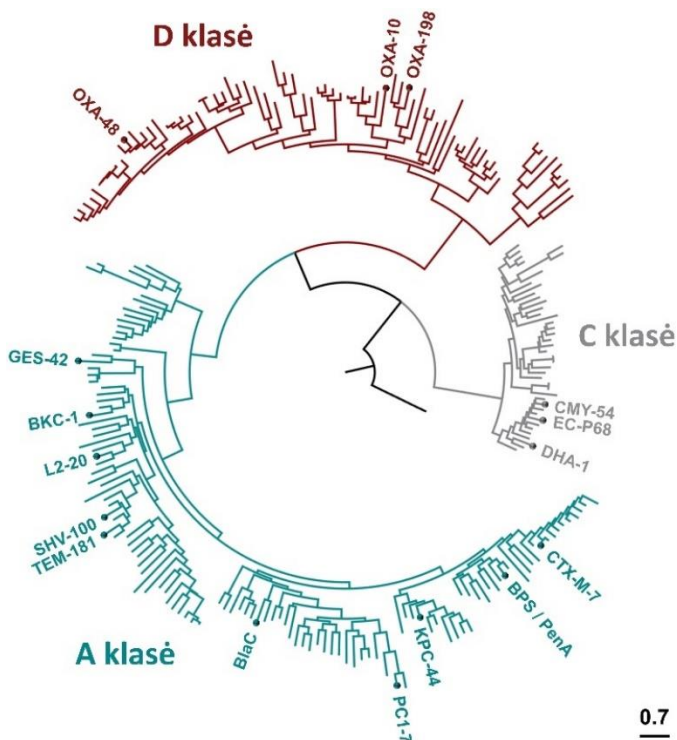
Skirtingoms klasėms priklausančys fermentai evoliucionavo ir keitėsi nepriklausomai, todėl kiekvieną klasę sudaro didelė įvairovė filogenetiškai skirtingų β -laktamazių grupių [38]. A, C ir D klasių filogenetinės analizės pavyzdys pateiktas 1.12 paveiksle. Iš identifikuotų daugiau nei 11 530 įvairioms šeimoms prilausančių β -laktamazių variantų, A klasei priklauso daugiau nei 2110 fermentų, B – daugiau nei 990, C – daugiau nei 6780 ir D – daugiau nei 1425 atstovų (pagal 2025 m. rugpjūčio mėn. duomenis) [2].



1.11 pav. β -laktamazių skirstymas pagal struktūrą ir funkcines grupes. Modifikuota pagal [43].

Pagal β -laktaminio žiedo hidrolizės mechanizmo pobūdį, β -laktamazės klasifikuojamos į serino β -laktamazes, aktyviajame centre turinčias konservatyvią Ser ar. liekaną. Šiai grupei priskiriamos A, C ir D klasės β -laktamazės (1.11 pav.), kurios taip pat pasižymi dideliu panašumu PBP baltymams. B klasės β -laktamazės priskiriamos metalo β -laktamazių grupei (1.11 pav.). Šių baltymų fermentinio aktyvumo palaikymui aktyviajame

centre papildomai reikalingi vienas ar du Zn(II) jonai [38], [44], [45], [46]. Struktūriniai serino ir metalo β -laktamazių skirtumai lemia ir skirtingus šių fermentų katalizės mechanizmus (1.13 pav.), nuo kurių priklauso β -laktamazių substratų įvairovė ir sąveika su β -laktamazių slopikliais, kurie paprastai pasitelkiami β -laktaminių antibiotikų poveikio sustiprinimui [38].

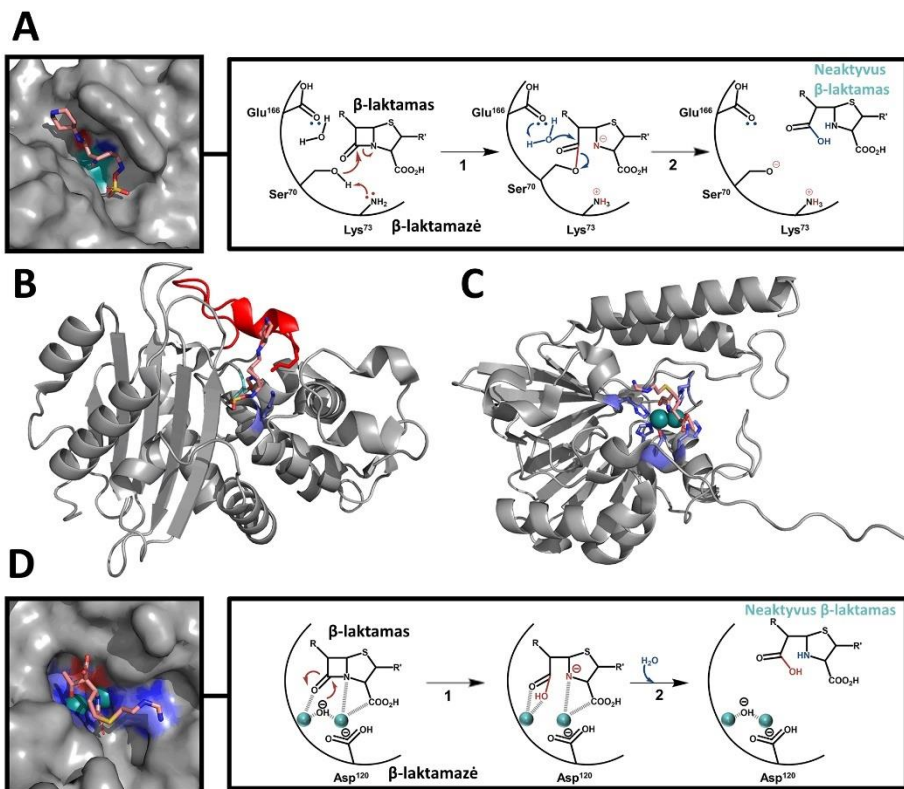


1.12 pav. A, C ir D klasėms priklausančių β -laktamazių filogenetinis medis. Modifikuota pagal [38].

Serino β -laktamazių katalizuojama fermentinė reakcija vyksta dviem etapais: pradžioje substratas yra acilinamas, dalyvaujant aktyviajame centre esančiai Ser ar. liekanai (1.13 pav. A, B). Kitame žingsnyje, panaudojant vandens molekulę, vykdomas deacilinimas, susidarant neaktyviai substrato formai [47]. Tuo tarpu metalo β -laktamazių fermentiniam aktyvumui reikalingi Zn(II) jonai, kurie aktyviajame centre yra koordinuojami konservatyvių His ar. liekanų (1.13 pav. C, D). Zn(II) jonai koordinuoja substratą fermento aktyviajame centre ir jį pozicionuoja nukleofilinėje atakoje, susidarant neaktyviai substrato formai.

Pagal substratų profilį β -laktamazės gali būti skirstomos į siauro spektro (angl., *narrow-spectrum*) β -laktamazės, padidinto spektro β -laktamazės (angl., *extended-spectrum β -lactamases*, ESBLs) ir karbapenemazes. Siauro spektro β -laktamazės hidrolizuoja penicilinus bei pirmos ir antros kartos cefalosporinus. Tuo tarpu ESBLs geba hidrolizuoti daugumą β -laktaminių

antibiotikų, išskyrus naujausios kartos karbapenemus [38]. Identifikuoti infekcijas sukeliantys mikroorganizmai, gaminantis kelių skirtingų plataus spektro β -laktamazių kombinacijas. O šių bakterijų sukeltų infekcijų gydymas tampa itin sudėtingas. Ši problema dažnai sutinkama gydant oportunistinio patogeno *Stenotrophomonas maltophilia* sukeltas cistine fibroze sergančių pacientų infekcijas. Chromosomose koduojamų ESBL L2 ir B klasei priklausančios karbapenemazės L1 koevoliucija šiose bakterijose lėmė atsparumą visiems klinikoje prieinamiems β -laktaminiams antibiotikams [48].



1.13 pav. β -laktamazių struktūra ir katalizės mechanizmai. **(A)** (Kairėje) Serino β -laktamazės (KPC-2, PDB 6QW9) aktyviojo centro ir substrato (slopiklio relebaktamo, rožinė spalva) kompleksas. Svarbios katalizėje dalyvaujančios ar. yra nuspalvintos (Ser⁷⁰ žalsvai mėlynai, Lys⁷³ mėlynai, Glu¹⁶⁶ raudonai). (Dešinėje) Serino β -laktamazės (KPC-2) katalizuojamos β -laktamo hidrolizės mechanizmas. **(B)** Serino β -laktamazės (KPC-2) ir relebaktamo (rožinė spalva) komplekso struktūra. **(C)** Metallo β -laktamazės (L1-1, PDB 6UAF) ir substrato (imipenemo, rožinė spalva) komplekso struktūra. L1-1 β -laktamazės atveju, Zn(II) jonai (žalsvai mėlynos sferos) yra koordinuojami His¹¹⁶, His¹¹⁸, His¹²¹, His¹⁹⁶ ir His²⁶³ ar. (pažymėta mėlynai) ir Asp¹²⁰ (pažymėta raudonai). **(D)** (Kairėje) Metallo β -laktamazės (L1-1) aktyviojo centro ir imipenemo (rožinė spalva) kompleksas. Zn(II) jonai pažymėti žalsvai mėlynomis sferomis. Modifikuota pagal [38].

Remiantis Bush-Jacoby-Medeiros klasifikacija, β -laktamazės gali būti skirstomos į funkcines grupes: 1, 2, 2d ir 3, (1.11 pav.) [37]. Pastarojoje fermentai skirstomi pagal fermentinį aktyvumą bei sąveikos su slopikliais profilį, todėl ši sistema laikoma informatyvesne nei Ambler klasifikacija, tačiau ir ženkliai sudėtingesne [38].

1.1.6. AmpC β -laktamazės

C klasei priklausančios β -laktamazės, dar kitaip vadinamos AmpC β -laktamazėmis, sudaro daugiausiai β -laktamazių alelinių variantų turinčią klasę [2]. AmpC geba hidrolizuoti penicilinus, cefalosporinus (išskyrus ketvirtos kartos) ir monobaktamus. Klasikiniai β -laktamazių slopikliai, pavyzdžiui, klavulano rūgštis, AmpC tipo β -laktamazių atveju nėra veiksmingi [1]. Šiuo metu yra identifikuotos 63 AmpC priklausančios β -laktamazių šeimos [2] (pagal 2025 m. rugpjūčio mėn. duomenis). Tai homologiški ir polimorfiški baltymai, tarpusavyje pasižymintys nedideliais aminorūgščių sekos skirtumais, nuo kurių priklauso jų fermentinis aktyvumas ir substratų įvairovė [8]. Pavyzdžiui, AmpC priklausančių CMY, PDC, DHA ir ACT šeimų atstovai pasižymi dideliu polimorfiškumu. Šių β -laktamazių naujų alelinių variantų skaičius bakterijose, iš kurių dalis PSO priskiriamos prioritetiniams patogenams, sparčiai auga [8].

Pirmieji AmpC produkuojantys bakterijų izoliatai identifikuoti XX a. devintajame dešimtmetyje. Vėliau dėl izolatų išplitimo ir horizontaliosios šias β -laktamazes koduojamų genų pernašos (dažniausiai dėl plazmidėse koduojamų AmpC), šiuos fermentus produkuojančios bakterijos nustatytos visame pasaulyje. Remiantis β -laktamazių kilme, išskiriamos kelios mobiliųjų AmpC koduojančių genų linijos. Dalies jų kilmė siejama su natūraliai AmpC produkuojančiomis bakterijomis, pavyzdžiui, *Enterobacter* grupe (būdingos MIR, ACT β -laktamazių šeimos), *C. freundii* grupe (CMY-2 tipo, LAT, CFE), *Morganella morganii* grupe (DHA), *Hafnia alvei* grupe (ACC), *Aeromonas* grupe (CMY-1 tipo, FOX, MOX) ir *A. baumannii* grupe (ADC). Plačiausiai išplitę yra CMY-2 tipo fermentai, tačiau fiksuojamas spartėjantis indukuojamos DHA-1 tipo ir kitų AmpC β -laktamazių plitimas pasaulyje [1], [49].

Dauguma *Enterobacteriaceae* bakterijų natūraliai gamina AmpC β -laktamazes. AmpC koduojamų genų raiška gali būti silpna, tačiau pastovi (pavyzdžiui, *E. coli*, *Shigella* spp.) arba indukuojama (pavyzdžiui, *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *M. morganii*, *P. aeruginosa*). Padidėjusi natūraliai koduojamų AmpC raiška yra siejama su įvairiais genetiniais bakterijų pokyčiais ir lemia aukšto lygio atsparumą cefalosporinams ir penicilinų bei β -laktamazių slopiklių kombinacijoms [1], [49].

Enterobacteriaceae bakterijos geba ne tik natūraliai sintetinti AmpC β -laktamazes, tačiau ir įgyti šiuos fermentus koduojančius genus kartu su mobiliaisiais genetiniais elementais, dažniausiai plazmidėmis. Įgytų AmpC raiška yra pastovi, o atsparumo profilis panašus į natūraliai AmpC

produkuojančių bakterijų mutantų su padidinta AmpC raiška atsparumo profilį [1], [49].

AmpC produkuojančių bakterijų atsparumo lygis priklauso nuo susintetintų β -laktamazių kiekio ląstelėse bei kitų papildomų atsparumo mechanizmų. AmpC negeba efektyviai hidrolizuoti karbapenemų, todėl šie antibiotikai išlieka vienu pagrindinių pasirinkimų AmpC produkuojančių bakterijų sukeltų infekcijų gydymui. Kita vertus, mutacijos gramneigiamų bakterijų išorinės membranos porinus koduojančiuose genuose leidžia šioms bakterijoms išvengti ir karbapenemų poveikio. Siekiant spręsti problemą, sukurti nauji veiksmingi agentai, tokie kaip cefalosporinas, ceftolozanas ir β -laktamazių slopiklis tazobaktamas, kurie išlaiko savo antimikrobinį poveikį, esant AmpC, porinų ir pernašos pompų sąstato pokyčiams bakterijose [40], [50].

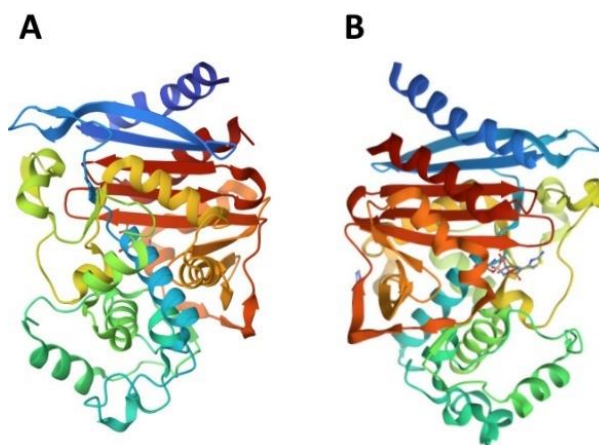
Antibiotikams atsparios AmpC produkuojančios bakterijos, pavyzdžiui, *E. coli*, yra plačiai išplitusios ne tik žmogaus gyvenamojoje aplinkoje, tačiau ir gyvulininkystės bei augalininkystės sektoriuose [51], [52]. Tai kelia grėsmę antibiotikams atsparių bakterijų kontrolės užtikrinimui ir žmonių sveikatai visame pasaulyje [40]. Antibiotikams atsparių bakterijų išplitimas kuria palankias sąlygas zoonotiniam patogeniškų bakterijų perdavimui per užkrėstus maisto produktus. Tokiu būdu inicijuojamas grįžamojo ryšio procesas naujų atsparumo antibiotikams genų evoliucijai ir atrankai [53].

Vienos iš AmpC atstovių – CMY (angl. trump., *cephamycin-hydrolyzing-lactamase*) šeimos β -laktamazės pirmą kartą identifiкуotos iš paciento žaizdos izoliuotame *K. pneumoniae* izolate Pietų Korėjoje 1988 m. [54]. Šios β -laktamazės sutinkamos *Enterobacteriaceae* šeimai priklausančiose *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. portucalensis* ir kitose bakterijose. Dažniausiai, CMY yra koduojamos plazmidėse, šių fermentų raiška yra pastovi bei suteikia atsparumą penicilinams ir cefalosporinams [55]. Remiantis β -laktamazių duomenų baze BLDB, CMY šeimą sudaro 181 identifiкуoti ir patvirtinti fermentai, o CMY-2 identifiкуojama kaip šiuo metu labiausiai paplitusi AmpC β -laktamazė (pagal 2025 m. kovo mėn. duomenis) [2]. CMY-2 β -laktamazės struktūros pavyzdys pateiktas 1.14 A paveiksle.

AmpC priklausančios PDC (angl. trump., *Pseudomonas-derived cephalosporinases*) šeimos β -laktamazės geba hidrolizuoti cefalosporinus, monobaktamus ir karbapenemus bei yra identifiкуojamos *Pseudomonas* genties bakterijose. Pirmą kartą PDC β -laktamazė nustatyta klinikiniam *P. aeruginosa* izolate Prancūzijoje, 2000 m. [56]. Chromosominių genų koduojamų PDC sintezė yra pagrindinis *P. aeruginosa* atsparumo β -laktamams mechanizmas. *P. aeruginosa* yra oportunistinis patogenas, sukeliantis sunkias hospitalines infekcijas, tokias kaip: pneumonija, šlapimo takų infekcijos ar bakteremija, ir yra viena pagrindinių cistine fibroze sergančių pacientų mirties priežasčių [57]. PDC fermentai pasižymi dideliu polimorfiškumu, kuris yra siejamas su atsparumu didelei β -laktamų įvairovei. Remiantis BLDB duomenų baze, šiuo metu identifiкуota daugiau nei 570

PDC alelinių variantų (pagal 2025 m. kovo mėn. duomenis) [2], [57]. Vieno iš PDC variantų – PDC-3 – struktūros pavyzdys pateiktas 1.14 B paveiksle.

AmpC priskiriamos DHA (angl. trump., *Dhahran Hospital in Saudi Arabia-lactamase*) šeimos β -laktamazės yra koduojamos plazmidėse ir, dažniausiai, identifikuojamos *Enterobacteriaceae* bakterijose. Šie fermentai lemia atsparumą cefamicinams ir cefalosporinams. Pirmą kartą DHA tipo β -laktamazė identifikuota iš plaučių karcinoma sergančio paciento išmatų izoliuotose *Salmonella* spp., Saudo Arabijoje 1997 m. [58]. Po dvejų metų DHA-1 produkujančios ir iš paciento šlapimo izoliuotos *K. pneumoniae* bakterijos aptiktos JAV. [59]. Šiuo metu DHA produkujantys izoliatai yra nustatomi visuose pasaulio regionuose [60]. Priešingai nei kitų plazmidėse koduojamų β -laktamazių, DHA raiška yra indukuojama, o raiškos stiprumas priklauso nuo antibiotiko ir nuo jo koncentracijos. Remiantis BLDB duomenų bazės duomenimis, identifikuota daugiau nei 37 DHA variantai, iš jų DHA-1 nustatomas dažniausiai (pagal 2025 m. rugpjūčio mėn. duomenis) [2].



1.14 pav. AmpC β -laktamazių CMY-2 ir PDC-3 kristalinės struktūros. **(A)** CMY-2 ir citrato molekulės kompleksas (PDB 1ZC2). **(B)** PDC-3 ir slopiklio LP-06 kompleksas (PDB 8SDR).

ACT (angl. trump., *AmpC-type- β -lactamase*) šeimos β -laktamazės pirmą kartą identifikuotos klinikiniuose *K. pneumoniae* ir *E. coli* izoliatuose JAV, 1997 m. [61]. ACT gali būti koduojamos chromosominiuose genuose, o jų raiška indukuojama antibiotikais, arba koduojamos plazmidėse esančių genų. Pastarajam atvejui būdinga pastovi ir aukšto lygio β -laktamazių raiška. ACT tipo β -laktamazės suteikia atsparumą cefamicinams, cefalosporinams, penemams ir karbapenemams [8]. Remiantis BLDB duomenų baze, šiuo metu identifikuota daugiau nei 190 ACT alelinių variantų (pagal 2025 m. kovo mėn. duomenis) [2].

1.1.7. Metalo β -laktamazės

Metalo β -laktamazės (angl., *metallo- β -lactamase*, MBL) yra B klasei priklausančios metalohidrolazės. Šių fermentų aktyvumui papildomai reikalingas Zn(II) jonų koordinavimas aktyviajame centre [8]. MBL fermentai pasižymi didele hidrolizuojamų antibiotikų, tokių kaip penicilinai, cefalosporinai ir karbapenemai, išskyrus monobaktamus, įvairove [62]. MBL fermentinis aktyvumas nėra slopinamas įprastai medicinoje naudojamų β -laktamazių slopiklių [63]. Kliniškai reikšmingiausios yra mobiliuosiuose genetiniuose elementuose koduojamų NDM (angl. trump., *New Delhi MBL*), VIM (angl. trump., *Verona Imipenemase*) ir IMP (angl. trump., *imipenem-resistant Pseudomonas*) šeimų β -laktamazės [8]. Remiantis BLDB duomenų baze, šiuo metu identifikuoti daugiau nei 75 NDM, 90 VIM ir 105 IMP aleliniai variantai (pagal 2025 m. kovo mėn. duomenis) [2].

Vienos iš kliniškai reikšmingiausių MBL – NDM tipo β -laktamazės. Šie fermentai pirmą kartą apibūdinti 2009 m. Švedijoje, *K. pneumoniae* bakterijose, izoliuotose iš Indijos ligoninėse apsilankiusio paciento mėginių [64]. Vienas dažniausiai identifikuojamų NDM šeimos β -laktamazių – NDM-1, kurios struktūra pateikta 1.15 paveiksle. NDM-1 būdinga nedidelė aminorūgščių sekos homologija su kitomis *Enterobacteriaceae* nustatomomis MBL β -laktamazėmis. Didžiausia aminorūgščių homologija NDM-1 pasižymi su VIM-1 β -laktamaze, kuri siekia 32,4 % [65].



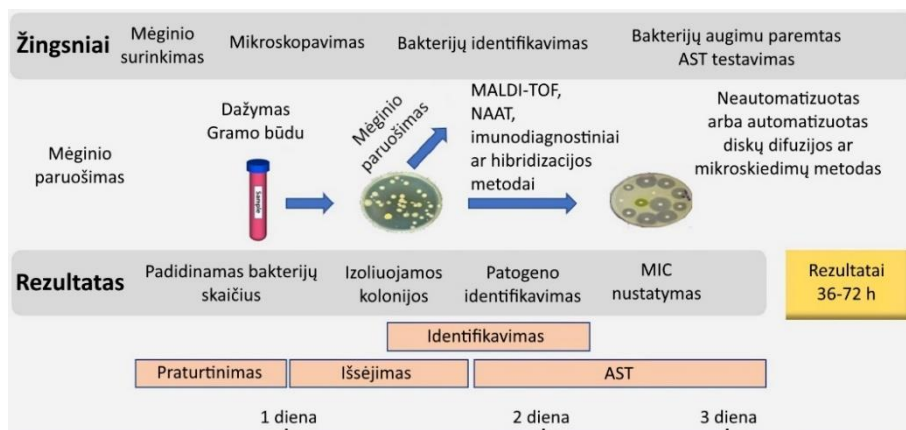
1.15 pav. Metalo β -laktamazės NDM-1 ir hidrolizuoto penicilino kompleksio kristalinė struktūra (PDB 8GPD).

2012–2014 m. laikotarpiu 40-yje šalių atlikto tyrimo duomenimis, NDM tipo β -laktamazės sudarė 44,2 % visų *Enterobacteriaceae* nustatytų MBL [66]. Daugiau nei 80 % NDM produkuojančių *E. coli* yra izoliuojama Azijos šalyse, o iš jų daugiausiai – Indijoje ir Kinijoje [67]. Skaičiuojama, kad nuo pirmųjų NDM nustatymo atvejų praėjus mažiau nei dešimtmečiui, NDM-1 spėjo išplisti po visą pasaulį. NDM-1 koduojantis genas (*bla_{NDM-1}*) nustatytas didelėje įvairovėje žarnyno mikrobiotos bakterijų, maisto produktuose

aptiktose *Shigella* spp. ir *Vibrio cholerae*, taip pat identifiikuotas *A. baumannii* ir *P. aeruginosa* izoliatuose [43], [66]. NDM-1 sintetinantys bakterijų izoliatai pasižymi daugybinio atsparumu antibiotikams, o *bla*_{NDM-1} perduodamas tarp bakterijų kartu su kitais β -laktamazės koduojančiais genais ar atsparumo antibiotikams mechanizmais [43]. Aprašyti NDM produkuojančių *Enterobacteriaceae* protrūkiai Graikijos, Meksikos ir Olandijos ligoninėse [68], [69], [70].

1.2. Bakterijų atsparumo antibiotikams klinikinė diagnostika

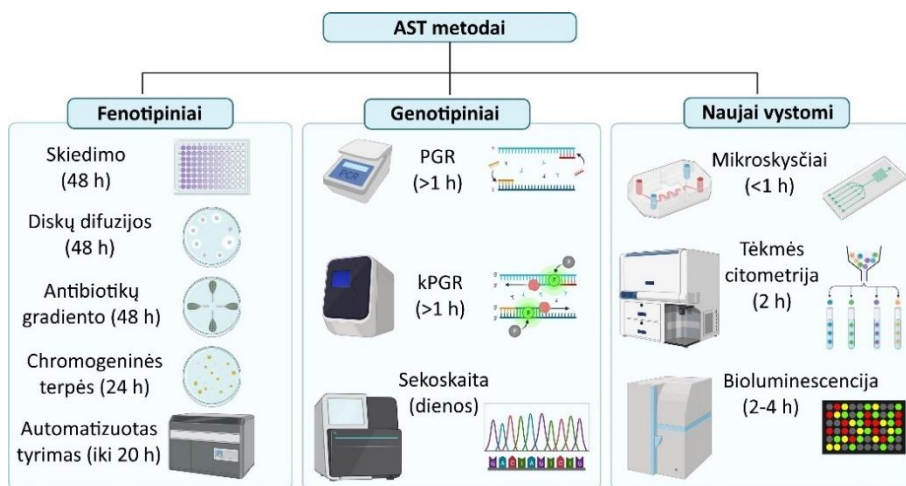
Gydant bakterijų sukeltas infekcines ligas, klinikinėje praktikoje informacija apie patogenų jautrumą antimikrobiniais junginiais yra būtina. Siekiant parinkti gydymui tinkamus antimikrobinis vaistus, klinikinėse laboratorijose atliekamas mikroorganizmų identifikavimas ir jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tyrimas (angl., *antimicrobial susceptibility testing*, AST). AST tyrimai yra svarbūs ne tik gydant infekcines ligas, bet ir leidžia identifiikuoti skirtingoms šalims ar jų regionams būdingą AMR profilį ir parinkti tam regionui tinkamą infekcinių ligų gydymo strategiją. Pavyzdžiui, jei daugiau nei 20 % tirtų bakterijų izolatų yra atsparūs konkrečiam antibiotikui, rekomenduojama pacientų gydymui šio vaisto iš viso nebenaudoti [71]. Netaikant AST tyrimų, infekcinių ligų gydymas yra neefektyvus ir, pabrėžtina, prisideda prie naujų atsparumo antibiotikams mechanizmų vystymosi ir plitimo [72]. Medicinos įstaigose AST atliekami vadovaujantis Klinikinių laboratorinių standartų instituto (angl., *Clinical Laboratory Standards Institute*, CLSI) ir Europos jautrumo antimikrobinėms medžiagoms tyrimų komiteto (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) parengtomis gairėmis [72], [73].



1.16 pav. Klinikinėje diagnostikoje naudojamo bakterijų atsparumo antibiotikams nustatymo eiga. NAAT – nukleorūgščių pagausinimo metodai. MIC – minimali augimą slopinanti antibiotiko koncentracija. Modifikuota pagal [74].

Remiantis EUCAST ir CLSI rekomendacijomis, patikimam antimikrobinio atsparumo nustatymui AST tyrimai turi būti kombinuojami kartu su fenotipiniais testais, kurie leidžia eksperimentiškai įvertinti mikroorganizmo augimą, esant antibiotikui. Pastarieji metodai yra efektyvūs nepaisant mikroorganizmo atsparumo mechanizmo bei suteikia atsakymus į praktinius klausimus: kuris antibiotikas yra veiksmingas ir kokia jo dozė turi būti naudojama gydymui. Klinikinėse laboratorijose AST tyrimai paprastai atliekami su gryną mikroorganizmų kultūrų izoliatais, todėl jautrumo antibiotikams tyrimai atliekami keliais žingsniais (1.16 pav.). Pirmiausia, klinikiniai mėginiai, pavyzdžiui, kraujas, šlapimas, gleivės, yra išsėjami ir kultivuojami, siekiant išgauti grynus bakterijų izoliatus. Kitame etape atliekamas patogeno identifikavimas, tam dažniausiai pasitelkiama MALDI-TOF masių spektrometrija. Galiausiai, remiantis EUCAST ir CLSI standartais ir rekomendacijomis, vykdomas AST testavimas. Visas tyrimo procesas užtrunka kelias dienas [40], [74].

Viena iš AST tyrimų grupių – fenotipiniai AST metodai, kuriais nustatomas fenotipinis bakterijų jautrumas antibiotikams, vertinant bakterijų augimą su šiais junginiais. Taikant šiuos metodus, rezultatai paaiškėja per 1–2 paras. Vieni dažniausiai diagnostikoje naudojamų fenotipinių AST metodų – diskų difuzijos testas ir mikroskiedimų arba antibiotikų gradiento metodai (1.17 pav.) [75].



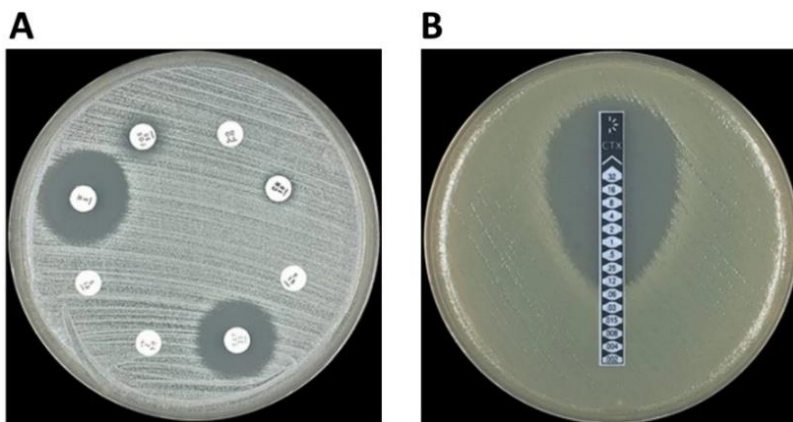
1.17 pav. Pagrindiniai klinikinėje diagnostikoje naudojami ir naujai vystomi AST tyrimų metodai. Skliaustuose nurodoma vidutinė metodo atlikimo trukmė. Modifikuota pagal [72].

Vienas iš plačiausiai naudojamų fenotipinių AST metodų – diskų difuzijos testas (1.18 pav. A). Atliekant šį tyrimą, testuojamas bakterijų izoliatų jautrumas skirtingiems antibiotikams. Šiuo metodu vizualiai vertinamas bakterijų augimas ant agarizuotos terpės su antibiotikais impregnuotais diskais. Antibiotikai iš disko difunduoja į augimo terpę, sukurdami

koncentracijos gradientą ir atitinkamoje zonoje, priklausomai nuo antibiotiko koncentracijos, slopina bakterijų augimą. Skaidrus, aplink diską susiformavęs žiedas (inhibicinė zona) ir jo skersmuo nurodo bakterijų augimo slopinimą bei jautrumo antibiotikui lygį. Jei poveikio bakterijų augimui nėra, bakterijų izoliatas nėra jautrus tiriamajam antibiotikui ir šis nėra tinkamas gydymui [73], [76].

Kitas diagnostikoje naudojamas fenotipis AST testas – mikroskiedimų metodas. Jo metu mėgintuvėliuose su skysta bakterijų augimo terpe atliekamas serijinis antibiotikų skiedimas (pavyzdžiui, 16, 8, 4, 2 $\mu\text{g/mL}$ konc.), vėliau inokuliuojant ant neselektyvios agarizuotos augimo terpės izoliuotas bakterijas iki galutinės $5 \cdot 10^5$ CFU/mL koncentracijos. Bakterijų augimas mėgintuvėliuose vertinamas po 24 h inkubacijos. Minimali antibiotiko koncentracija, ties kuria bakterijų augimas yra nenustatomas, identifikuojama kaip minimali augimą slopinanti (angl., *minimum inhibitory concentration*, MIC) antibiotiko koncentracija [77].

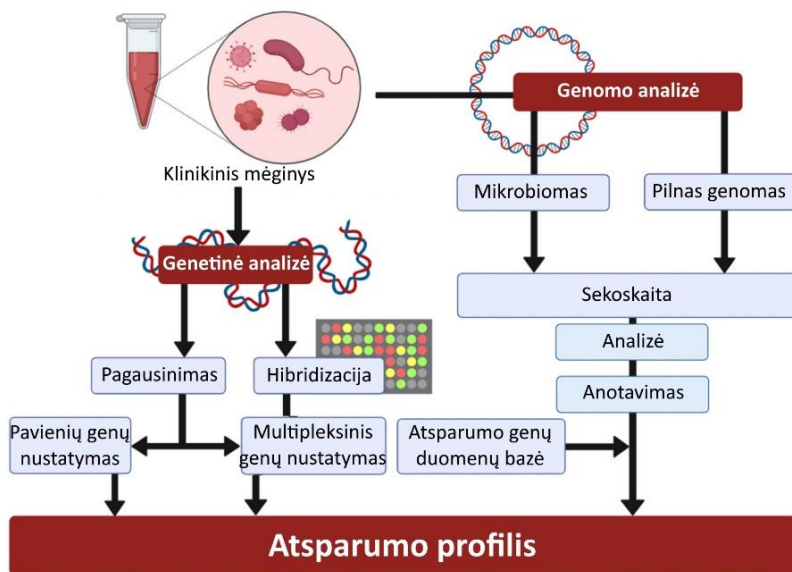
Diagnostikai taip pat plačiai naudojamas antibiotikų gradiento metodas (1.18 pav. B). Tyrimui naudojamos juostelės su antibiotiko koncentracijos gradientu, kurios dedamos ant agarizuotos terpės su išsetu mikroorganizmu. Bakterijos auginamos per naktį, MIC nustatoma vizualiai vertinant augimo slopinimo zoną [78].



1.18 pav. Diskų difuzijos ir antibiotikų gradiento testai. **(A)** Diskų difuzijos testu vertinto antibiotikams atsparaus *P. aeruginosa* izoliato rezultatai. **(B)** Antibiotikų gradiento metodu testuoto *Enterococcus* spp. izoliato rezultatai. Modifikuota pagal [83].

Tobulėjant technologijoms, klinicinei diagnostikai vis plačiau naudojami automatizuoti AST metodai. Tyrimų automatizavimas yra itin svarbus didelio našumo laboratorijų veiklai, kuriose šie tyrimai gali būti vykdomi greičiau ir paprasčiau. Šiuo metu diagnostikoje sėkmingai naudojamos tokios sistemos kaip: *VITEK2* (bioMérieux, Prancūzija), *BD Phoenix Automated Microbiology System* (BD Diagnostics, JAV) ir *Sensititre ARIS 2X* (Trek Diagnostic Systems, JAV) [72], [79].

AST diagnostikai gali būti pasitelkiami genotipiniai metodai, kurie yra peremti atsparumą antibiotikams lemiančių genų, jų mutacijų arba genų raiškos nustatymu bakterijose. Dažniausiai šie metodai kombinuojami kartu su fenotipiniais AST metodais, rečiau naudojami kaip pastarųjų alternatyva, kadangi nemaža dalis genotipinių metodų yra greitesni nei anksčiau minėtieji klasikiniai bakterijų kultivavimu paremti metodai [80]. Genotipiniai AST metodai skirstomi į kelias kategorijas: pagausinimu, hibridizacija ir sekoskaita paremtus metodus (1.19 pav.). Pagausinimo metodai, tokie kaip polimerazės grandininė reakcija (PGR) ir kiekybinė PGR (kPGR) yra vieni iš efektyviausių bei greičiausių molekulinių įrankių, naudojamų bakterijų atsparumo antibiotikams genų kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui bei profiliavimui. Pavyzdžiui, *OpGen* (JAV) sukurta multipleksinė PGR sistema *Acuitas*[®] *AMR Gene Panel*, gebanti nustatyti 28 genetinius AMR žymenis *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* ir *Enterococcus faecalis* bakterijose [81].



1.19 pav. Genotipiniai AST metodai ir tyrimų eiga. Modifikuota pagal [80].

AMR tyrimams sėkmingai pritaikyta patogenų transkriptomo analizė [84]. Lyginant su įprastų AST metodų naudojimu diagnostikoje, transkriptomo analizės taikomumą riboja ilga tyrimo trukmė, informacijos apie naujus patogenų atsparumo mechanizmus trūkumas bei dideli šio tyrimo kaštai [85].

AST tyrimams taip pat gali būti taikomas DNR mikrogardelių metodas. Specifinės DNR sekos nustatomos naudojant ant kietos fazės imobilizuotus šioms sekoms komplementarius oligonukleotidus. Naudojant mikrogardeles, vienu metu patogiai galima identifikuoti skirtingus patogenus ir didelį kiekį atsparumą lemiančių genų [80]. Pavyzdžiui, *Verigene system* (*Luminex*

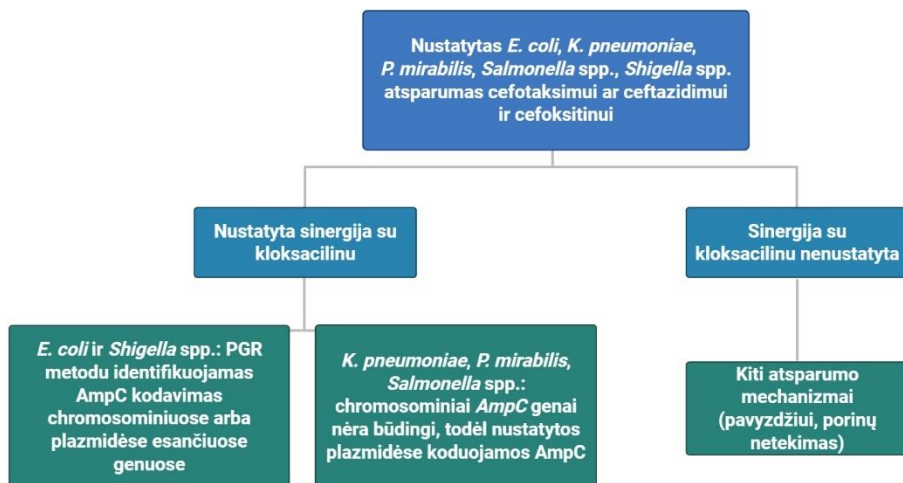
Corporation, JAV) sukurta ir komercializuota sistema *Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular assay*, kuri yra skirta 12 gramteigiamų ir 9 gramneigiamų bakterijų rūšių bei joms būdingų atsparumo antibiotikams genų, pavyzdžiui, *mecA*, *vanA*, *vanB*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* nustatymui [82].

Patogenų atsparumo tyrimams gali būti pasitelkiama pilno genomo sekoskaita. Sekoskaitos rezultatus bioinformatiškai galima lyginti su ankstesnių tyrimų ir duomenų bazių duomenimis, todėl tai – perspektyvus metodas. Pradėjus plačiai sekoskaitą taikyti diagnostikai, atsirastų galimybė identifikuoti visus patogeniui būdingus su AMR susijusius genus, tokiu būdu įvertinant patogeno atsparumo antimikrobiniais vaistais profilį [72].

Siekiant tobulinti AST diagnostiką, kuriami nauji ir inovatyvus atsparumo antibiotikams nustatymo metodai. Pavyzdžiui, mikroskysčių metodas sėkmingai pritaikytas bakterijų jautrumo antibiotikams tyrimams [86]. Taip pat, aprašytas tėkmės citometrijos, bioluminescencijos ir MALDI-TOF metodų pritaikymas ir panaudojimas AST nustatymui [87], [88], [89].

1.2.1. AmpC ir metalo β-laktamazių klinikinė diagnostika

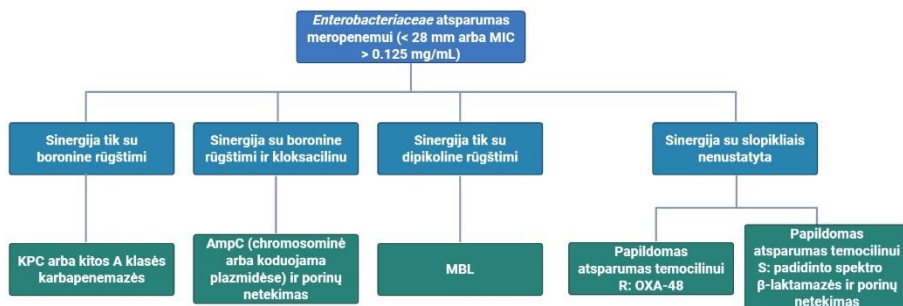
Klinikinėje diagnostikoje β-laktamazių detekcijai dažniausiai naudojami diskų difuzijos ir MIC testai. Paprastai laboratorijos neatlieka rutininių AmpC nustatymo tyrimų, o šių pasirinkimas priklauso nuo specifinių gydymo įstaigos poreikių. Šiuo metu CLSI nėra patvirtinęs AmpC nustatymui bakterijose skirtų metodų, tačiau EUCAST yra pateikęs rekomendacinio pobūdžio gaires šio tipo β-laktamazių detekcijai (1.20 pav.) [49], [90].



1.20 pav. EUCAST rekomenduojama AmpC nustatymo schema. Modifikuota pagal [49].

Rekomendacijoje teigiama, kad nustatytas atsparumas cefoksitinui (MIC > 8 mg/L, inhibicinė zona < 19 mm) kartu su atsparumu ceftazidimu ir/arba cefotaksimui gali būti naudojamas, kaip fenotipinis AmpC produkuojančių *Enterobacteriaceae* nustatymo kriterijus [49]. Tačiau, ši metodika nėra pajėgi identifikuoti plazmidėse koduojamos AmpC β-laktamazės ACC-1, kadangi ši nehidrolizuoja cefoksitino [91]. Vertinant tyrimo rezultatus, turi būti atsižvelgta ir į kitus atsparumo antibiotikams mechanizmus, pavyzdžiui, atsparumą cefoksitinui gali lemti porinų kiekio sumažėjimas bakterijose [1].

Fenotipiniai patvirtinamieji AmpC testai paprastai grindžiami šių β-laktamazių slopinimu, naudojant kloksaciliną arba boro rūgšties junginius (1.20 pav.) Tačiau boro rūgšties junginiai taip pat slopina A klasei priklausančias karbapenemazes bei kai kurias A klasės penicilazines, pavyzdžiui, *Klebsiella oxytoca* būdingas K1 šeimos β-laktamazės [49]. Nors duomenų apie šių metodų tikslumą ir efektyvumą nėra daug, tačiau juos papildo naujos literatūroje aprašytos metodikos [92], [93] bei komercializuoti testai, tokie kaip: *AmpC Detection Disc Set* (Mast, jautrumas 96–100 %, specifiškumas 98–100 %) [94], AmpC gradiento testas (*bioMerieux*, jautrumas 84–93 %, specifiškumas 70–100 %) [95] ir testas su cefotaksimu-kloksacilinu bei ceftazidimu-kloksacilinu impregnuotais diskais (*Rosco*, jautrumas 96 %, specifiškumas 92 %) [96]. *E. coli* ir *Shigella* spp. bakterijų atveju, patvirtinamieji AmpC testai nediferencijuoja įgytų AmpC ir chromosominiuose genuose koduojamų bei hiperekspresuojamų AmpC. Šiuo atveju, įgytos AmpC gali būti papildomai tvirtinamos PGR [97], [98] ar mikrogardelių metodais [98] (1.20 pav.).



1.21 pav. EUCAST rekomenduojama karbapenemazių nustatymo schema. Modifikuota pagal [49].

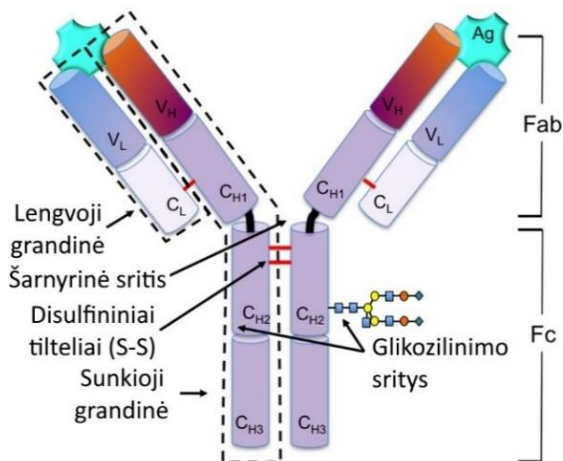
Karbapenemazių nustatymui, tarp jų ir MBL, EUCAST rekomenduoja gramneigiamų bakterijų izoliatų tyrimams naudoti diskų difuzijos testą [49]. Šiuo metu yra prieinami keletas komercinių šio testo variantų (*Mast*, *Rosco*), kuriuos sudaro meropenemu ir įvairiais β-laktamazių slopikliais impregnuoti diskai [99]. Testuose naudojama boroninė rūgštis slopina A klasės karbapenemazes, dipikolinė rūgštis ir EDTA – B klasės karbapenemazes. Papildomai testuose naudojamas AmpC β-laktamazių slopiklis –

kloksacilinas, kuri leidžia diferencijuoti AmpC hiperprodukuojančias bei porinų netekusias bakterijas ir karbapenemazių producentus [49]. Tyrimo su β -laktamazių slopikliais rezultatų interpretavimo schema pateikta 1.21 paveiksle.

CLSI yra oficialiai patvirtinės rekomendacijas karbapenemazių nustatymui [90]. Remiantis CLSI, izoliatai, kuriems būdinga ≥ 23 mm skersmens inhibicinė zona, juos testuojant su imipenemu, meropenemu ir doripenemu arba ≥ 22 mm inhibicinė zona su ertapenemu bei yra atsparūs trečios kartos cefalosporinams yra identifikuojami kaip karbapenemazių producentai [100].

1.2.2. MAK ir jų taikymas

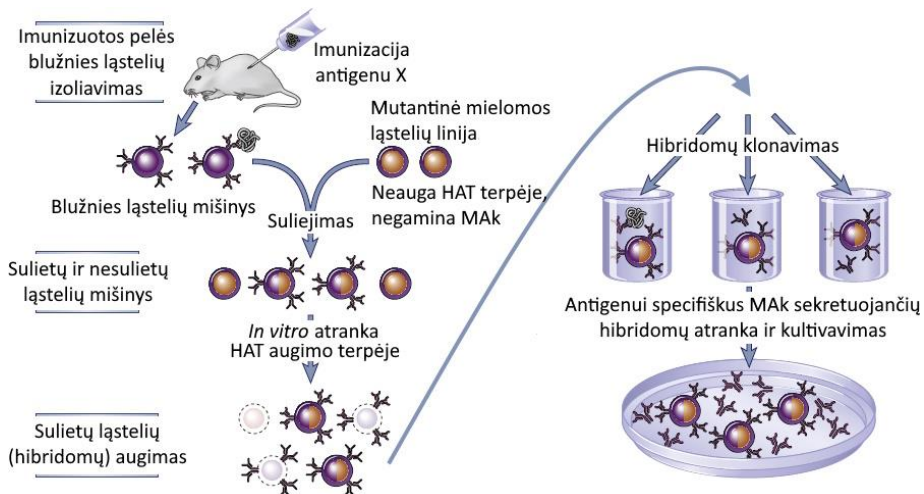
Antikūnai yra imuninės sistemos ląstelių – B limfocitų – gaminami imunoglobulinai (Ig), susidarę prieš organizmui svetimus antigenus, pavyzdžiui, virusų ar bakterijų baltymus, toksinus. Antikūnams yra būdingos bendros molekulinės struktūros savybės, tačiau didžiausi skirtumai identifikuojami antigeną surišančiose srityse. Remiantis už efektorines funkcijas atsakingos antikūno Fc (angl., *fragment crystallizable*) dalies skirtumais, antikūnai grupuojami į IgA, IgD, IgE, IgG ir IgM klases. Žmogaus IgA ir IgG papildomai skirstomi į IgA1, IgA2 ir IgG1, IgG2, IgG3 bei IgG4 poklases, o pelės IgG klasės antikūnai skirstomi į IgG1, IgG2a, IgG2b ir IgG3 poklases. Antikūno molekulės struktūrą sudaro keturios tarpusavyje disulfidiniais ryšiais sujungtos polipeptidinės grandinės, iš kurių po dvi formuoja sunkiąsias ir lengvąsias grandines (1.22 pav.). Šios grandinės turi pastoviuosius ir kaičiuosius domenų [101].



1.22 pav. IgG klasės antikūno struktūros schematinis vaizdas. Lengvoji grandinė yra sudaryta iš pastoviojo (C_L) ir variabilaus (V_L) domenų, sunkioji grandinė – iš trijų pastoviųjų (C_{H1} – C_{H3}) ir vieno variabilaus (V_H) domenų. Fab – už antigeno surišimą atsakinga antikūno dalis, Fc – už efektorines funkcijas atsakinga antikūno dalis, Ag – antigenas. Modifikuota pagal [102].

1975 m. G. Kohlerio ir C. Milsteino sukurta bei aprašyta hibridomų technologija yra vienas iš dažniausiai moksliniais ir terapiniais tikslais monokloninių antikūnų (MAk) kūrimui naudojamų metodų (1.23 pav.) [103]. Pirmajame šios technologijos žingsnyje, iš antigenų, prieš kurį norime sukurti MAk, imunizuoto gyvūno (dažniausiai pelės) blužnies izoliuotos B ląstelės yra suliejamos su mielomos ląstelių linija (1.23 pav.). Po suliejimo ląstelės auginamos selektyviose sąlygose, kuriose mielomos ir blužnies ląstelės žūva. Išgyvenusios hibridinės ląstelės yra vadinamos hibridomomis, iš kurių kiekviena sekretuoja konkrečios klasės ir specifiskumo MAk. Toliau vykdoma hibridinių ląstelių klonų, sekretuojančių tiksliniam antigenui specifiskus MAk atranka ir klonavimas. Atrinkti klonai pagausinami, kriokonservuojami, o MAk gryninami iš hibridomų augimo tespės ir toliau naudojami tyrimams [101].

MAk plačiai naudojami medicinoje ligų gydymui, jų diagnostikai bei moksliniams tyrimams (1.24 pav.). MAk yra svarbūs medicinoje naudojamų diagnostinių testų komponentai, kuriais nustatomi organizmo ar patogenų (bakterijų, virusų, grybelių, parazitų) antigenai [104].



1.23 pav. Monokloninių antikūnų (MAk) kūrimo, taikant hibridomų technologiją, proceso schematinis vaizdas. HAT – hipoksantinas, aminopterinas ir timidinas. Modifikuota pagal [101].

MAk sėkmingai naudojami daugybei diagnostinių metodų: imunofermentinei analizei, imunoblotingui, imunochemografijai, tėkmės citometrijai, imunohistochemijai, radioimuninei analizei, fluorescencinei ar konfokalinei mikroskopijai. Keli iš MAk taikymo diagnostikoje pavyzdžių – imunochemografijos metodu paremti COVID-19 bei gripo virusų antigenų bei nėštumo testai, dar kitaip vadinami greitaisiais testais [104].

Vis plačiau medicinoje MAk naudojami vėžio gydymui ir imunoterapijai. Pavyzdžiui, vėžio gydymui sėkmingai pritaikyti MAk paremti vaistai:

Trastuzumab (Herceptin), skirtas kūties vėžio, *Rituximab (Rituxan)* – B ląstelių limfomos ir *Pembrolizumab (Keytruda)* – įvairių vėžinių susirgimų gydymui [105], [106], [107]. Chimeriniais antigenų receptoriais (angl., *chimeric antigen receptor, CAR*) paremtoje T ląstelių terapijoje panaudojant MAK, genu inžinerijos metodais konstruojamos prieš vėžines ląsteles nukreiptos vėžiu sergančio paciento imuninės ląstelės.



1.24 pav. Pagrindinės MAK taikymo sritys. Parengta pagal [104].

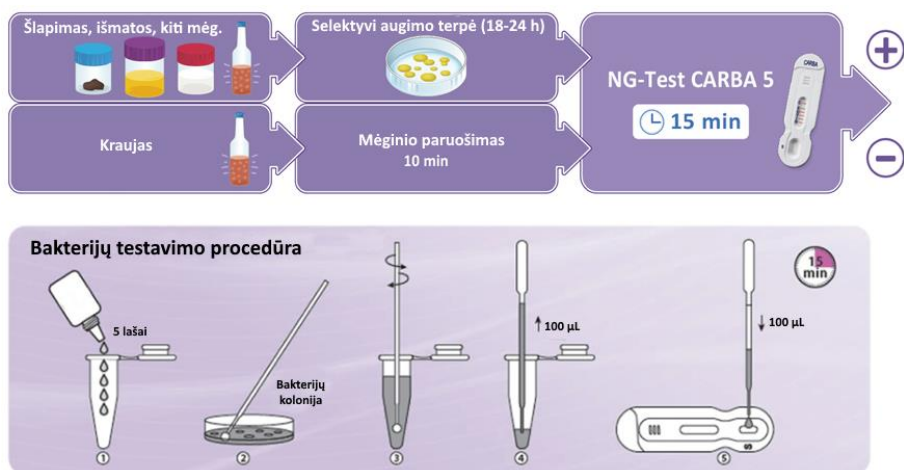
MAK pagrindu sukurti vaistai naudojami autoimuninių ligų, tokių kaip reumatoidinis artritas ar psoriazė gydymui. MAK gali būti pritaikyti ir infekcinių ligų gydymui. Pavyzdžiui, prie specifinių viruso baltymų prisijungę MAK gali sutrikdyti viruso patekimą į ląstelę šeimininkę, taip jį neutralizuojant. Moksliniuose tyrimuose MAK taikomi molekulių identifikavimui ir apibūdinimui ir yra svarbūs įrankiai baltymų sąveikos, ląstelių signalinių kelių, genų raiškos ir kituose tyrimuose. Taip pat šie antikūnai atlieka svarbų vaidmenį vakcinų kūrimo procese. Pastarieji naudojami identifikuojant potencialius vakcinos kandidatus, apibūdinant antigenus ar naudojami kituose vakcinos kūrimo etapuose [104].

1.2.3. Imunochromatografijos testo taikymas diagnostikai

MAK plačiai taikomi greitojoje diagnostikoje naudojamų testų, tokių kaip imunochromatografijos testas (angl., *lateral flow immunoassay*), kūrimui. Pastarajame dešimtmetyje šie testai tapo vienu plačiausiai greitojoje diagnostikoje naudojamų tyrimų metodų. Šie testai dažniausiai naudojami patogeniškų mikroorganizmų ar organizme susidariusių jiems specifiskų antikūnų nustatymui, seroepidemiologiniams tyrimams, identifikuojant toksiškus junginius maiste bei plačiai naudojami veterinarijoje ir augalininkystės sektoriuose. Tyrimui gali būti naudojami sudėtingi biologiniai mėginiai, pavyzdžiui, kraujas, plazma, serumas, šlapimas, gleivės, prakaitas, išmatos ar kiti [108].

Šiuo metu yra sukurti, aprašyti ir komercializuota keli β -laktamazių nustatymui antibiotikams atspariose bakterijose skirti imunochromatografijos

testai. Pavyzdžiui, multipleksiniai testai, skirti penkių pagrindinių karbapenemazių (NDM, IMP, VIM, OXA-48 ir KPC) nustatymui ir diferencijavimui: *NG-Test CARBA-5* (NG Biotech, Prancūzija), *O.K.N.V.I. RESIST-5* (Coris BioConcept, Belgija) ir *K.N.I.V.O. K-Set* (Era Biology, Kinija) [109], [110], [111]. Taip pat, komercializuotas pagrindines CTX-M β -laktamazes nustatantis testas *NG-Test CTX-M MULTI* (NG Biotech) [112]. Tačiau, tokio tipo greitieji testai, gebantys nustatyti AmpC β -laktamazes, iki šiol nėra aprašyti.



1.25 pav. *NG-Test CARBA-5* (NG Biotech) imunochromatografijos testas ir jo atlikimo principas [113].

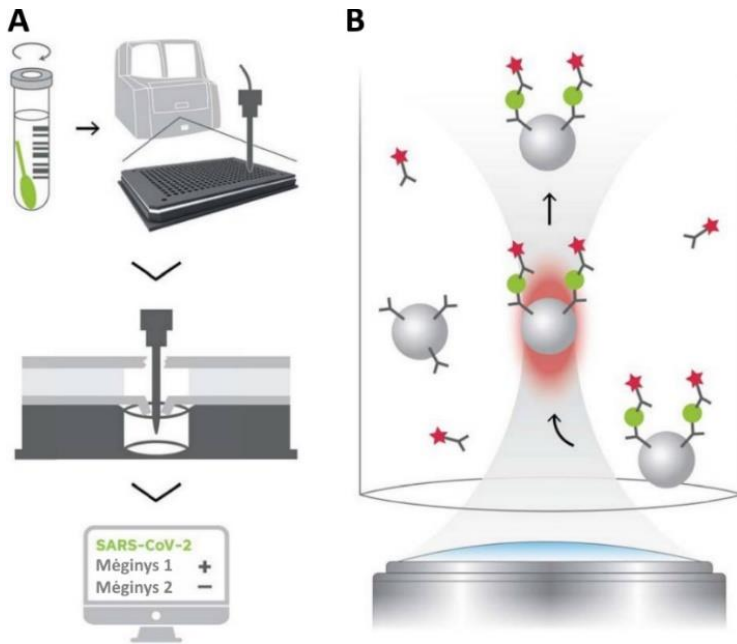
Atsparumo antibiotikams nustatymui taikant imunochromatografijos testą, testavimas paprastai atliekamas naudojant iš tiriamųjų mėginių (išmatų, šlapimo, kraujo ar kitų kūno skysčių) izoliuotas ir identifikuotas bakterijų kultūras. Sukurta greitųjų testų, kurie yra pritaikyti tiesioginiam β -laktamazių nustatymui kraujo mėginiuose, kuomet testavimas atliekamas tiesiogiai testuojant kraujo mėginį. 1.25 paveiksle pateiktas mėginių tyrimo aukščiau aprašytu *NG-Test CARBA-5* imunochromatografijos testu procedūros schematinis vaizdas. Atliekant testavimą, kelios iš mėginio izoliuotų bakterijų kolonijos suspenduojamos lizės tirpale. Paruoštas mėginys užnešamas ant testo kasetės. Praėjus 15 min, rezultatai vertinami vizualiai [113].

β -laktamazių nustatymui skirtų imunochromatografijos testų rezultatų kombinavimas kartu su klinicine informacija ir papildomomis diagnostinėmis procedūromis, gydymo įstaigoms gali padėti pasirinkti tinkamą antimikrobinį gydymą bei greitai priimti sprendimus dėl infekcijų kontrolės [113].

1.2.4. Dviejų fotonų sužadinimo technologijos (TPX) taikymas diagnostikai

Pastaraisiais metais greitosios diagnostikos tyrimams pradėta taikyti dviejų fotonų sužadinimo mikrofluorimetrine technologija (angl., *two-photon*

microfluorometric technology, TPX) paremti diagnostiniai testai. Ši technologija sėkmingai pritaikyta kvėpavimo takų ir virškinamojo trakto infekcijų sukėlėjų *in vitro* diagnostikai, kuri paremta imunocheminiais bei fermentinės reakcijos matavimų principais [114], [115], [116], [117]. Tiriant mėginius, detekcinio prietaiso pagalba realiu laiku matuojamas fluorescencijos intensyvumas bei vertinama reakcijos kinetika. Ši technologija sėkmingai pritaikyta *MariPOC*[®] SARS-CoV-2 sistemoje (*ArcDia International Ltd*, Suomija) koronaviruso testavimui nosies tepinėlio mėginiuose (1.26 pav.) [117].



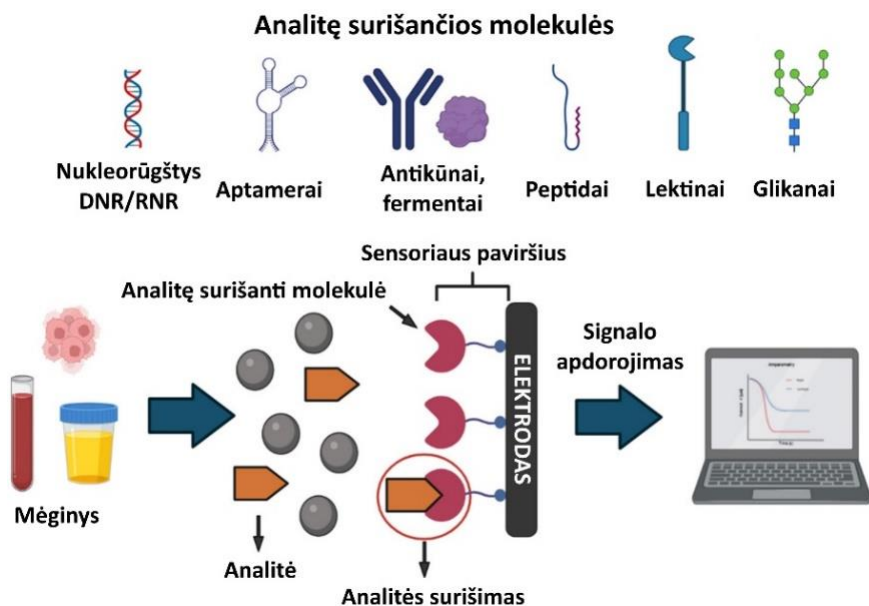
1.26 pav. *MariPOC*[®] SARS-CoV-2 diagnostinės sistema ir jos veikimo principas. **(A)** Nosies tepinėlio mėginys suspenduojamas reakcijos buferiniame tirpale, mėgintuvėlis su mėginiu talpinamas į analizatorių, mėginys išpilstomas į reakcijos šulinėlius, atliekama automatizuota mėginio analizė. **(B)** Analitės detekcija yra paremta dviepitopės imunologinės sistemos ir TPX metodo principais. Pilka sfera nurodo polistireno rutuliukus, ant kurių imobilizuoti išgaudantys antikūnai. Žalia sfera vaizduoja analitę. Raudona žaigždė nurodo fluoroforu žymėtą detektuojantį antikūną. Modifikuota pagal [117].

Atliekant tyrimą, nosies tepinėlio mėginys testuojamas automatizuotu prietaisu. Analitės detekcijai pasitelkiamas dviepitopės imunologinės sistemos principas: ant kietosios fazės – polistireno rutuliukų – imobilizuoti analitei specifiški antikūnai išgaudo mėginyje esančią analitę, o susidariusių kompleksų detekcijai naudojami fluoroforu žymėti ir su išgaudančiu antikūnu dėl prisijungimo prie analitės nekonkuruojantys detektuojantys antikūnai. Vykstant reakcijai, nustatytais laiko momentais pavieniai rutuliukai yra

apšviečiami lazeriu ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) ir fluorescencijos signalas atitinkamais laiko momentais yra matuojamas individualiai (1.26 pav.). Tyrimo rezultatai paaiškėja per 15–20 min. [117]. Ši TPX technologija sėkmingai pritaikyta ne tik COVID-19 nustatymui, tačiau ir jautrumo antimikrobinėms medžiagoms diagnostinėje sistemoje *mariAST*[®] (*ArcDia International Ltd*) [118].

1.2.5. Biojutiklių taikymas diagnostikai

Optiniai, elektrocheminiai ir akustiniai biojutikliai, imunojutikliai ir imunoanalitinės sistemos gali būti taikomos įvairių biologinių molekulių, pavyzdžiui, virusinių antigenų, antikūnų ar kitų kliniškai svarbių biožymenų, nustatymui ir apibūdinimui [119], [120]. Pažangiais fizikiniais metodais – spektrine elipsometrija ir kvarco kristalo mikrogravimetrija su disipacija – paremti biojutikliai pasižymi dideliu jautrumu, o jų konstravimui nereikalingas papildomas molekulių žymėjimas detekcinėmis žymėmis, o biomolekulių sąveika, atliekant tyrimą, gali būti vertinama realiu laiku. Tokios sistemos gali būti automatizuotos ir pritaikytos vienos analitės ar multipleksiniam kelių taikinių nustatymui mėginiuose [121]. Pastaruoju metu tokio tipo sistemų taikymas diagnostikai išsiplėtė. Ši metodika naudojama maisto produktų analizei bei jų kokybės užtikrinimui, gyvenamosios aplinkos tyrimams ir gamybinį procesų sekimui [122].



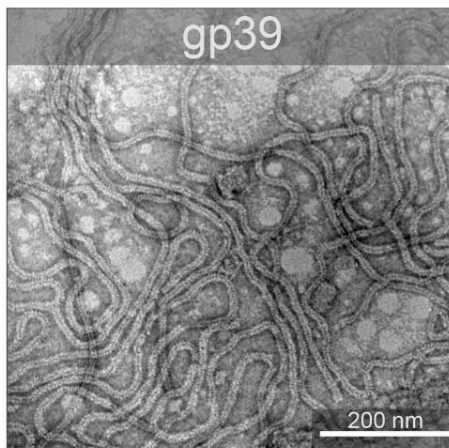
1.27 pav. Elektrocheminio biojutiklio schematinis vaizdas. Analitės surišimui ant elektrodų paviršiaus gali būti imobilizuojamos nukleorūgštys, aptamerai, antikūnai, fermentai, peptidai, lektinai ar glikanai. Modifikuota pagal [123].

Biojutiklį sudaro elektrodas, kurio paviršiuje imobilizuojamos analizę surišančios molekulės, pavyzdžiui, nukleorūgštys, aptamerai, antikūnai ar kiti baltymai, peptidai, lektinai, glikanai ir kitos molekulės (1.27 pav.). Šioms molekulėms prisijungus prie tiriamajame mėginyje esančios analizės, įvyksta elektrocheminiai pokyčiai, kurie yra proporcingi analizės koncentracijai mėginyje. Gali būti matuojami ir analizuojami tokie parametrai kaip: adsorbcija, lūžio rodiklis, sklaida, atspindys, poliarizacija ar fotoluminescencija [121], [123].

Aprašytas sėkmingas spektrinės elipsometrijos ir kvarco kristalo mikrogravimetrijos su disipacija metodų taikymas antikūnų ir antigeno sąveikos nustatymui. Pavyzdžiui, šie metodai pritaikyti SARS-CoV-2 spyglio baltymo ir po vakcinacijos ar persirgimo COVID-19 infekcija susidariusių antikūnų žmogaus kraujyje sąveikos tyrimams [124]. Taip pat ši metodika sėkmingai panaudota galvijų leukemijos viruso antigeno gp51 nustatymui [125].

1.2.6. Bakteriofago baltymas gp39 ir jo taikymas chimerinių baltymų konstravimui

Bakteriofago vB_EcoS_NBD2 baltymas gp39 [126] yra savaime susirenkantis ir multimerinės ilgų bei lanksčių nanovamzdelių struktūras formuojantis baltymas (1.28 pav.). Baltymas gp39 gali būti susintetintas mielių ar *E. coli* baltymų sintezei skirtose sistemose, o formuojami nanovamzdeliai gali būti nesudėtingai išgryninti per sacharozės gradientą. Šios oligomerinės struktūros yra stabilios įvairiuose buferiniuose tirpaluose, pavyzdžiui, karbonatiniuose, fosfatiniuose, Tris, acetatiniuose ar citratiniuose tirpaluose, ir yra atsparūs pH svyravimams (pH 3,2–9,6) bei šilumai (stabilūs iki 37 °C) [4].



1.28 pav. Bakteriofago baltymo gp39 formuojamų nanovamzdelių elektroninės mikroskopijos nuotrauka [3].

Rekombinantinio gp39 baltymo formuojama nanovamzdelių struktūra pasižymi morfologiniais panašumais į natūraliai sutinkamų virusų struktūras. Parodyta, jog šie nanovamzdeliai sukelia stiprų ląstelinį ir humoralinį atsaką laboratorinėms pelėms. Todėl, siekiant padidinti tikslinių baltymų imunogeniškumą, šios multimerinės struktūros, kaip nešikliai, gali būti panaudotos svetimų baltymų fragmentų eksponavimui [3], [4]. Tokiu būdu gali būti eksponuojami trumpi baltymų fragmentai, kurie įprastai dėl savo mažos molekulinės masės stipraus imuninio atsako organizme nesukeltų. Šiame darbe ši strategija buvo pritaikyta bakteriofago vB_EcoS_NBD2 baltymą gp39 suliejant su DHA-1 β -laktamazės 17 aminorūgščių ilgio fragmentu ir sukonstruotą chimerinį baltymą, kaip imunogeną, panaudojant kryptingam MAk prieš β -laktamazės kūrimui.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Fetalinis veršiuko serumas (FVS, angl., *fetal bovine serum*, *Biochrom*); L-glutaminas (*Roth*); gentamicino sulfatas (*Roth*); hipoksantinas, aminopterinas, timidinas (HAT, *Sigma-Aldrich*); hipoksantinas, timidinas (HT, *Sigma-Aldrich*); pilnas Freundo adjuvantas (PFA) ir nepilnas Freundo adjuvantas (NFA, *Thermo Fisher Scientific*), polietilenglikolis (PEG, *Sigma-Aldrich*); dimetilsulfoksidas (DMSO, *Roth*); jaučio serumo albuminas (BSA, angl., *bovine serum albumine*, *Roth*); 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinas (TMB) imunoblotingui *Liquid Substrate System for Membranes* (*Sigma-Aldrich*), TMB imunofermentinei analizei *NeA-Blue Tetramethylbenzidine Substrate* (*Clinical Science Products*); tetrametiletilendiaminas (TEMED, *Roth*); polivinilidenfluorido (PVDF) membrana (*Roth*).

2.1.2. Buferiniai tirpalai ir terpės

Imunofermentinėje analizėje naudoti tirpalai:

Imobilizacijos buferinis tirpalas: 0,05 M NaHCO₃ (*Roth*), pH 9,5.

Fosfatų buferinis tirpalas (PBS): 137 mM NaCl (*Roth*), 2,7 mM KCl (*Roth*), 8,1 mM Na₂HPO₄ (*Roth*), 1,5 mM KH₂PO₄ (*Roth*).

Fosfatų buferinis tirpalas su detergentu *Tween-20* (PBST): PBS su 0,1 % *Tween-20* (v/v) (*Roth*).

Blokavimo tirpalai: PBS su 2 % (w/v) BSA; 1 x *Roti-Block*[®] tirpalas (*Roth*); PBS su 2 % (w/v) pieno miltelių (*Roth*) ir 0,5 % *Tween-20*.

Ryškinimo tirpalas: *NeA-Blue Tetramethylbenzidine Substrate*.

Baltymų elektroforezėje denatūruojančiomis sąlygomis naudoti tirpalai:

Akrilamido-bisakrilamido tirpalas: 30 % (w/v) akrilamido (*Roth*), 0,8 % N,N-Metilenbisakrilamido (*Roth*).

1,5 M Tris-HCl (*Roth*) tirpalas, pH 8,8.

0,5 M Tris-HCl tirpalas, pH 6,8.

10 % (w/v) amonio peroksosulfato tirpalas (*Roth*).

10 % (w/v) natrio dodecilsulfato (SDS, angl. *sodium dodecyl sulfate*, *Roth*) tirpalas.

4 % koncentruojamasis gelis: 4 % (v/v) akrilamido-bisakrilamido, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % (v/v) SDS, 0,05 % (v/v) amonio peroksosulfato, 0,1 % (v/v) TEMED.

12 % skiriamasis gelis: 12 % (v/v) akrilamido-bisakrilamido, 0,4 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % (v/v) SDS, 0,05 % (v/v) amonio peroksosulfato, 0,1 % (v/v) TEMED.

Baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 24,7 mM Tris-HCl, 192 mM glicino, 3,5 mM SDS, pH 8,3–8,6.

Baltymus redukuojantis užnešimo buferinis tirpalas *Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer* (Thermo Fisher Scientific).

Gelio dažas *Page Blue Protein Staining Solution* (Thermo Fisher Scientific).

DNR ir RNR elektroforezėse naudoti tirpalai:

0,5 M NaOH (*Roth*) tirpalas.

Tris-acetatinis buferinis tirpalas (TAE) (*Thermo Fisher Scientific*).

Mėginių užnešimo dažai: *TriTrack DNA Loading Dye*, *RNA Gel Loading Dye* (*Thermo Fisher Scientific*).

DNR dažas: *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (*Biotium*).

Imunoblotinge naudoti tirpalai:

Baltymų pernešimo buferinis tirpalas: 25 mM Tris, 150 mM glicino, 10 % (v/v) metanolio.

Blokavimo tirpalas: PBS su 2 % (w/v) pieno miltelių.

Plovimo buferinis tirpalas: PBST.

Antikūnų skiedimo buferinis tirpalas: blokavimo tirpalas su 0,1 % (v/v) *Tween-20*.

Ryškinimo tirpalai: PBS su 0,05 % (v/v) 4-chlornaftolio (*Sigma-Aldrich*), 16 % (v/v) metanolio (*Roth*), 0,02 % (v/v) H₂O₂ (*Roth*); *Liquid Substrate System for Membranes*.

Imunochromatografijoje naudoti tirpalai:

Žalias dažas – *ProClin300* (*Roth*) santykiu 1:40 skiestas su PBS, 3,3 mM *Orange G* (*Roth*), 0,56 mM ksileno sianolio (*Roth*).

Žydras dažas – 3,7 mM bromfenolio mėlynojo dažo (*Roth*).

Mėlynas dažas – *Remazol Brilliant Blue R* (*Roth*), kuris yra žymėtas BSA.

Blokavimo tirpalas: PBS su 2 % (w/v) BSA.

Konservavimo tirpalas: 10 % (w/v) sacharozės (*Roth*), 10 mM kalio fosfato, pH 7,4.

Mėginių užnešimo tirpalas: 0,5 % (w/v) BSA, 0,5 % *Tween-20*, 1 % detergento 3-((3-cholamidopropil) dimetilamonio)-1-propanosulfonato (*CHAPS*, *Roth*), 0,5 x PBS.

Antikūnų žymėjimui aukso nanodalelėmis naudoti tirpalai:

10 mg/mL 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropyl) carbodiimido (EDC, *Roth*) tirpalas.

10 mg/mL N-hidroksisulfosukcinimido (sulfo-NHS, *Sigma-Aldrich*) tirpalas.

50 % (w/v) hidroksilamino chlorido (*Roth*) tirpalas.

Dializės tirpalas: 10 mM kalio fosfatinis buferinis tirpalas, pH 7,4.

Reakcijos tirpalas: 5 mM kalio fosfato (pH 7,4), 0,5 % (w/v) polietilenglikolio (PEG) Mr 8000 (*Roth*).

Saugojimo tirpalas: 0,1 x PBS, 0,5 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) *Tween-20*, 0,05 % (w/v) natrio azido (*Roth*), pH 8.

Antikūnų žymėjimui krienų peroksidaze naudoti tirpalai:

Natrio karbonatinis buferinis tirpalas: 0,2 M NaHCO₃ (*Roth*), 0,2 M Na₂CO₃ (*Roth*), pH 9,5.

4 mg/mL NaBH₄ (*Roth*).

0,2 M NaIO₄ (*Roth*).

1 M natrio acetatinis buferinis tirpalas, pH 4,5.

Antikūnų grynimui naudoti tirpalai:

Užnešimo buferinis tirpalas (IgG1 grynimui): 1,5 M glicino (*Roth*), 3 M NaCl, pH 8,9.

Užnešimo buferinis tirpalas (IgG2a/b grynimui): 0,1 M Tris-HCl, pH 8.

Koncentruotas 1 M Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 8.

Eliucijos tirpalas: 0,1 M glicino, pH 3.

20 % (v/v) etanolio tirpalas.

Rekombinantinių baltymų grynimui nikelio chelatinės chromatografijos metodu naudoti tirpalai:

Užnešimo buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 20 mM imidazolo (*Roth*), 10 mM β-merkaproetanolio (β-ME, *Roth*).

Plovimo buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 80–100 mM imidazolo, 10 mM β-ME.

Eliucijos buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 500 mM imidazolo, 10 mM β-ME.

Biomasės ardymo buferinis tirpalas: užnešimo buferinis tirpalas su 1 mM fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF, *Sigma-Aldrich*).

Rekombinantinių baltymų grynimui jonų mainų chromatografijos metodu naudoti tirpalai:

- rACT-14, rPDC-195 ir rCMY-34 grynimui:

Užnešimo buferinis tirpalas: 50 mM Na₂HPO₄ (*Roth*), pH 7,4.

Eliucijos buferinis tirpalas: 1 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,4.

Baltymų saugojimo buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM ditioneitolio (DTT, *Roth*).

- rNDM-1 grynimui:

Užnešimo buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl, pH 8.

Eliucijos buferinis tirpalas: 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.

Baltymų saugojimo buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 2 mM DTT.

Darbui su bakterijomis naudoti tirpalai ir terpės:

Transformacijos NaCl tirpalas: 5 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂ (*Roth*), 100 mM NaCl.

Transformacijos CaCl₂ tirpalas: 5 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂, 100 mM CaCl₂ (*Roth*).

Luria-Bertani (LB) terpė *Lennox* (*Roth*).

Agarizuota LB terpė *Lennox* (*Roth*).

30 mg/mL kanamicino tirpalas (*Sigma-Aldrich*).

100 mg/mL ampicilino tirpalas (*Sigma-Aldrich*).

100 mM PMSF tirpalas.

Izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas (IPTG, *Thermo Fisher Scientific*).

Biomasės praplovimo buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 200 mM NaCl.

Darbai su žinduolių ląstelių kultūromis naudoti tirpalai ir terpės:

50 mg/mL gentamicino tirpalas (*Sigma-Aldrich*).

200 mM L-glutamino tirpalas (*Sigma-Aldrich*).

Hibridomų ir Sp2/0 augimo terpė: *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė (DMEM, angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) su 2 mM L-glutamino, 200 µg/mL gentamicino ir 10–15 % (v/v) FVS.

Terpė be serumo: DMEM su 2 mM L-glutamino, 300 µg/mL gentamicino.

Konservavimo terpė: FVS su 10 % DMSO.

HAT terpė: hibridomų augimo terpė su HAT (1 mM hipoksantino, 0,4 µM aminopterino, 16 µM timidino).

HT terpė: hibridomų augimo terpė su HT (1 mM hipoksantino, 16 µM timidino).

2.1.3. Rekombinantiniai baltymai

Darbai naudoti rekombinantiniai baltymai, kurie buvo sukonstruoti, susintetinti *E. coli* bakterijose ir išgryninti Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biotechnologijos institute (VU GMC BTI) Eukariotų genų inžinerijos (EGIS) ir Imunologijos skyriuose (ILS):

- Rekombinantinės su maltozę surišančiu baltymu (MBP) sulietos β-laktamazės: rADC-144-MBP, rIMI-1-MBP, rIMP-1-MBP; rKPC-2-MBP, rOXA-48-MBP, rOXA-134-MBP, rSHV-42-MBP, rSME-3-MBP;
- Rekombinantinis MBP baltymas.

Saccharomyces cerevisiae susintetintas chimerinis, multimerinius vamzdelius formuojantis gp39m baltymas, sulietas su DHA-1 77–93 aminorūgščių (ar.) (*GenBank* nr. AEP68014.1) fragmentu (gp39m_J_DHA), gautas iš VU GMC BTI EGIS.

2.1.4. Antikūnai

Krienų peroksidaze (HRP, angl. *horseradish peroxidase*) žymėti ožkos polikloniniai antikūnai (PAk) prieš pelės IgG *Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP* (*BioRad*); ožkos PAk prieš pelės IgG *Goat Anti-Mouse IgG (H+L)* (*SouthernBiotech*).

Izotipinėms kontrolėms naudoti anksčiau VU GMC BTI ILS sukurti MAK: IgG1 poklasio MAK 18E4 prieš namų dulkių erkių alergeną Der p 23; IgG2a poklasio MAK 20G11, IgG3 poklasio MAK 20D1 ir IgG1 poklasio MAK 3D7 prieš SARS-CoV-2 spyglio baltymą.

2.1.5. Rinkiniai

Plazmidinės DNR gryninimo rinkinys *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*; PGR produktų ir DNR fragmentų gryninimo iš agarozinio gelio rinkiniai: *GeneJET Gel Extraction Kit*, *GeneJET PCR Purification Kit*; RNR gryninimo rinkinys *GeneJET RNA Purification Kit*; kopijinės DNR (kDNR) sintezės rinkinys *RevertAid RT Kit*, DNR fragmentų ir PGR produktų klonavimo

rinkiniai: *Rapid DNA Ligation Kit* ir *CloneJET PCR Cloning Kit*; baltymų koncentracijos nustatymo rinkinys *Pierce Bradford Protein Assay Kit* (*Thermo Fisher Scientific*).

Pelės antikūnų klasės ir poklasio nustatymo rinkinys *Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit* (*BD Biosciences*).

Imunochromatografinio testo kostravimui skirtas rinkinys *Lateral Flow Material Starter Kit* (*nanoComposix*).

2.1.6. Fermentai, žymės

Klonavimo darbuose naudoti fermentai: *Fast Digest* BamHI, *Fast Digest* XhoI restrikcijos endonukleazės (RE), *FastAP* temperatūrai jautri šarminė fosfatazė, *dsDNase* (*Thermo Fisher Scientific*).

Polimerazės grandininėje reakcijoje naudoti reagentai: *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix*, *DreamTaq Green PCR Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*).

Antikūnai žymėti su: HRP (*Merck*); 40 nm aukso nanodalelėmis *BioReady 40 nm Carboxyl Gold* (*nanoComposix*).

2.1.7. Molekulinės masės standartai

DNR/RNR fragmentų ilgio standartai: *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*, *GeneRuler 50 bp DNA Ladder*, *RiboRuler High Range RNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*).

Baltymų molekulinės masės standartai: *PageRuler Prestained Protein Ladder*, *PageRuler Unstained Protein Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*).

2.1.8. Pradmenys, genai ir vektoriai

Pradmenys buvo susintetinti *Eurofins Genomics*. 2.1 lentelėje pateikti pradmenys naudoti β-laktamazių persidengiančių fragmentų kūrimo darbuose. Tiesioginis pradmuis 5'-gale turi BamHI, o atvirkštinis – XhoI RE hidrolizės sritis. Atvirkštinis pradmuis papildomai koduoja STOP kodoną (TAA).

2.1 lentelė. Persidengiančių ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34 baltymų fragmentų konstravimui naudoti pradmenys

Fragmentas	Pradmuis	Pradmens seka* (5'–3')	Sritis baltyme, ar.
ACT-14			
ACT-14_1	ACT_1_F	ACAGGATCCATGATGAAGAAGAGCCTG	1–175
	ACT_1_R	ACACTCGAGTTAAATACTGGCATTGGCATAC	
ACT-14_2	ACT_2_F	ACAGGATCCGCCGTGATCTATCAGGGT	51–175
	ACT_2_R	ACACTCGAGTTAAATACTGGCATTGGCATAC	
ACT-14_3	ACT_3_F	ACAGGATCCGCCGTGATCTATCAGGGT	51–251
	ACT_3_R	ACACTCGAGTTAGGCCATATCCTGAACATTG	
ACT-14_4	ACT_4_F	ACAGGATCCAAACCGCTGAAACTGGATC	200–335
	ACT_4_R	ACACTCGAGTTATTATGCACCCAGCTTGC	
ACT-14_5	ACT_5_F	ACAGGATCCAAACCGCTGAAACTGGATC	200–381
	ACT_5_R	ACACTCGAGTTACTGCAGGGCATC	

Fragmentas	Pradmuo	Pradmens seka ^a (5'–3')	Sritis baltyme, ar.
NDM-1			
NDM-1_1	NDM_1_F	ACAGGATCCATGGAAGTCCGAATATTATG	1–119
	NDM_1_R	ACACTCGAGTTAGGTAACCAACGGCCAGTG	
NDM-1_2	NDM_2_F	ACAGGATCCAATGTGTGGCAGCATACC	57–180
	NDM_2_R	ACACTCGAGTTATAACGGGCCGAAGTTCG	
NDM-1_3	NDM_3_F	ACAGGATCCAATGTGTGGCAGCATACC	57–270
	NDM_3_R	ACACTCGAGTTAGCGCAGTTTATCTGCC	
PDC-195			
PDC-195_1	PDC_1_F	ACAGGATCCATGCGCGATACCCGCTTC	1–108
	PDC_1_R	ACACTCGAGTTATTATCCTGGGCCAGTG	
PDC-195_2	PDC_2_F	ACAGGATCCCTGGCAGTGGCCATTAG	53–139
	PDC_2_R	ACACTCGAGTTAGGTATAGGTGGCCAGATC	
PDC-195_3	PDC_3_F	ACAGGATCCGCCGGTTATGCACTGGC	100–296
	PDC_3_R	ACACTCGAGTTACAGGCCCTGGGTCATATC	
PDC-195_4	PDC_4_F	ACAGGATCCAGCATTGGCCTGTTCCG	181–296
	PDC_4_R	ACACTCGAGTTACAGGCCCTGGGTCATATC	
PDC-195_5	PDC_5_F	ACAGGATCCGTGGATGCAAACTCTGCATC	262–397
	PDC_5_R	ACACTCGAGTTAGCGTTTCAGCGGCACT	
PDC-195_6	PDC_6_F	ACAGGATCCCTGGGTTGGGAAGCATATG	295–397
	PDC_6_R	ACACTCGAGTTAGCGTTTCAGCGGCACT	
CMY-34			
CMY-34_1	CMY_1_F	ACAGGATCCATGATGAAAAAAGCCTGTG	1–135
	CMY_1_R	ACACTCGAGTTAATCACCACCTAAAACACC	
CMY-34_2	CMY_2_F	ACAGGATCCGCAGCAAAAACCGAACAG	22–135
	CMY_2_R	ACACTCGAGTTAATCACCACCTAAAACACC	
CMY-34_3	CMY_3_F	ACAGGATCCGTTGCAAGTTATTTATCAGGGT	50–135
	CMY_3_R	ACACTCGAGTTAATCACCACCTAAAACACC	
CMY-34_4	CMY_4_F	ACAGGATCCATTGCCCGTGGTGAATC	98–292
	CMY_4_R	ACACTCGAGTTATTCCCACTAAACCTTG	
CMY-34_5	CMY_5_F	ACAGGATCCATTGGTCTGTTTGGTGC	175–292
	CMY_5_R	ACACTCGAGTTATTCCCACTAAACCTTG	
CMY-34_6	CMY_6_F	ACAGGATCCATTGGTCTGTTTGGTGC	175–381
	CMY_6_R	ACACTCGAGTTACTGCAGTTTTTCCAGAATAC	

^aPabrauktos RE hidrolizės sritys; TTA – STOP kodonas

2.2 lentelėje pateikti pradmenys buvo naudoti MAK variabiliųjų sunkiosios (VH) ir lengvosios (VL) grandinių sekų nustatymui. Pradmenys parinkti remiantis literatūra [127], [128].

2.2 lentelė. Pradmenys naudoti MAK VL ir VH sekų nustatymui

Pradmuo	Pradmens seka
IgG1	5'–TTAATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC–3'
IgG2a	5'–TTACTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA–3'
IgG3	5'–TTAAGGGACCAAGGGATAGACAGATGG–3'
MH1	5'–CATATGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC–3'
VH1FOR	5'–TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG–3'
VH1BACK	5'–AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG–3'
Kc	5'–TTAGGATACAGTTGGTGCAGCATC–3'
Mk	5'–CATATGGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA–3'

Pradmenys, pateikti 2.3 lentelėje, buvo naudoti į vektorius įklonuotų fragmentų sekoskaitai ir jų vertinimui kolonijų PGR metodu.

2.3 lentelė. Sekoskaitai ir klonavimo darbuose naudoti pradmenys

Pradmuo	Pradmens seka
T7prom-fw	5'–TAATACGACTACTATAGGG–3'
T7term-rev	5'–GCTAGTTATTGCTCAGCGG–3'
pJET1.2_F	5'–CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC–3'
pJET1.2_R	5'–AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG–3'

Pradmenys, pateikti 2.4 lentelėje, naudoti β -laktamazės koduojančių genų nustatymui bakterijų izoliatuose. Pradmenys parinkti remiantis literatūra [129].

2.4 lentelė. Pradmenys naudoti β -laktamazės koduojančių genų nustatymui

Pradmuo	Pradmens seka
ACT-F2	5'-TNAGNAAAACCTTCACCGGC-3'
ACT-R2	5'-NACNGGCCAGTTGAGCATC-3'
NDM-F	5'-GGGGATTGCGACTTATGC-3'
NDM-R	5'-AGATTGCCGAGCGACTTG-3'
PDC-F	5'-NCTGTTCCGGCTATCTCNCC-3'
PDC-R	5'-ANCCGGTCTTGTTCAGCA-3'
CMY-F1	5'-MTGGGGKAAAGCCGATATC-3'
CMY-R1	5'-AGTTCAGCATCTCCCANCC-3'

β -laktamazės koduojantys genai buvo susintetinti *Invitrogen*. ACT-14 koduojanti seka – *GenBank* nr. JX440354.1, NDM-1 – *GenBank* nr. KJ018857.1, PDC-195 – *GenBank* nr. CP007147.1, CMY-34 – *GenBank* nr. EF394370.1, DHA-1 – *GenBank* nr. JN638038.1.

Rekombinantinių β -laktamazių ir sutrumpintų baltymų fragmentų sintezei naudotas pET28a(+) vektorius (*Merck*), MAK VH ir VL koduojančių sekų nustatymo darbuose naudotas pJET1.2/blunt vektorius (*Thermo Fisher Scientific*).

2.1.9. Sintetiniai peptidai

Visi darbe naudoti sintetiniai peptidai buvo susintetinti *SB-Peptide* ir *GenScript*. MAK prieš CMY-34 epitopų nustatymui naudoti sintetiniai peptidai, kurie N-gale jungtuku (SGSG ar.) prijungti prie biotino, pateikti 2.5 lentelėje.

2.5 lentelė. MAK 9D2 prieš CMY-34 epitopų nustatymui naudoti sintetiniai peptidai

Peptidas	Seka ^a	CMY-34 regionas, ar. ^b
P0	SGSGAKTEQQIADIVNRTITPLMQEQAIPGMA	22–49
P1	SGSGEQIADIVNRTITPLMQEQAIPGMA	25–49
P2	SGSGIADIVNRTITPLMQEQAIPGMA	28–49
P3	SGSGIVNRTITPLMQEQAIPGMA	31–49
P4	SGSGRTITPLMQEQAIPGMA	34–49
P5	SGSGTPLMQEQAIPGMA	37–49
P6	SGSGMQEQAIPGMA	40–49
P7	SGSGQAIPGMA	43–49
P8	SGSGPGMA	46–49
P9	SGSGAKTEQQIADIVNRTITPLMQEQAIP	22–46
P10	SGSGAKTEQQIADIVNRTITPLMQEQ	22–43
P11	SGSGAKTEQQIADIVNRTITPLM	22–40
P12	SGSGAKTEQQIADIVNRTIT	22–37
P13	SGSGAKTEQQIADIVNR	22–34
P14	SGSGAKTEQQIADI	22–31
P15	SGSGAKTEQQI	22–28
P16	SGSGAKTE	22–25

^aPeptido N-gale jungtuku (SGSG) prijungtas biotinas

^bPagal pilno ilgio CMY-34 ar. seką *GenBank* nr. ABN51006.1

MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ epitopų nustatymui naudoti sintetiniai DHA-1 77–93 ar. (*GenBank* nr. AEP68014.1) apimantys persidengiantys peptidai (2.6 lentelė). Sintetiniai peptidai, naudoti MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ kryžminio reaktyvumo tyrimuose yra pateikti 2.7 lentelėje. Šių peptidų N-galas jungtuku (SGSG ar.) prijungtas prie biotino.

2.6 lentelė. MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ epitopų nustatymui naudoti sintetiniai peptidai

Peptidas	Seka	DHA-1 regionas, ar. ^a
P0	TLFELGSVSKTFTGVLG	77–93
P1	FELGSVSKTFTGVLG	79–93
P2	LGSVSKTFTGVLG	81–93
P3	SVSKTFTGVLG	83–93
P4	SKTFTGVLG	85–93
P5	TLFELGSVSKTFTGV	77–91
P6	TLFELGSVSKTFT	77–89
P7	TLFELGSVSKT	77–87
P8	TLFELGSV	77–84

^aPagal pilno ilgio DHA-1 ar. seką *GenBank* nr. AEP68014.1

2.7 lentelė. MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ kryžminio reaktyvumo nustatymui naudoti sintetiniai peptidai

Peptidas	Seka ^a
P_1	SGSGFEIGSLSKTFT
P_2	SGSGFEVGLSKTFT
P_3	SGSGFEIGSVSKVFT
P_4	SGSGFEIGSVSKTYT
P_5	SGSGFEIGSVSKTLT
P_6	SGSGFEIGSVSKPLT
P_7	SGSGFEVGLSVSKPLT
P_8	SGSGFEIGSLSKPFT
P_9	SGSGFEVGLSKTFA

^aPeptido N-gale jungtuku (SGSG) prijungtas biotinas

2.1.10. Ląstelių linijos

Hibridomų kūrimui naudota pelės mielomos Sp2/0 ląstelių linija (CRL-1581, *ATCC*). Šios ląstelės nesintetina imunoglobulinų ir dėl išveiklintų timidinkinazę (TK) ir hipoksantinguaninfosforiboziltransferazę (HGFET) koduojančių genų, ši ląstelių linija neauga selektyvioje HAT terpėje [130].

2.1.11. Eksperimentiniai gyvūnai

Hibridomų kūrimo darbuose naudotos BALB/c linijos pelės, kurios buvo veisiamos ir laikomos VU GMC Biochemijos instituto, Biologinių modelių skyriaus patalpose. Eksperimentai su laboratoriniais gyvūnais buvo atlikti pagal Lietuvos ir Europos teisės aktus. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas laboratorinių pelių naudojimui polikloninių ir monokloninių antikūnų kūrimui nr. G2-117. Eksperimentus atliko VU GMC BTI Imunologijos skyriaus darbuotojai (dakt. Karolina Bielskė ir dr. Indrė Kučinskaitė-Kodžė), turintys išduotą pažymėjimą, suteikiantį teisę dirbti su laboratoriniais gyvūnais Lietuvos Respublikoje.

2.1.12. Genų inžinerijos darbams naudoti bakterijų kamienai

E. coli DH10B klonavimo kamienas (*Novagen*) naudotas β -laktamazės koduojančių genų, trumpintų baltymų fragmentų ir MAK variabilijų sekų klonavimui.

E. coli Tuner(DE3) raiškos kamienas (*Novagen*) naudotas rekombinantinių β -laktamazių sintezei, BL21(DE3) kamienas (*Novagen*) – trumpintų baltymų fragmentų sintezei.

2.1.13. Bakterijų izoliatai

MAK apibūdinimo ir imunocheminių tyrimo metodų kūrimo darbams naudoti antibiotikams atsparių bakterijų izoliatai su žinomu koduojamų β -laktamazių profiliu pateikti 2.8 ir 2.9 lentelėse. 2.8 lentelėje nurodytas *Citrobacter portucalensis* izoliatas gautas iš A. Hammerum ir kolegų [131], likę lentelėje pateikti bakterijų izoliatai gauti iš *Culture Collection University Of Gothenburg* (Švedija) kolekcijos.

Izoliatai pateikti 2.9 lentelėje gauti iš Turku universitetinės ligoninės (TYKS), Klinikinės mikrobiologijos laboratorijos (Suomija). Šie izoliatai testuoti TPX technologija paremta sistema ir imunochromatografiniu testu.

2.8 lentelė. MAK apibūdinimo ir taikymo darbuose naudoti patogeniškų bakterijų izoliatai

Eil. Nr.	Identifikacijos Nr.	Bakterijų rūšis	β -laktamazių profilis
1.	3826Z08	<i>Citrobacter portucalensis</i>	CMY-34
2.	CCUG60138	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1, CMY-4 ^a
3.	CCUG68728	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1, CMY-4 ^a
4.	CCUG74036T	<i>Acinetobacter chinensis</i>	NDM-1
5.	CCUG74037	<i>Acinetobacter chinensis</i>	NDM-1

^a*bla*_{CMY} nustatytas PGR metodu, CMY alelinis variantas identifikuotas po PGR produkto sekoskaitos

2.9 lentelė. MAK diagnostinio potencialo vertinimui testuoti patogeniškų bakterijų izoliatai. NDM tipo ir CMY tipo β -laktamazės pabrauktos

Eil. Nr.	Identifikacijos Nr.	Bakterijų rūšis	β -laktamazių profilis
1.	50627996	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM-1, CMY-6, OXA-1, CTX-M-15, SHV-11
2.	50639799	<i>Escherichia coli</i>	CMY-4, OXA-1, VIM-29, CTX-M-15
3.	50664164	<i>Proteus mirabilis</i>	NDM-1, CMY-16, OXA-10
4.	50664179	<i>Escherichia coli</i>	NDM-5, SHV-12, TEM-1B
5.	50677418	<i>Citrobacter</i> sp.	NDM-1
6.	50694638	<i>Escherichia coli</i>	CMY
7.	50816743	<i>Escherichia coli</i>	CMY-2, OXA-48, OXA-1, CTX-M-15, TEM-1B
8.	50700924	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48, SHV-11
9.	50531633	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48, CTX-M-15, SHV-76, TEM-1B
10.	50884375	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-162, CTX-M-15, SHV-28/-100, TEM-1B
11.	50793946	<i>Proteus mirabilis</i>	Neigiamas
12.	50796520	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Neigiamas

2.2. Metodai

2.2.1. MAk kūrimui naudoti metodai

MAk kūrimo etapai: BALB/c linijos pelių imunizacija, Sp2/0 linijos ląstelių kultivavimas, hibridizacija, hibridinių ląstelių atranka ir klonavimas.

2.2.1.1. Imunizacija

Imunizacijai naudotos 6–8 savaičių BALB/c linijos pelės, kurios buvo laikomos VU GMC Biochemijos institute, Biologinių modelių skyriuje. Su rACT-14, rNDM-1, rPDC-195, rCMY-34 ir gp39m_J_DHA baltymais imunizuota po 3 laboratorines peles. Imunizacija atlikta po 3 kartus, kas 28 dienas suleidžiant antigeną pelei po oda. Pirmos imunizacijos metu buvo suleista po 50 µg baltymų PBS buferiniame tirpale, tūrio santykiu 1:1 (v/v) sumaišytų su PFA. Po 28 dienų pelės pakartotinai imunizuotos su 50 µg antigeno, tūrio santykiu 1:1 (v/v) sumaišytu su NFA. Praėjus 56 dienoms po pirmos imunizacijos, tokia pačia tvarka, vietoje adjuvanto naudojant PBS, pelės imunizuotos trečiąjį kartą. Prieš kiekvieną imunizaciją iš uodegos venos surinkti kraujo mėginiai, kurie buvo naudoti antigenui specifiskų polikloninių antikūnų titro nustatymui netiesioginės imunofermentinės analizės (IFA) metodu su rACT-14, rNDM-1, rPDC-195, rCMY-34 ir rDHA-1. Trys dienos prieš hibridizaciją pelėms, kurių antigenui specifiskų antikūnų titras kraujyje buvo didžiausias, papildomai suleista po 50 µg su PBS skiestų baltymų.

2.2.1.2. Hibridomų kūrimas

Hibridomų kūrimui naudota Sp2/0 mielomos ląstelių linija. Prieš hibridizaciją ląstelės auginamos DMEM terpėje su 10 % FVS 75 cm² flakonuose. Prieš hibridizaciją ląstelės persėjamos taip, kad hibridizacijos dieną būtų eksponentinėje augimo fazėje.

Hibridizacijos dieną iš paaukotos pelės steriliai išimama blužnis ir sutraiškoma 10 mL DMEM terpėje be serumo. Blužnies ląstelių suspensija centrifuguojama $200 \times g$ 7 min, ląstelės suspenduojamos 10 mL terpės be serumo. Mielomos ląstelės suspenduojamos ir centrifuguojamos $200 \times g$ 5 min. Nusėdusios mielomos ląstelės suspenduojamos 30 mL terpės be serumo. Toliau atliekamas ląstelių skaičiavimas, naudojant Burker ląstelių skaičiavimo kamerą. Blužnies ir mielomos ląstelės sumaišomos santykiu 5:1, centrifuguojamos $200 \times g$ 7 min ir suliejamos naudojant PEG-1500 suliejimo agentą. Suspensija skiedžiama su 50 mL terpės be serumo ir centrifuguojama $200 \times g$ 5 min. Ląstelės suspenduojamos hibridomų augimo terpėje su HAT reagentu ir išsėjamos į 96 šulinėlių plokšteles po 250 tūkst. ląstelių į šulinėlį.

2.2.1.3. Maitinamojo makrofagų sluoksnio paruošimas

Hibridomų auginimui naudotas maitinamasis pelės makrofagų sluoksnis. Makrofagai gamina hibridomų augimą skatinančius veiksnius ir fagocituoja žuvusias ląsteles bei jų nuolaužas [132]. Makrofagai renkami iš paaukotos pelės pilvo ertmės, praduriant pilvaplovę ir pilvo ertmę praplaunant su 10 mL DMEM terpės be serumo. Surinkta ląstelių suspensija centrifuguojama $200 \times g$ 5 min, ląstelės skaičiuojamos ir išsėjamos hibridomų augimo terpėje į ląstelių auginimui skirtus indus 1000–4000 ląst./cm² tankiu.

2.2.1.4. Pelės polikloninių antikūnų surinkimas

Iš paaukotų imunizuotų pelių krūtinės ląstos surenkamas kraujas, ląstą praplaunant su 2 mL PBS. Centrifuguojama $200 \times g$ 10 min, supernatantas sumaišomas su sočiu amonio sulfato tirpalu tūrio santykiu 1:1 ir inkubuojama 16 h 4 °C. Išsodinti polikloniniai antikūnai (PAk) centrifuguojami $10\,000 \times g$ 5 min, nuosėdos suspenduojamos PBS ir santykiu 1:1 sumaišomos su sočiu amonio sulfato tirpalu. Paruošti PAk saugomi 4 °C.

2.2.1.5. Hibridomų atranka ir klonavimas

Praėjus 7 dienoms nuo hibridizacijos, iš šulinėlių nusiurbiamą pusę hibridomų augimo terpės ir užpilama šviežia hibridomų augimo terpe su HT reagentu. Po 3 dienų augimo terpė iš šulinėlių, kuriuose auga hibridomų klonai, testuojama netiesioginės IFA metodu su antigenais. Kaip teigiama kontrolė naudojami hibridizacijos dieną surinkti imunizuotos pelės PAk. Augimo terpė iš šulinėlių, kuriuose klonai neužaugo, naudojama kaip neigiama kontrolė. Atrinkami teigiami klonai, kurių testuotos augimo terpės optinis tankis (OT) buvo didesnis už neigiamos kontrolės OT. Atrinkus teigiamus klonus, hibridomos stabilizuojamos, jas išklonuojant. Ląstelės klonuotos 96 šulinėlių plokštelėse su maitinamuoju makrofagų sluoksniu, atliekant serijinius skiedimus. Po 6–7 dienų atrinkami šulinėliai, turintys po vieną ląstelių kloną. Atrinktų šulinėlių augimo terpė testuojama netiesioginės IFA metodu su antigenu. Atrinkti iš vienos ląstelės kilę ir MAk sekretuojantys teigiami klonai kriokonservuojami.

2.2.1.6. Ląstelių kriokonservavimas ir atšildymas

Atrinktos ir stabilizuotos hibridomos, esančios eksponentinėje augimo fazėje buvo kriokonservuojamos. Šiuo tikslu, iš ląstelių augimo indų surinktos hibridomos centrifuguojamos $200 \times g$ 5 min ir skaičiuojamos. Toliau ląstelės suspenduojamos 1 mL kriokonservavimo terpės $1 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$ ląst./mL tankiu ir supilamos į kriomėgintuvėlį. Mėgintuvėliai patalpinami į šaldymui skirtas

dėžutes ir saugomi parą $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, vėliau ilgesniam saugojimui perkeliama į skystą azotą.

Atšildant ląsteles, jos atplaunamos nuo šaldymo terpės ir išsėjamos ant maitinamojo makrofagų sluoksnio.

2.2.2. MAK apibūdinimo ir baltymų tyrimų metodai

2.2.2.1. MAK gryninimas

MAK iš hibridomų augimo terpės gryninti afininės chromatografijos metodu, naudojant sefarozę su *S. aureus* rekombinantiniu baltymu A, sorbentą. Gryninimas atliktas naudojant *AKTA start* chromatografinę sistemą su 1 mL tūrio sorbentu užpildyta kolonėle *HiTrap Protein A HP* (Cytiva). Kolonėlė kalibruojama su 10 mL užnešimo buferinio tirpalo. Toliau užnešama per 0,2 μm filtrą filtruota hibridomų augimo terpė, santykiu 1:2 (gryninant IgG1 poklasio antikūnus) sumaišyta su užnešimo buferiniu tirpalu. Gryninant IgG2a, IgG2b poklasio antikūnus, augimo terpė skiedžiama su 1 M Tris-HCl (pH 8) tirpalu iki galutinės 0,1 M Tris koncentracijos. Po užnešimo kolonėlė plaunama su 10 mL užnešimo buferinio tirpalo. Toliau vykdoma MAK eliacija su 10 mL eliacijos buferinio tirpalo. Į atskirus mėgintuvėlius, po 500 μL į mėgintuvėlį, renkamos išgrynintų antikūnų frakcijos. Po eliacijos kolonėlė regeneruojama su 10 mL eliacijos buferinio tirpalo, tuomet su 10 mL užnešimo buferinio tirpalo ir plaunama su 10 mL distiliuoto vandens. Kolonėlė užpildoma 20 % (v/v) etanolio tirpalu ir saugoma $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Spektrofotometru, esant 280 nm bangos ilgiui, išmatuojama išgrynintų IgG klasės antikūnų koncentracija. Atliekama frakcijų, kuriose nustatyta didžiausia antikūnų koncentracija, dializė prieš PBS (1 mL antikūnų frakcijos dializei naudojamas 1 L PBS), dializę vykdant per naktį $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po dializės MAK filtruojami per 0,2 μm filtrą ir saugomi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2.2. MAK žymėjimas

Siekiant MAK apibūdinti ir taikyti įvairiuose IFA formatuose, MAK buvo žymėti HRP fermentu, taikant natrio perjodatinį metodą [133]. Išgryninti MAK (5 mg/mL) dializuojami prieš natrio karbonatinį tirpalą (pH 9,5). HRP tirpinama vandenyje iki 5 mg/mL koncentracijos, įnešama 250 μL natrio perjodato tirpalo, inkubuojama 20 min kambario temperatūroje (KT), maišant. Tirpalas dializuojamas prieš natrio acetatinį buferinį tirpalą. Po dializės su 1 M natrio karbonato tirpalu koreguojamas HRP tirpalo pH, kol pH pasiekia 9,5. Tuomet įnešami MAK, inkubuojama 2 h KT, maišant. Toliau įnešama natrio borhidrido tirpalo, inkubuojama 2 h $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Konjugatas per naktį dializuojamas prieš PBS. Po dializės į MAK tirpalą įnešama 2 % (w/v) BSA ir 50 % (v/v) glicerolio, saugoma $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Imunochromatografinio testo kūrimui MAk žymėti *BioReady 40 nm Carboxyl Gold* aukso nanodalelėmis (*nanoComposix*) pagal gamintojo rekomendacijas. Išgryninti MAk (50 µg, 1 mg/mL konc.) dializuojami prieš dializės tirpalą. Toliau visos inkubacijos atlitos KT, maišant. Į 1 mL nanodalelių suspensijos įnešama 20 µL EDC ir 40 µL sulfo-NHS tirpalų, inkubuojama 30 min. Centrifuguojama $3\,800 \times g$ 10 min. Nuosėdos suspenduojamos 1 mL reakcijos tirpalo, įnešami MAk ir inkubuojama 1 h. Po inkubacijos įnešama 10 µL hidroksilamino chlorido tirpalo, inkubuojama 10 min. Po inkubacijos susidarę kompleksai 2 kartus praplaunami su reakcijos buferiniu tirpalu. Nuosėdos suspenduojamos 1 mL saugojimo tirpalo ir paruošti aukso nanodalelių konjugatai (MAk-Au) saugomi 4 °C.

2.2.2.3. Netiesioginė imunofermentinė analizė (IFA)

Antigenas imobilizuojamas 96 šulinėlių polistireno plokštelėje, imobilizacijos tirpale su 3–5 µg/mL konc. išgryninto antigeno arba 10 µg/mL lizato baltymų, įnešant 50 µL/šul. Inkubuojama 16 h 4 °C. Toliau inkubacijos vykdomos 1 h KT, purtant (250 rpm), o plokštelė plaunama su PBST. Šulinėliai bokuojami su blokavimo tirpalu, įnešant 250 µL/šul. Po inkubacijos plokštelė 2 kartus praplaunama, pilami su PBST skiesti tiriamieji mėginiai (2.10 lentelė), 50 µL/šul. Plokštelė 4 kartus praplaunama. Antikūno ir antigeno sąveikos identifikavimui toliau pilami PBST skiesti antriniai antikūnai (2.10 lentelė), 50 µL/šul. Po inkubacijos plokštelė 6 kartus plaunama su PBST ir 2 kartus dejonizuotu vandeniu. Į šulinėlius išpilstoma po 50 µl HRP substrato *NeA-Blue Tetramethylbenzidine Substrate*, ryškinama 10–15 min tamsoje. Fermentinė reakcija stabdoma su 3,6 % (v/v) sieros rūgšties tirpalu, 25 µL/šul. OT matuojamas spektrofotometru *Multiskan GO* (*Thermo Fisher Scientific*), esant 450 nm ir palyginamajam 620 nm šviesos bangos ilgiams.

MAk tariamosios disociacijos konstantos (K_d) nustatytos netiesiogine IFA. K_d savo skaitine verte atitinka tokią antikūnų koncentraciją, kuriai esant antikūnai prisijungia prie pusės tirpale esančio antigeno, t.y. OT sumažėja pusiau. Nustatant K_d , rekombinantinės β -laktamazės (5 µg/mL) buvo imobilizuotos 96 šul. plokštelėje. Po blokavimo, MAk plokštelėje skiesti atliekant serijinius skiedimus nuo 2–10 µg/mL, po tris pakartojimus. K_d apskaičiuojama remiantis netiesioginės IFA rezultatais, braizant OT priklausomybės nuo antikūnų koncentracijos titravimo kreivę.

MAk klasė, poklasis ir lengvosios grandinės tipas nustatyti naudojant IFA metodu paremtą *Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

2.10 lentelė. Mėginių ir antrinių antikūnų darbinė koncentracija, naudota imunocheminiuose methoduose

Mėginys	Skiedimas (kartai)/koncentracija	
	IFA	IB
Pelės kraujas	200 x	–
Pelės PAK	200 x	–
Hibridomų augimo terpė	Neskiesta, 50 x	–
Išgryninti MAK	2–15 µg/mL	2–5 µg/mL
MAK 6C2 prieš His ₆ -žymę	10 µg/mL (konc. imobilizavimui)	2 µg/mL
Detektuojantys antikūnai	IFA	IB
HRP žymėti ožkos PAK prieš pelės IgG	5000 x	4000 x
<i>Goat anti-Mouse IgG (H+L)-HRP</i>		
MAK 7B6-HRP prieš ACT-14	500 x	–
MAK 5E2-HRP prieš NDM-1	150 x	80 x
MAK 16F6-HRP prieš PDC-195	1000 x	–
MAK 9D2-HRP prieš CMY-34	150 x	200 x
Antikūnai	Imunochromatografinis testas	
MAK-Au	10 x	
Imobilizuoti MAK	0,3–1 mg/mL	
Imobilizuoti ožkos PAK prieš pelės IgG		
<i>Goat anti-Mouse IgG (H+L)</i>	0,2 mg/mL	

MAK-HRP – krienų peroksidazės ir MAK konjugatas; MAK-Au – MAK ir aukso nanodalelių konjugatas

2.2.2.4. Tiesioginė IFA

Tiesioginė IFA naudota HRP konjuguotų MAK (MAK-HRP) tyrimams. Antigeno imobilizavimas, plokštelės blokavimas ir plovimas atliekami pagal 2.2.2.3 skyriuje nurodytą metodiką. Po blokavimo plokštelė praplaunama. Į šulinėlius pilami santykiu 1:100 skiesti MAK-HRP, 50–100 µL/šul. Ir atliekami serijiniai skiedimai. Inkubuojama 1 h KT, purtant. Tuomet plokštelė praplaunama ir ryškinama, kaip nurodyta 2.2.2.3 skyriuje.

2.2.2.5. Konkurencinė IFA

Konkrencinė IFA naudota dėl prisijungimo prie antigeno nekonkuruojančių MAK porų atrankai. Antigeno imobilizavimas, plokštelės blokavimas, plovimas, inkubacijos sąlygos ir ryškinimas atliekami kaip aprašyta 2.2.2.3 skyriuje. Po blokavimo į šulinėlius įnešama po 50 µL nežymėtų MAK 5–10 µg/mL konc. Po inkubacijos MAK iš plokštelės neišpurtomi, į šulinėlius įnešama po 50 µL MAK-HRP, kurių skiedimas parenkamas pagal tiesioginės IFA rezultatus. Toliau plokštelė plaunama ir ryškinama.

2.2.2.6. Dviepitopė IFA

Taikant dviepitopės IFA formatą, antigenas yra nustatomas su dviem skirtingas antigeno sritis atpažįstančiais MAK. IFA atlikimo žingsniai, tirpalai, praplovimas ir inkubacijos sąlygos atitinka 2.2.2.3 skyriuje aprašytą

metodiką. Plokštelėje imobilizuojami MAk (išgaudantys MAk) 2,5–10 µg/mL, 100 µL/šul. Kitą dieną plokštelė blokuojama ir atliekami serijiniai antigeno (nuo 1–0,01 µg/mL) ar bakterijų lizato, kurio baltymų koncentracija yra žinoma, skiedimai (nuo 5 µg/mL), 100 µL/šul. Po inkubacijos įnešami MAk-HRP (detektuojantys MAk), kurių skiedimas yra parenkamas pagal tiesioginės IFA rezultatus, 100 µL/šul. Toliau plokštelė plaunama, ryškinama, į šulinėlius įnešant po 100 µL substrato, ir stabdoma su 50 µL/šul. sieros rūgšties tirpalo.

Dviepitopės IFA metodai, skirti β-laktamazių nustatymui, ir jų atlikimo sąlygos yra pateikti rezultatų 3.1.10 skyriuje. Sukurtų sistemų jautrumas nustatytas pagal anksčiau apibūdintą metodiką [134].

2.2.2.7. MAk epitopų nustatymas IFA metodu

Dviepitopės IFA metodas naudotas MAk epitopų nustatymui, tiriant MAk sąveiką su *E. coli* susintetintais trumpintais β-laktamazių fragmentais. IFA atlikimo žingsniai yra tapatūs 2.2.2.3 ir 2.2.2.6 skyriuose aprašyti metodikai. 96 šulinėlių plokštelėje imobilizuoti MAk 6C2 prieš His₆-žymę (2.10 lentelė). Kitą dieną, po blokavimo ir plovimo, į šulinėlius užnešami *E. coli* lizatų mėginiai. Ruošiant lizatus, 1 mL kultūros centrifuguojama, ląstelės suspenduojamos 0,3 mL PBS su 1 % (v/w) SDS ir verdamos 100 °C 10 min. Išvirti lizatai 20 x skiedžiami su 2 % (w/v) BSA PBST tirpalu. Plokštelėje atliekami paruoštų mėginių serijiniai skiedimai. Po inkubacijos ir praplovimo pilami tiriamieji MAk-HRP, kurių skiedimas nustatytas tiesioginės IFA metodu. Vėliau plokštelė plaunama ir ryškinama.

MAk epitopų nustatymui ir patikslinimui buvo naudoti sintetiniai, N-gale biotinu žymėti peptidai. Atliekant IFA, plokštelėje imobilizuojamas *Pierce* avidinas (*Thermo Scientific*) (5 µg/mL, 50 µL/šul.). Kitą dieną, po plokštelės blokavimo, į šulinėlius įnešami su PBST skiesti sintetiniai peptidai (10 µg/mL, 100 µL/šul.). Po inkubacijos ir praplovimo žingsnio į šulinėlius įnešami tiriamieji MAk (5 µg/mL, 100 µL/šul.). Po inkubacijos įnešami ožkos PAK prieš pelės IgG, 100 µL/šul. (2.10 lentelė). Ryškinimas atliekamas pagal 2.2.2.3 metodiką.

2.2.2.8. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

Analizuojami baltymai frakcionuoti denatūruojančiomis sąlygomis poliakrilamidiniame gelyje (SDS-PAGE), sudarytame iš skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio dalių. Gelio kasetės statomos į elektroforezės buferiniu tirpalu užildytą elektroforezės aparatą (Biometra). Į gelio šulinėlį įnešama 0,5–1 µg išgrynintų ar 7–10 µg lizato baltymų. Mėginiai elektroforezei ruošiami su *Reducing Sample Buffer*, juos verdant 100 °C

10 min. Elektroforezė vykdoma 80 V įtampoje, baltymams numigravus į skiriamąjį gelį, tęsiama 140 V. Išfrakcionuoti baltymai gelyje dažomi su *Coomassie Brilliant Blue* dažu (*Thermo Fisher Scientific*), vėliau gelis blukinamas distiliuotu vandeniu.

2.2.2.9. Imunoblotingas (IB)

Elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis metodu išfrakcionuoti baltymai iš poliakrilamidinio gelio pernešami ant PVDF membranų. Gelis ir filtrinio popieriaus lakštai merkami į baltymų pernešimo buferinį tirpalą, membrana merkiama į etanolį, tuomet į baltymų pernešimo buferinį tirpalą. Atliekamas pusiau sausas baltymų pernešimas ant membranų. Ant katodinio baltymų pernešimo aparato pado (*Biometra*) dedamas išmirkytas filtrinio popieriaus lakštas, paeiliui dedama membrana, gelis ir ant viršaus kitas filtrinio popieriaus lakštas. Uždedamas anodinis pernešimo aparato padas. Baltymų pernešimas vykdomas 45 min, esant pagal gelio plotą nustatytam srovės stipriui (1 mA tenka 1 cm² gelio ploto). Membranų plovimui naudojamas PBST, mėginiai ir antriniai antikūnai skiedžiami 2 % pieno miltelių (w/v) PBST tirpalu, inkubacijos vykdomos po 1 h KT. Po pernešimo membrana praplaunama ir blokuojama su blokavimo buferiniu tirpalu. Vėliau membrana praplaunama ir užnešamas tiriamasis mėginys (2.10 lentelė). Po inkubacijos membrana praplaunama ir užnešami su HRP žymėti antriniai antikūnai (2.10 lentelė). Toliau membrana praplaunama ir ryškinama su ryškinimo tirpalu. Reakcija stabdoma membraną praplaunant distiliuotu vandeniu.

2.2.2.10. Imunoprecipitacija (IP)

IP metodu tirta MAK sąveika su rekombinantinėmis ir natūraliomis β-laktamazėmis. Visos inkubacijos atliktos KT, maišant. 125 μL *rProtein G Sepharose Fast Flow* sorbento (*Cytiva*) 4 kartus praplaunama su 0,1 M Tris-HCl (pH 8), po kiekvieno plovimo centrifuguojant 12 000 × g 30 s. Blokuojama su *Roti Block*[®] 1 h. Praplaunama su 0,1 M Tris-HCl (pH 8), įnešami 25 μg MAK ir inkubuojama 1 h. Susidarę kompleksai 4 kartus praplaunami PBST ir padalijami į 5 atskirus mėgintuvėlius. Įnešami tiriamieji mėginiai (40 μg lizato baltymų arba 5 μg rekombinantinio baltymo), inkubuojama 1,5 h. Tuomet 4 kartus praplaunama PBST ir susiformavę MAK-antigeno kompleksai eliuojami su 0,1 M glicino (pH 3) tirpalu. Eliucijos frakcijos analizuojamos SDS-PAGE ir IB metodais. Atliekant IB, detekcijai naudoti HRP žymėti MAK prieš β-laktamazės (2.10 lentelė).

2.2.2.11. Imunochromatografinis testas

Imunochromatografinio testo kostravimui naudotas rinkinys *Lateral Flow Material Starter Kit*, kurį sudaro testo komponentai: membranos, konjugato, mėginio bei šiukšlių padai bei lipnus pagrindo padas. Darbų metu atrinkti ir optimizuoti testo komponentai yra pateikti rezultatų 3.1.11 skyriuje.

Atliekant testo kostravimą, pirmiausia, atskirose zonose ant membranos imobilizuojami MAK prieš atitinkamas β -laktamazes (2.10 lentelė) (testavimo zona) ir ožkos PAK prieš pelės IgG (2.10 lentelė) (kontrolinė zona). Zoną sudaranti linija yra formuojama iš atskirų taškų į kuriuos automatizuotu prietaisu *sciFLEXARRAYER S3 (Scienion)*, sulašinama po 21,6 nL antikūnų mėginio. Zonų vizualizavimui, į MAK tirpalą papildomai įnešama su PBS santykiu 1:10 (v/v) skiesto nusiplaunančio žalio dažo. Kontrolinės zonos vizualizavimui naudojamas nusiplaunanti žydros spalvos dažas, kuris santykiu 1:20 yra skiedžiamas su PBS. Naudojant nenusiplaunantį mėlyną dažą, ant membranos papildomai suformuotos kontūro linijos. Po antikūnų imobilizavimo, membrana džiovinama 37 °C 1 h, tuomet sandariai laikoma su desikatoriumi per naktį KT. Paruošiamos testo komponentų juostos, kurių ilgis 30 cm, plotis: 1,5 cm (mėginio padas), 1 cm (konjugato padas), 1,8 cm (šiukšlių padas). Mėginio padas blokuojamas su blokavimo tirpalu 30 min, KT. Po blokavimo, padas plaunamas distiliuotu vandeniu ir merkiamas į konservavimo tirpalą, inkubuojant 30 min KT. Vėliau padas džiovinamas 37 °C 1 h. Konjugato padas 10 min mirkomas konservavimo tirpale KT. Ant pado užnešamas (25 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) su konservavimo tirpalu skiestas MAK-Au mišinys (2.10 lentelė). MAK žymėjimo nanodalelėmis protokolai nurodyti metodų 2.2.2.2 skyriuje. Inkubuojama 1 h KT, vėliau džiovinama 37 °C 4–5 h. Surenkama testo juosta: ant lipnaus pagrindo pado suklijuojami paruošti testo komponentai taip, kad jie paeiliui persidengtų 1 mm. Suklijuota juosta sukarpomą į 3 mm pločio juosteles, paruoštos testo juostelės toliau saugomos sandariai su desikatoriumi ir yra paruoštos testavimui.

Atliekant testavimą, bakterijų izoliatai kultivuojami ant agarizuotos LB su antibiotiku (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ceftazidimo arba meropenemo) 30 °C 20–24 h. Bakterijų kolonija suspenduojama 150 μL mėginio užnešimo tirpalo, gerai sumaišoma. 100 μL mėginio užnešama ant testo mėginio pado, rezultatai vizualiai vertinami po 15–20 min.

2.2.2.12. Dviejų fotonų sužadavimo (TPX) technologija

MAK prieš β -laktamazes testuoti dviejų fotonų sužadavimo technologija (TPX) ir diagnostiniu prietaisu (*ArcDia International Ltd*, Suomija), kurie yra taikomi komerciniame *mariPOC[®]* teste (*ArcDia International Ltd*) [117], [135]. MAK aktyviai ir pasyviai žymėti polistireno mikrorutuliuokais bei

konjuguoti su fluorescencine žyme *ArcDia*TM *BF530*, remiantis anksčiau aprašyta metodika [136]. Testavimui naudotos šio darbo metu susintetintos rACT-14, rNDM-1, rPDC-195 ir rCMY-34 β-laktamazės ir bakterijų izoliatai, kurių apibūdinimas pateiktas 2.1.12 skyriaus 2.9 lentelėje. Rekombinantiniai baltymai ir bakterijos, atliekant jų serijinius skiedimus, skiesti su reakcijos buferiniu tirpalu *R-B01* (*ArcDia International Ltd*). Izoliatų testavimui bakterijos kultivuotos ant kraujo agarų 30 °C 24 h. Bakterijų kolonija suspenduota imunochromatografiniame teste (2.2.2.11 skyrius) naudotame mėginių užnešimo tirpale, gauta suspensija papildomai skiesta su *R-B01*. Paruošti rekombinantinių baltymų ir bakterijų mėginiai sumaišyti su testo reagentų mišiniu ir analizuoti diagnostiniu prietaisu.

2.2.3. Genų inžinerijos ir molekulinės biologijos metodai

2.2.3.1. Kompetentinių *E. coli* bakterijų paruošimas ir transformacija

Į 5 mL sterilios LB užsėjama atitinkamo kamieno *E. coli* bakterijų kolonija. Auginama 37 °C purtant (220 rpm) iki 16 h. Kitą dieną, naktinė kultūra santykiu 1:100 (v/v) inokuliuojama į 5 mL LB ir auginama apie 2–3 h 37 °C purtant, kol pasiekiami eksponentinė bakterijų augimo fazė. Ląstelės centrifuguojamos 3 000 × g 5 min 4 °C, tuomet suspenduojamos 5 mL atšaldyto transformacijos NaCl tirpalo, suspensija centrifuguojama. Nusėdusios ląstelės suspenduojamos 3 mL šalto transformacijos CaCl₂ tirpalo, inkubuojama 30 min lede. Nucentrifuguotos ląstelės suspenduojamos 300 μL CaCl₂ tirpalo. Kompetentinės ląstelės saugomos 4 °C ir yra tinkamos transformacijai apie 24 h.

Atliekant transformaciją, į sterilų atšaldytą mėgintuvėlį pilama 50 μL kompetentinių ląstelių ir 5 μL ligato (ligato paruošimo protokolas pateiktas 2.2.3.2 skyriuje) ar apie 100 ng plazmidinės DNR. Inkubuojama 30 min lede, vėliau atliekamas temperatūrinis šokas, mėgintuvėlį inkubuojant 1,5 min 42 °C, po to atšaldant lede. Toliau įpilama 1 mL LB ir inkubuojama 1 h 37 °C. Ląstelės centrifuguojamos 3 000 × g 5 min, suspenduojamos 200 μL LB ir išsėjamos ant agarizuotos LB su atitinkamu antibiotiku (ampicilinu 100 μg/mL ar kanamicinu 30 μg/mL). Inkubuojama per naktį 37 °C. Kitą dieną transformantų kolonijos testuojamos kolonijų PGR (2.2.3.11 skyrius) ar naudojamos plazmidinės DNR grynimui (2.2.3.13 skyrius).

2.2.3.2. DNR hidrolizė restrikcijos endonukleazėmis

pET28a(+) vektorius ir PGR produktai su RE hidrolizės sritimis hidrolizuoti su *FastDigest* BamHI ir XhoI RE pagal gamintojo rekomendacijas. Į vektoriaus hidrolizės reakcijos mišinį papildmai įnešta

temperatūrai jautrios šarminės fosfatazės *FastAP* (1 U/ μ L), remiantis gamintojo rekomendacijomis. Po hidrolizės vektorius ir PGR produktai iš reakcijos mišinio gryninti pagal 2.2.3.13 skyriaus metodiką.

2.2.3.3. Klonavimas

Konstruojant rekombinanines β -laktamazes ar persidengiančius β -laktamazių fragmentus, RE hidrolizuoti DNR fragmentai klonuoti į pET28a(+) vektorių, naudojant *Rapid DNA Ligation Kit* pagal gamintojo pateiktas rekomendacijas.

MAK variabiliąsias sritis koduojančių sekų nustatymui, išgryninti PGR produktai tiesiogiai klonuoti į pJET1.2/blunt vektorių su *CloneJET PCR Cloning Kit*, remiantis gamintojo rekomendacijomis.

Chimerinio gp39m_J_DHA baltymo konstravimą atliko dr. Aliona Avižinienė ir dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė (VU GMC BTI EGIS). Konstravimo metodika aprašyta Bielskė et al., 2025 publikacijoje [137].

2.2.3.4. Rekombinantinių baltymų sintezė

Rekombinantinių β -laktamazių sintezei naudoti *E. coli* Tuner (DE3) kamieno, transformuoto pET28a(+) su įterptu β -laktamazę koduojančiu genu, producentai. Naktinė kultūra santykiu 1:100 (v/v) inokuliuojama į LB (naudotos 1 L tūrio kolbos su 200 mL LB) su kanamicinu (30 μ g/mL). Auginama 37 °C, purtant (220 rpm), kol ląstelių kultūros OT ties 600 nm bangos ilgiu pasiekia 0,6. Tuomet atliekama baltymų sintezės indukcija su 0,2 mM IPTG 25 °C 4 h. Kultūra centrifuguojama 3 000 $\times$ g 15 min 4 °C, nusėdusios ląstelės praplaunamos su biomasės praplovimo buferiniu tirpalu ir suspenduojamos baltymų gryninimui skirtame užnešimo buferiniame tirpale su 1 mM PMSF. Iki baltymų gryninimo biomasė saugoma –70 °C.

Chimerinio gp39m_J_DHA baltymo sintezę ir gryninimą atliko dr. Aliona Avižinienė ir dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė (VU GMC BTI EGIS), kurie aprašyti [137] ir [138].

2.2.3.5. Rekombinantinių baltymų gryninimas nikelio chelatinės chromatografijos metodu

Užšaldyta bakterijų biomasė atitirpinama lede, įnešama užnešimo buferinio tirpalo su 1 mM PMSF. Ląstelės mechaniškai ardamos ultragarsiniu dezintegratoriumi, esant 50 % amplitudei, 3 kartus po 5 min, režimu: 15 s ardymas, 15 s pauzė. Po ardymo suspensija centrifuguojama 15 000 $\times$ g 20 min 4 °C. Supernatantas filtruojamas per 0,2 μ m filtrą, skiedžiamas su užnešimo buferiniu tirpalu ir toliau naudojamas rekombinantinių β -laktamazių gryninimui. Baltymai gryninti naudojant *ÄKTA start* chromatografinę sistemą ir 1 mL tūrio kolonėlę *HisTrap HP* (Cytiva).

Atliekant gryninimą, kolonėlė plaunama su 5 mL dejonizuoto vandens, po to kalibruojama su 5 mL užnešimo buferinio tirpalo. Toliau užnešamas supernatantas, po užnešimo kolonėlė plaunama su 5 mL plovimo buferinio tirpalo. Vykdoma gradientinė eliacija (eliacijos tūris 10 mL), palaipsniui keičiant imidazolo koncentraciją nuo 80–100 iki 500 mM. Išgrynintų baltymų frakcijos analizuojamos SDS-PAGE ir apjungiamos tolesniam baltymų gryninimui jonų mainų chromatografijos metodu (2.2.3.6 skyrius).

2.2.3.6. Rekombinantinių baltymų gryninimas jonų mainų chromatografijos metodu

Nikelio chelatinės chromatografijos metodu išgryninti baltymai (2.2.3.5 skyrius) toliau gryninti jonų mainų chromatografijos metodu. Pirmiausia, pagal gamintojo rekomendacijas, su *PD-10* kolonėle (*Cytiva*) pakeičiamas apjungtų baltymų frakcijų buferinis tirpalas į gryninimui naudojamą užnešimo buferinį tirpalą. Baltymai gryninti su *AKTA start* sistema. Rekombinantinių ACT-14, PDC-195 ir CMY-34 baltymų gryninimui naudota 1 mL *HiTrap SP HP*, o NDM-1 – *HiTrap Q HP* kolonėlė (*Cytiva*), su atitinkamam kolonėlės tipui reikalingais gryninimo tirpalais. Pirmiausia, kolonėlė plaunama su 5 mL užnešimo buferinio tirpalo, po to su 5 mL eliacijos ir 10 mL užnešimo buferiniais tirpalais. Užnešama baltymų frakcija, po užnešimo kolonėlė plaunama su 5 mL užnešimo buferinio tirpalo. Toliau su eliacijos buferiniu tirpalu vykdoma gradientinė eliacija, palaipsniui iki 1 M NaCl keičiant tirpalo joninę jėgą. Išgrynintų baltymų frakcijos analizuojamos SDS-PAGE, frakcijos apjungiamos ir dializuojamos prieš baltymų saugojimo buferinį tirpalą per naktį 4 °C. Po dializės išgryninti baltymai analizuojami SDS-PAGE, su *Pierce Bradford Protein Assay Kit*, remiantis gamintojo rekomendacijomis, išmatuojama baltymų koncentracija. Baltymai išfasuojami ir saugomi –70 °C.

2.2.3.7. Persidengiančių baltymų fragmentų sintezė

Persidengiančių baltymų fragmentų sintezei naudoti *E. coli* Tuner (DE3) kamieno, transformuoto pET28a(+) su įterpta atitinkamą fragmentą koduojančia seka, producentai. Naktinė kultūra santykiu 1:100 (v/v) inokuliuojama į LB (naudotos 100 mL tūrio kolbos su 30 mL LB) su kanamicinu (30 µg/mL). Auginama 37 °C, purtant (220 rpm), kol ląstelių kultūros OT ties 600 nm pasiekia 0,6–0,8. Įnešama 0,2–1 mM IPTG, auginama 37 °C 2,5 h. Kultūra centrifuguojama 3 000 × g 5 min. Nuosėdos saugomos –20 °C ir toliau analizuojamos SDS-PAGE bei IFA metodais.

2.2.3.8. RNR gryninimas

Suminė RNR iš hibridomos ląstelių gryninta su *GeneJET RNA Purification Kit* pagal gamintojo rekomendacijas. Iš ląstelių kultūrų augimo indų surinktos

ląstelės praplaunamos PBS ir skaičiuojamos. Suminė RNR skiriama iš $3 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$ ląstelių. Į išskirtą RNR įnešama 1 U/ μ L ribonukleazų slopiklio *RiboLock* (*Thermo Fisher Scientific*), mėginiai saugomi -70°C ir toliau naudojami kopijinės DNR sintezei (2.2.3.10 skyrius).

2.2.3.9. RNR elektroforezė

Iš hibridomos ląstelių išgryninta suminė RNR frakcionuota 1 % agaroziniame gelyje. Pirmiausia, gelio ruošimo indai ir įrankiai mirkomi 0,5 M NaOH tirpale 10 min, vėliau praplaunami dejonizuotu vandeniu. Agarozės milteliai išmaišomi šviežiai pagamintame TAE buferiniame tirpale, išlydomi kaitinant ir, tirpalui pravėsus, įnešama 0,1–0,2 $\mu\text{g/mL}$ etidžio bromido. Išlydyta agarozė išliejama į rėmelį, dedamos šulinėlius formuojančios šukos. Ruošiant mėginius, 400–800 ng RNR sumaišoma su *RNA Loading Dye* ir kaitinama 70°C 10 min, po to 3 min šaldoma lede. Tuomet mėginiai įnešami į gelyje suformuotus šulinėlius, įnešamas RNR fragmentų ilgio standartas *RiboRuler High Range RNA Ladder*. Elektroforezė vykdoma 1,5–2 h, esant 10 V/cm įtampai. Gelis analizuojams transiliuminatorimi *MiniBis Pro* (*DNR Bio-Imaging Systems*).

2.2.3.10. Kopijinės DNR sintezė

MAK VH ir VL sekų nustatymui, kaip matricą naudojant iš hibridomų išskirtą suminę RNR, susintetinta viengrandė kDNR su *RevertAid RT Kit*. Sintzei papildomai naudota priemaišinė dvigrandė DNR hidrolizuojanti DNazė *dsDNase*. Procedūros atliktos pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.3.11. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)

PGR metodas naudotas: tikrinant *E. coli* transformantų kolonijas (kolonijų PGR), konstruojant rekombinantines β -laktamazes ir persidengiančius trumpintus baltymų fragmentus epitopų nustatymui. Šis metodas naudotas MAK variabiliąsias sritis koduojančių sekų pagausinimui ir jų vertinimui po fragmentų klonavimo.

Patogeniškų bakterijų izoliatuose β -laktamazes koduojantys genai PGR metodu vertinti naudojant anksčiau literatūroje aprašytus pradmenis ir PGR sąlygas, kaip nurodyta 2.1.8 skyriuje.

Atliekant PGR, kaip matrica, reakcijoje naudojamas 1 ng vektoriaus su įklonuotu genu, mikrobiologine kilpele įnešta transformantų kolonija ar 1 μL kDNR. PGR reakcijos komponentai ir temperatūriniai režimai pateikti 2.11 lentelėje, pradmenys pateikti 2.1.8 skyriuje. Pagausinimas vykdytas *Applied Biosystems SimpliAmp* (*Thermo Fisher Scientific*) prietaisu.

2.11 lentelė. PGR mišinio komponentai ir temperatūriniai režimai, kai reakcijos tūris 25 μL

Kolonijų PGR		DNR pagausinimas klonavimui	
Komponentai	Koncentracija/tūris reakcijoje	Komponentai	Koncentracija/tūris reakcijoje
<i>Dream Taq</i>		<i>Phusion Flash</i>	
<i>Green PCR</i>	1 x	<i>High-Fidelity PCR</i>	1 x
<i>Master Mix</i>		<i>Master Mix</i>	
Tiesioginis pradmuo, 10 μM	0,2 μM	Tiesioginis pradmuo, 10 μM	0,4 μM
Atvirkštinis pradmuo, 10 μM	0,2 μM	Atvirkštinis pradmuo, 10 μM	0,4 μM
H ₂ O be nukleazių	Iki galutinio tūrio	H ₂ O be nukleazių	Iki galutinio tūrio
Temperatūrinis režimas			
95 °C – 5 min		98 °C – 30 s	
95 °C – 30 s	} 30 ciklų	98 °C – 5 s	} 35 ciklai
60 °C – 30 s		45 °C – 10 s	
72 °C – 30–80 s		72 °C – 10 s	
72 °C – 5 min		72 °C – 1 min	

2.2.3.12. DNR elektroforezė

PGR produktai frakcionuoti 1,2–2 % agaroziniame gelyje, į kurį papildomai įnešta *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* DNR dažo. Gelio ruošimo procedūra aprašyta metodų 2.2.3.6 skyriuje. Į gelyje suformuotus šulinėlius įnešama po 5–10 μL PGR reakcijos mišinio. Jei PGR reakcijos mišinio sudėtyje dažo nėra, mėginiai papildomai maišomi su *TriTrack DNA Loading Dye*, į šulinėlį įnešama DNR fragmentų ilgio standarto: *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* arba *GeneRuler 50 bp DNA Ladder*. Elektroforezė vykdoma 40–50 min, esant 10 V/cm įtampai, gelis analizuojamas transiliumatorimi *MiniBis Pro*.

2.2.3.13. DNR išskyrimas

Plazmidinė DNR iš *E. coli* bakterijų skirta su *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* rinkiniu pagal gamintojo rekomendacijas. Išgryninta plazmidinė DNR naudota *E. coli* transformacijai, hidrolizei RE ar sekoskaitai.

PGR produktai iš PGR mišinio gryninti su *GeneJET PCR Purification Kit*. Išgryninti DNR fragmentai naudoti RE hidrolizei ar klonavimui.

RE hidrolizuoti vektoriai ir PGR produktai iš reakcijos mišinio gryninti su *GeneJET Gel Extraction Kit* pagal gamintojo rekomendacijas.

Bakterijų izoliatų DNR ruošta suspenduojant bakterijų koloniją 100 μL dejonizuoto vandens ir verdant 95 °C 10 min. Toliau centrifuguojama 10 000 $\times$ g 5 min, supernatantas saugomas –20 °C.

2.2.3.14. Bakterijų lizatų paruošimas

Bakterijų izoliatų lizatai naudoti MAK apibūdinimo ir taikymo darbuose. Bakterijų izoliatai kultivuojami skystoje LB su antibiotiku (16 µg/mL ceftazidimo arba meropenemo) 20–24 h 30 °C. Centrifuguojama $3\,000 \times g$ 5 min, ląstelės suspenduojamos PBS ir ardamos ultragarsiniu dezintegratoriumi, esant 50 % amplitudei, režimu: 5 s ardymas, 3 s pauzė. Centrifuguojama $15\,000 \times g$ 20 min 4 °C, Bradfordo metodu matuojama supernatante esančių baltymų koncentracija, kaip aprašyta 2.2.3.6 skyriuje. Lizatai išfasuojami ir saugomi –70 °C.

2.2.3.15. β-laktamazių fermentinio aktyvumo nustatymas *BL Cefinase* testu

Fermentinis β-laktamazių aktyvumas tikrintas *BL Cefinase* testu (*BD Bioscience*). Šiame teste naudojami chromogeniniu β-laktamazių substratu – nitrocefina – impregnuoti popieriniai diskai. β-laktamazei hidrolizuojant nitrocefina, junginys keičia spalvą iš geltonos į raudoną. Atliekant testavimą, popieriniai diskai pincetu patalpinami ant sterilios Petri lėkštelės. 2,5 µg rekombinantinės β-laktamazės ar 5 µg bakterijų lizato baltymų skiedžiami su PBS iki galutinio 20 µL tūrio. Ant popierinių diskų užnešami paruošti mėginiai, inkubuojama 1 h RT. Rezultatai vertinami vizualiai.

Fermentinio aktyvumo slopinimo su MAK tikrinimui 1–10 µg MAK sumaišoma su 1 µg rekombinantinės β-laktamazės ar 5 µg bakterijų lizato baltymų, juos skiedžiant PBS iki galutinio 20 µL tūrio. Inkubuojama 1 h RT, purtant (250 rpm). Mėginiai užnešami ant popierinių diskų, rezultatai vizualiai vertinami po 1 h.

2.2.3.16. Transmisijos elektroninė mikroskopija

Transmisijos elektroninė mikroskopija atlikta pagal anksčiau aprašytą metodiką [3].

2.2.3.17. Spektrinė elipsometrija

Spektrinės elipsometrijos analizė atlikta su M-2000X J.A. Woollam (*Lincoln*) elipsometru su besisukančiu kompensatoriumi, BK7 70° stiklo prizme ir auksu padengtu paviršiaus plazmonų rezonanso (angl., *surface plasmon resonance*, SPR) sensoriaus disku. Matavimai atlikti naudojant 70° kritimo kampą spektrinių bangų ilgių diapazone nuo 200 iki 1000 nm. MAK ir antigeno sąveika vertinta realiu laiku matuojant elipsometrinis parametrus Ψ ir Δ , kuriais remiantis, apskaičiuotos baltymų sąveikos kinetinės konstantos. Matavimų rezultatai apdoroti su *Complete EASE* programine įranga (*J. A. Woollam Company*).

Susiformavusių MAK-antigeno kompleksų kinetiniai parametrai tirti spektrine elipsometrija pagal anksčiau aprašytą protokolą [139]. Pirmiausiai, ant SPR sensoriaus disko suformuotas 11-merkaptoundekano rūgšties (11-MUA) monosluoksnis. Šis sluoksnis aktyvuotas NHS ir EDC junginiais. Toliau, į matavimo kamerą įnešta 20 μ M baltymo G, inkubuota 30 min, KT. Susiformavus baltymo G monosluoksniui, likusios laisvos karboksi- grupės sensoriaus paviršiuje užblokuotos su 1 M etanolamino (pH 8). Kitame etape, į matavimo kamerą įnešta 200 nM su PBS skiestų MAK. Po 50–60 min inkubacijos sistemai pasiekus pusiausvyros būseną, kamera praplauta su PBS. Toliau, ant sensoriaus užnešta 300 nM (14 μ g/mL) su PBS skiesto rCMY-34, inkubuojama 1 h, KT. Siekiant baltymo G monosluoksnį panaudoti skirtingų MAK klonų testavimui, paruošto paviršiaus regeneravimui naudotas 2 M glicino tirpalas. Atliekant regeneraciją, matavimo kamera užpildyta glicino tirpalu, po 3 min inkubacijos, kamera praplauta PBS ir naudota kitų MAK testavimui.

2.2.4. Antikūnų ir baltymų sąveikos modeliavimas

Sąveika tarp MAK kaičiųjų domenų ir CMY-34 β -laktamazės ar AmpC β -laktamazių peptidų modeliuota pagal *AlphaFold2* ir *AlphaFold3* [140], [141] paremtą *Afsample* metodiką [142]. *Afsample* sugeneruoti *AlphaFold* modeliai, turintys didesnę nei 0,8 patikimumo įvertį, apdoroti *OpenMM* įrankiu [143]. Atrinkti patikimiausi modeliai vertinti, taikant *VoroIF-jury* procedūrą [144]. MAK sąveikos su antigenu sritys analizuotos su *VoroContacts* įrankiu [145]. Detali metodika aprašyta [137].

2.2.5. Duomenų bazės ir programiniai įrankiai

β -laktamazės koduojantys genai, ar. sekos ir informacija apie β -laktamazių šeimas rinkta naudojantis *Beta-Lactamase DataBase* (BLDB) duomenų baze [2] (<http://www.bldb.eu/>).

Sekų sugretinimas atliktas *Clustal Omega* įrankiu [146] (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>), sekų analizė atlikta su *Jalview* įrankiu [147].

Klonavimo bei pradmenų kūrimo darbuose naudota *SnapGene Viewer* (7.0.3) programa, pradmenys analizuoti su *Multiple Primer Analyzer* (Thermo Fisher Scientific) įrankiu (<https://www.thermofisher.com/lt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>).

Baltymų molekulinė masė, izoelektrinis taškas ir kitos savybės vertintos su *ExPaSy* įrankiu [148] (<https://www.expasy.org/>).

Baltymų erdvinės struktūros vizualizuotos su *RasMol* (2.7.5) programa.

MAk variabiliosios sekos analizuotos su *IgBlast* ir *IMGT/V-QUEST* įrankiais [149], [150], [151] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>, <https://www.imgt.org/IMGTindex/V-QUEST.php>). Vizualizacijos sudarytos su *IMGT/Collier-de-Perles* įrankiu [152], [153] (<https://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/Collier-de-Perles.cgi>).

Duomenys apdoroti ir vizualizuoti *OriginPro* (9.1) ir *GraphPad Prism* (10.1.2) programomis.

3. REZULTATAI

3.1. MAK prieš β -laktamazės kūrimas, apibūdinimas ir taikymas diagnostinių sistemų kūrimui

Šiame darbe siekta sukurti β -laktamazės specifiskus monokloninius antikūnus (MAK), juos išsamiai apibūdinti ir išbandyti įvairiose imunocheminių analitinių metodų sistemose. Remiantis pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) sudarytu prioritetinių patogenų sąrašu ir jiems būdingu atsparumo antibiotikams profiliu, šiame darbe, kaip diagnostiniai taikiniai, buvo pasirinktos AmpC priklausančios ACT-14, PDC-195 ir CMY-34 β -laktamazės bei viena plačiausiai identifikuojamų metalo β -laktamazių – NDM-1. Šios β -laktamazės buvo sukonstruotos ir susintetintos *Escherichia coli* bakterijose, o išgryninti baltymai, kaip imunogenai, naudoti β -laktamazės specifiskų MAK kūrimui, taikant hibridomų technologiją. Sukurti MAK buvo detalai apibūdinti įvairiais imunocheminiais metodais, naudojant rekombinantinių β -laktamazių kolekciją ir β -laktamazės produkuojančių bakterijų izoliatus. Taikant genų inžinerijos ir bioinformatinius metodus, identifikuotos MAK atpažinimo sritys (epitopai) antigenų molekulėse, kuriomis remiantis atlikta β -laktamazių sekų analizė bei įvertintas galimas MAK kryžminis reaktyvumas. Atsižvelgiant į MAK apibūdinimo rezultatus, atrinktos didžiausiu giminingumu β -laktamazės pasižyminčių ir tarpusavyje dėl sąveikos su antigenu nekonkuruojančių MAK poros. Atrinktos MAK poros išbandytos kuriant skirtingus analitinius metodus – kiekybinę dviepitopę imunofermentinę analizę (IFA), greitąjį imunochromatografinį testą bei dviejų fotonų sužadinimo technologiją (TPX) premą diagnostinę sistemą (*ArcDia Oy Ltd*, Suomija). MAK reaktyvumas šiais metodais testuotas su rekombinantinėmis β -laktamazėmis ir β -laktamazės produkuojančiais bakterijų izoliatais. Remiantis gautais rezultatais, įvertintas sukurtų MAK diagnostinis potencialas.

3.1.1. Rekombinantinių β -laktamazių sintezė ir gryninimas

MAK kūrimo darbams pirmiausia buvo sukonstruotos raiškos plazmidės ir *E. coli* bakterijose susintetintos rekombinantinės ACT-14 (rACT-14), NDM-1 (rNDM-1), PDC-195 (rPDC-195) ir CMY-34 (rCMY-34) β -laktamazės. Šiuo tikslu sintetiniai β -laktamazės koduojantys genai ties BamHI ir XhoI restrikcijos endonukleazių hidrolizės sritimis klonuoti į baltymų sintezei skirtą vektorių pET28a(+), baltymus C-gale suliejant su His₆ seka. Susintetintų rekombinantinių β -laktamazių charakteristikos pateiktos 3.1 lentelėje.

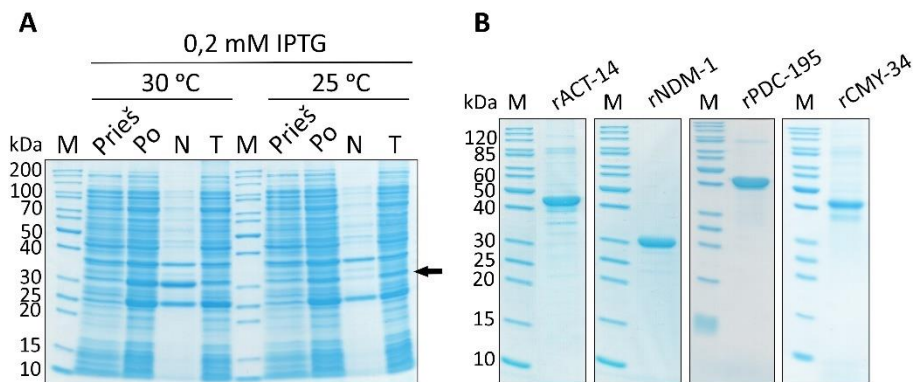
Po klonavimo konstruktai patikrinti sekoskaitos metodu. Toliau, atrinktos optimalios baltymų sintezės sąlygos, išbandant skirtingus rekombinantinių baltymų sintezei skirtus *E. coli* Tuner (DE3), BL21 (DE3) kamienus, skirtingą sintezės indukcijos temperatūrą (25–37 °C) ir induktoriaus IPTG koncentraciją (1–0,2 mM) augimo terpėje. Pritaikius skirtingas baltymų sintezės sąlygas, buvo vertintas tikslinių rekombinantinių baltymų tirpumas.

Šiuo tikslu po baltymų sintezės indukcijos bakterijų biomasė suardyta ultragarsiniu dezintegratoriumi ir suardytų ląstelių tirpi bei netirpi frakcijos analizuotos baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis metodu (SDS-PAGE). rNDM-1 sintezės indukcijos sąlygų tikrinimo pavyzdys pateiktas 3.1 A paveiksle.

3.1 lentelė. Rekombinantinių β -laktamazių apibūdinimas

Pavadinimas	Molekulinė masė, kDa	pI	GenBank nr.
rACT-14	44,8	9,1	AFU25647.1
rNDM-1	32	6,5	AHM26723.1
rPDC-195	46,9	9	AHH52937.1
rCMY-34	45,4	9,2	ABN51006.1

Rekombinantinių β -laktamazių sintezei atrinktos sąlygos, kurioms esant SDS-PAGE gelyje tikslių baltymų juosta stebima tirpiojoje frakcijoje, o netirpaus baltymo netirpiojoje frakcijoje sumažėja, tarpusavyje lyginant skirtingų sintezės indukcijos sąlygų rezultatus. Atsižvelgiant į rezultatus, šiame darbe rekombinantinių β -laktamazių sintezei pasirinkta naudoti *E. coli* Tuner (DE3) kamieną, baltymų sintezę indukuojant 0,2 mM IPTG 4 h 25 °C.



3.1 pav. Rekombinantinių β -laktamazių sintezės ir gryninimo rezultatų vertinimas SDS-PAGE. **(A)** rNDM-1 sintezės indukcijos *E. coli* Tuner (DE3) kamienė sąlygų vertinimas. Sintezės indukcija atlikta su 0,2 mM IPTG 30 °C 3 h ir 25 °C 4 h. Juoda rodyklė nurodo rNDM-1 baltymo juostos poziciją gelyje. N – netirpioji baltymų frakcija; T – tirpus supernatantas. **(B)** Išgrynintos rekombinantinės β -laktamazės. M – baltymų molekulinės masės standartas.

Toliau atliktas *E. coli* susintetintų rekombinantinių β -laktamazių gryninimas. Kadangi buvo sukonstruoti ir susintetinti su His₆ seka sulieti rekombinantiniai baltymai, pirmajame etape atliktas šių baltymų gryninimas nikelio chelatinės chromatografijos metodu, naudojant *AKTA start* chromatografinę sistemą. Išgrynintų baltymų frakcijos įvertintos SDS-PAGE metodu, ir tos frakcijos, kuriose buvo nustatyta mažiausiai priemaišinių baltymų, apjungtos. Toliau, išgryninti baltymai papildomai gryninti jonų mainų chromatografijos metodu. Rekombinantinių β -laktamazių grynumas po

dvių gryninimo etapų analizuotas SDS-PAGE metodu (3.1 pav. B). Remiantis gautais rezultatais, nustatyta, jog visų išgrynintų rekombinantinių β -laktamazių grynumas yra pakankamas imunizacijoms ir kitiems MAK kūrimo darbams.

Kadangi β -laktamazės yra β -laktamo žiedą molekulėje turinčius junginius hidrolizuojantys fermentai, šiame darbe *BL Cefinase* testu patikrintas išgrynintų rekombinantinių β -laktamazių fermentinis aktyvumas (3.2 pav.). Šį testą sudaro chromogeniniu β -laktamazių substratu – nitrocefenu – impregnuoti popieriniai diskai. Ant disko užnešus tiriamąjį β -laktamazę ar antibiotikams atsparių bakterijų, sintetinančių β -laktamazę, mėginį, nitrocefenas yra hidrolizuojamas, todėl disko spalva iš geltonos virsta raudona.

Šiuo testu patikrinus išgrynintus baltymus, nustatyta, jog visoms rekombinantinėms β -laktamazėms yra būdingas fermentinis aktyvumas – testuojant baltymus, popieriniai diskai nusidažė raudona spalva, lyginant su neigiama kontrole, kuomet testuotas β -laktamazių nesintetinačio *E. coli* BL21 kamieno lizatas (3.2 pav.).



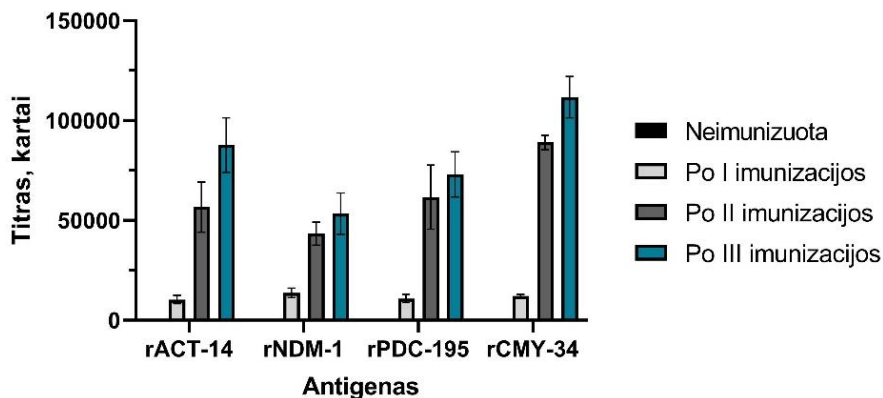
3.2 pav. Rekombinantinių β -laktamazių fermentinio aktyvumo tyrimo *BL Cefinase* testu rezultatai. Neigiamai kontrolei naudoti β -laktamazių skiedimo buferinis tirpalas (PBS) ir *E. coli* BL21 kamieno lizatas. Raudona spalva nurodo nitrocefino hidrolizę (teigiamas rezultatas), geltona – hidrolizė nevyksta (neigiamas rezultatas).

Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog rekombinantinių baltymų erdvinė struktūra atitinka natyvioms β -laktamazėms būdingą struktūrą, todėl šie baltymai yra tinkami MAK prieš β -laktamazę kūrimui.

3.1.2. MAK prieš β -laktamazę kūrimas

Siekiant sukurti β -laktamazėms specifiskus MAK, rACT-14, rNDM-1, rPDC-195 ir rCMY-34 baltymais 3 kartus imunizuota po 3 BALB/c linijos pelės. Svarbu paminėti, jog MAK kūrimui turi būti naudojami stiprų imuninį atsaką sukeliantys baltymai. Todėl, atliekant imunizaciją, buvo įvertintas rekombinantinių β -laktamazių imunogeniškumas. Šiuo tikslu po kiekvienos imunizacijos buvo rinkti pelių kraujo mėginiai, kurie vėliau ištirti netiesioginės IFA metodu, 96 šulinėlių plokštelės paviršiuje imobilizuojant rekombinantines β -laktamazes. Šiuo būdu siekta įvertinti pelėse susidariusių antigenų specifinių IgG klasės antikūnų titrą (antikūnų skiedimas, kuriam esant išmatuota didžiausia optinio tankio (OT) vertė sumažėja perpus). Nustatyti antikūnų titrai pelių kraujo mėginiuose pateikti 3.3 paveiksle.

Nustatyta, jog imunizacijai naudotos β -laktamazės sukėlė imuninį atsaką pelėms, kadangi pelių kraujo mėginiuose nustatytų antigenams specifiskų IgG antikūnų titras didėjo po kiekvienos imunizacijos (3.3 pav.). Po trečiosios imunizacijos rACT-14 specifiskų IgG titras siekė 1:77000, rNDM-1 – 1:53300, rPDC-195 – 1:73000 ir rCMY-34 – 1:111700.



3.3 pav. Rekombinantinių β -laktamazių imunogeniškumo vertinimo netiesioginės IFA metodu rezultatai. Pateikti pelių ($n = 3$) kraujo mėginiuose nustatytų antigenui specifiskų IgG antikūnų titro vidurkiai su standartiniais nuokrypiais.

Nustačius, jog rekombinantinės β -laktamazės yra imunogeniškos, MAK kūrimui iš kiekvienos imunizuotų pelių grupės buvo pasirinkta po 1 pelę. Atrinktos tos pelės, kurių antigenui specifiskų antikūnų titras po trečiosios imunizacijos buvo didžiausias: rACT-14 ateju jis siekė 1:100000, rNDM-1 – 1:65000, rPDC-195 – 81000 ir rCMY-34 – 120000. Toliau buvo atliktas atrinktų pelių blužnies ląstelių suliejimas su mielomos Sp2/0 linijos ląstelėmis – hibridizacija, po kurios vykdyta antigenams specifiskus MAK sekretuojančių hibridomų atranka. Iš viso buvo atrinktos 4-ios antikūnus sekretuojančių hibridinių ląstelių linijų kolekcijos: 12 hibridinių ląstelių linijų, sekretuojančių MAK prieš ACT-14, 11 – prieš NDM-1, 23 – prieš PDC-195 ir 14 – prieš CMY-34. Sukurti MAK ir jų apibūdinimo rezultatai pateikti 3.1.3 skyriuje.

3.1.3. MAK specifiskumo ir giminingumo tyrimai imunocheminiais metodais

Norint sukurtus MAK taikyti β -laktamazių nustatymui, reikalingas detalus antikūnų apibūdinimas. Šiame darbe buvo sukurtos 4-ios MAK kolekcijos prieš ACT-14, NAM-1, PDC-195 ir CMY-34 β -laktamazes. Visi MAK buvo IgG klasės. Sukurtų MAK kolekcijų apibūdinimas pateiktas 3.2 lentelėje. Šie MAK buvo detalčiai apibūdinti imunoblotingo (IB) ir IFA metodais, nustatytas IgG poklasis (3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Sukurtų MAK prieš β -laktamazės apibūdinimo rezultatai

Nr.	MAK klonas	IgG poklasis	K _d ^a , nM	Giminingumas atigenui ^b	IB	Atrikta konkurencinei analizei
MAK prieš ACT-14						
1.	8F12	IgG2a	0,05	++	+	+
2.	3C6	IgG1	0,1	++	+	+
3.	1F5	IgG1	0,1	++	+	+
4.	12H2	IgG1	0,05	++	+	–
5.	1F2	IgG2a	0,2	++	+	+
6.	7B6	IgG2a	0,02	++	+	+
7.	5B11	IgG1	0,06	++	+	–
8.	3C4	IgG2a	0,1	++	–	+
9.	8D1	IgG2b	0,05	++	+	+
10.	6H3	IgG2a	0,1	++	+	+
11.	4G1	IgG2b	0,05	++	+	–
12.	5G11	IgG1	20,3	+	–	–
MAK prieš NDM-1						
1.	2F7	IgG1	0,02	++	+	–
2.	5F7	IgG1	0,01	++	+	+
3.	8E5	IgG2b	0,003	++	+	+
4.	5E2	IgG1	0,01	++	+	+
5.	10B6	IgG2b	0,003	++	+	+
6.	1G8	IgG1	0,01	++	+	–
7.	2C1	IgG1	0,004	++	+	+
8.	3F10	IgG1	0,01	++	+	+
9.	4E12	IgG1	0,02	++	+	+
10.	9B11	IgG1	0,01	++	+	+
11.	3D8	IgG1	0,01	++	+	–
MAK prieš PDC-195						
1.	3G7	IgG1	0,2	++	+	–
2.	9B6	IgG1	0,9	++	+	–
3.	11H4	IgG2b	0,2	++	+	+
4.	10B4	IgG2b	0,3	++	+	–
5.	8E7	IgG2a	0,07	++	+	+
6.	2D3	IgG2	0,4	++	+	–
7.	16F6	IgG2a	0,07	++	+	+
8.	20A6	IgG1	0,2	++	+	+
9.	5D1	IgG1	0,1	++	+	–
10.	13E12	IgG2a	0,08	++	+	+
11.	19E7	IgG1	0,08	++	+	–
12.	9G2	IgG1	0,01	++	+	+
13.	8B6	IgG1	0,1	++	+	–
14.	15E12	IgG1	0,02	++	+	–
15.	13C9	IgG1	0,3	++	+	–
16.	19F2	IgG1	0,1	++	+	+
17.	11A5	IgG1	0,1	++	+	–
18.	13D9	IgG1	0,01	++	+	–
19.	21H10	IgG2b	0,1	++	+	+
20.	8D2	IgG1	0,03	++	+	–
21.	18B5	IgG1	0,05	++	+	–
22.	3H11	IgG1	0,05	++	+	–
23.	9H10	IgG2a	0,1	++	+	–

Nr.	MAk klonas	IgG poklasis	K _d ^a , nM	Giminingumas antigenui ^b	IB	Atrikta konkurencinei analizei
MAk prieš CMY-34						
1.	1A2	IgG1	0,3	++	+	–
2.	7H12	IgG2a	0,05	++	+	+
3.	8G6	IgG1	0,3	++	+	–
4.	9D2	IgG1	0,2	++	+	+
5.	7F1	IgG1	0,1	++	+	–
6.	2E11	IgG2a	0,1	++	+	+
7.	12F4	IgG2a	0,2	++	+	+
8.	12E5	IgG1	0,1	++	+	–
9.	7D10	IgG2a	2,5	+	+	–
10.	3A2	IgG1	0,1	++	+	–
11.	14C7	IgG1	0,1	++	+	–
12.	13A8	IgG1	0,06	++	+	–
13.	12F8	IgG1	0,08	++	+	+
14.	3E9	IgG1	0,2	++	+	+

^aK_d nustatymui netiesiogine IFA naudotos rekombinantinės β-laktamazės.

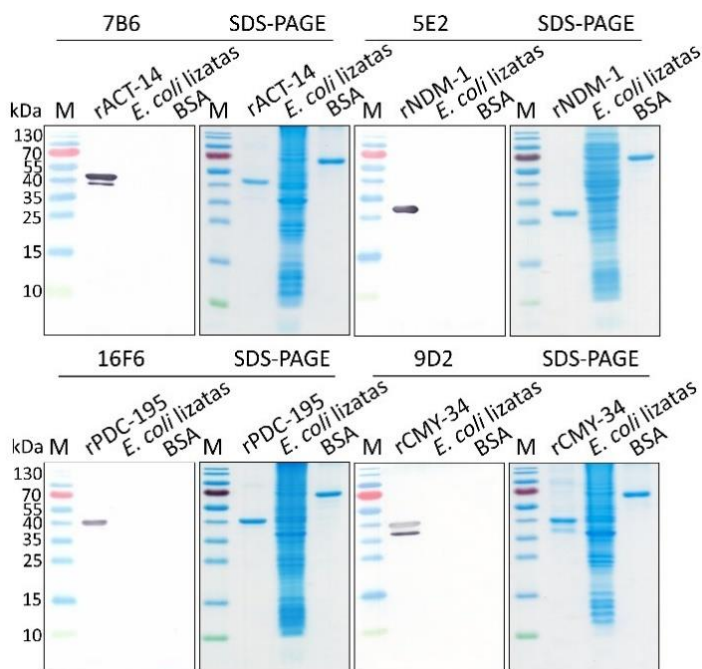
^b„++“ – didelis giminingumas antigenui, kai K_d ≤ 1 nM; „+“ – žemas giminingumas antigenui, kai K_d > 1 nM.

^cIB metode vizualiai matoma antigeną atitinkanti juostelė nurodo teigiamą rezultatą (+), jei juostelė nenustatyta – neigiamą rezultatą (–).

Atliekant MAK apibūdinimą, IB metodu įvertintas MAK reaktyvumas su rekombinantinėmis β-laktamazėmis. Apibendrinti MAK tyrimo IB metodu rezultatai pateikti 3.2 lentelėje, IB rezultatų pavyzdžiai pateikti 3.4 paveiksle, likę IB rezultatai pateikti 1 priede. Nustatyta, jog sukurtieji MAK prieš ACT-14, išskyrus klonus 3C4 ir 5G11, tiriant IB metodu specifiskai atpažįsta denatūruotą ir redukuotą rACT-14 baltymą ir nereaguoja su neigiamos kontrolės *E. coli* lizato ir jaučio serumo albumino (BSA) baltymais. Taip pat nustatyta, kad visi sukurtieji MAK prieš NDM-1, PDC-1 ir CMY-34 tiriant IB metodu atpažįsta denatūruotus ir redukuotus rekombinantinius antigenus.

Siekiant detaliau apibūdinti MAK ir rekombinantinių β-laktamazių sąveiką, nustatytos MAK tariamosios disociacijos konstantos (K_d) reikšmės. K_d nurodo antikūnų giminingumą antigenui ir atitinka tokią antikūnų koncentraciją, kuriai esant, antikūnai prisijungia prie pusės tirpale esančio antigeno molekulių, t. y. OT sumažėja perpus. Antikūnai laikomi giminingais antigenui, kai K_d reikšmė yra mažesnė nei 1 nM. Šiame darbe K_d nustatymui MAK tirti netiesioginės IFA metodu su rekombinantinėmis β-laktamazėmis ir, remiantis IFA rezultatais, braižytos OT priklausomybės nuo MAK koncentracijos kreivės. Nustatytos K_d reikšmės pateiktos 3.2 lentelėje. Po MAK prieš ACT-14 testavimo nustatyta, kad visų MAK, išskyrus kloną 5G11, K_d reikšmės siekė 0,02–1 nM, todėl šiems MAK yra būdingas didelis giminingumas antigenui. Tuo tarpu MAK 5G11 pasižymėjo žemu giminingumu rACT-14, kadangi K_d siekė 20,3 nM. Taip pat nustatyta, jog visi MAK prieš NDM-1 (K_d 0,003–0,02 nM) ir PDC-195 (K_d 0,01–0,9 nM) pasižymi dideliu giminingumu atitinkamiems baltymams – rNDM-1 ir rPDC-195. Visi MAK prieš CMY-34, išskyrus kloną 7D10, pasižymėjo dideliu

giminingumu antigenui – jų K_d reikšmės siekė nuo 0,05 iki 0,3 nM. Tuo tarpu nustatyta MAK 7D10 K_d reikšmė siekė 2,5 nM.

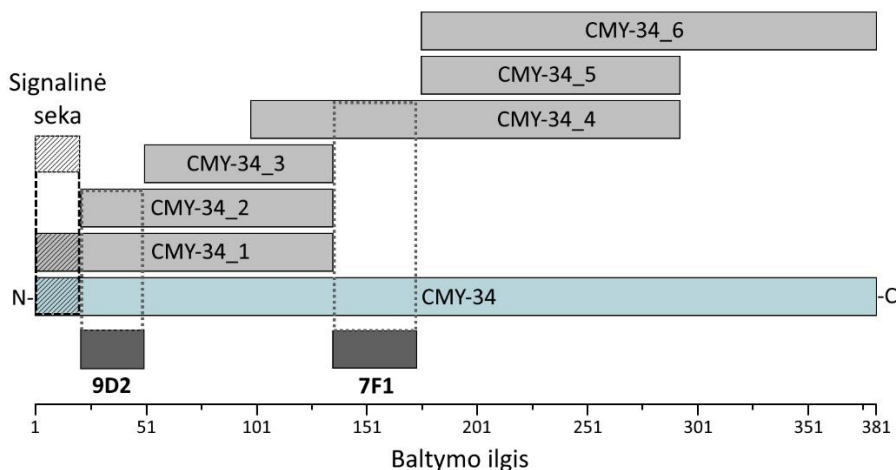


3.4 pav. MAK reaktyvumo su antigenais tyrimas IB metodu. Pavaizduotos IB ir SDS-PAGE nuotraukos, kai buvo tirti MAK 7B6 prieš ACT-14, MAK 5E2 prieš NDM-1, MAK 16F6 prieš PDC-195 ir MAK 9D2 prieš CMY-34. *E. coli* lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.

Imunocheminiais metodais įvertinus sukurtų MAK reaktyvumą su rekombinantinėmis β -laktamazėmis, kitame darbo etape siekta nustatyti MAK atpažinimo sritis tikslinių antigenų struktūroje.

3.1.4. MAK epitopų analizė, naudojant persidengiančius β -laktamazių fragmentus

Siekiant nustatyti sukurtų MAK prieš ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34 atpažinimo sritis (epitopus) antigenų molekulėse, kiekvieno antigeno atveju buvo sukontruoti persidengiantys ir su His₆ seka sulieti β -laktamazių fragmentai. Šiame darbe MAK prieš ACT-14 epitopų nustatymui buvo sukonstruoti 5 ACT-14, MAK prieš NDM-1 atveju – 3 NDM-1 ir MAK prieš PDC-195 atveju – 6 PDC-195 fragmentai. MAK prieš CMY-34 testavimui buvo panaudoti 6 CMY-34 fragmentai, kurių schematinis vaizdas pateiktas 3.5 paveiksle. Fragmentų konstravimui naudoti pradmenys ir jų apibūdinimas pateikti Metodų 2.1.8 skyriuje, 2.1 lentelėje.

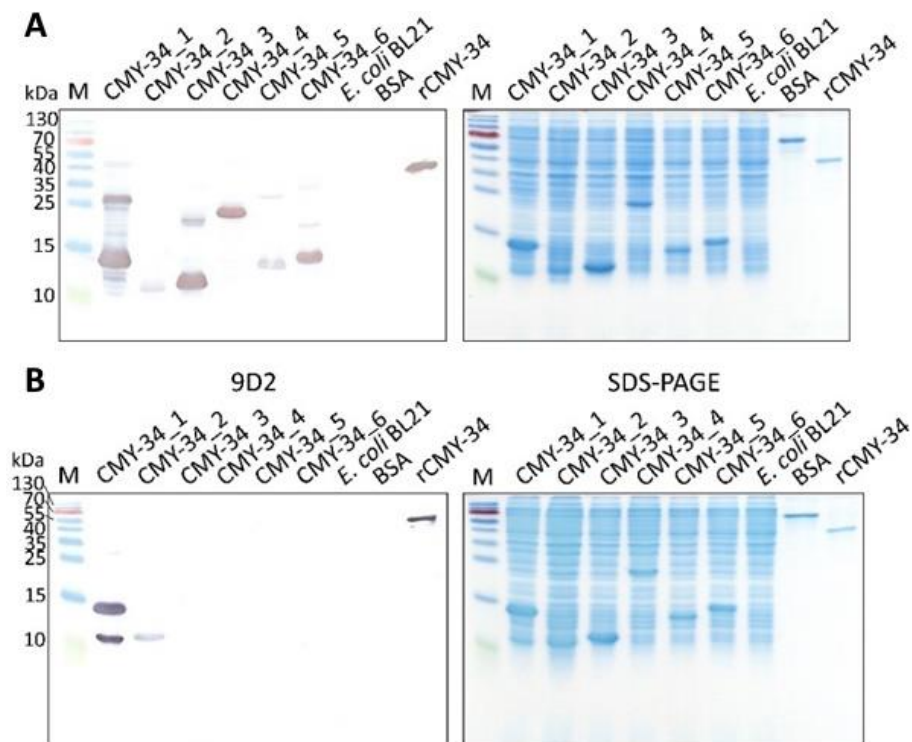


3.5 pav. Persidengiančių CMY-34 β -laktamazės fragmentų, naudotų MAK prieš CMY-34 epitopų nustatymui, schematinis vaizdas. Baltymo fragmentai (CMY-34_1–CMY-34_6) pavaizduoti šviesiai pilka, nustatytos MAK 9D2 ir 7F1 prieš CMY-34 atpažinimo sritys – tamsiai pilka, pilno ilgio CMY-34 baltymas – žalsvai mėlyna spalva. Pagal CMY-34 ar. seką *GenBank* nr. ABN51006.1.

Sukonstruoti β -laktamazių fragmentai buvo susintetinti *E. coli* bakterijose, o jų sintezė patvirtinta IB metodu, testuojant *E. coli* lizatus po baltymų fragmentų sintezės indukcijos su MAK prieš His₆ seką. CMY-34 fragmentų sintezės tyrimo IB metodu rezultatų pavyzdys pateiktas 3.6 A paveiksle. Remiantis IB rezultatais, patvirtinta β -laktamazių fragmentų sintezė *E. coli*. Toliau šių bakterijų lizatai IB metodu testuoti su sukurtais MAK prieš β -laktamazes. MAK 9D2 prieš CMY-34 testavimo su CMY-34 baltymo fragmentais (CMY-34_1–CMY-34_6) IB rezultatų pavyzdys pateiktas 3.6 B paveiksle. Išanalizavus šiuos rezultatus, nustatyta, kad MAK 9D2 prieš CMY-34 IB reagavo su CMY-34_1 ir CMY-34_2 fragmentais ir neatpažino likusių CMY-34_3–CMY-34_6 fragmentų. Šie antikūnai nereagavo su neigiamai kontrolei naudotais *E. coli* lizato ir BSA baltymais. Atsižvelgiant į rezultatus, MAK 9D2 atpažinimo sritis buvo lokalizuota CMY-34 baltymo 22–49 ar. regione.

Šia metodika ištyrus likusių MAK reaktyvumą su trumpintais β -laktamazių fragmentais, iš viso identifikuotos 3-jų MAK prieš ACT-14, 9-ių MAK prieš NDM-1, 8-ių MAK prieš PDC-195 ir 2-jų MAK prieš CMY-34 atpažinimo sritys antigenuose (3.3 lentelė). Nustatytos 3.3 lentelėje pateiktų MAK atpažinimo sritys vizualizuotos erdvinėse β -laktamazių struktūrose (3.7 pav.). Nustatyta, kad MAK prieš ACT-14 epitopai yra išsėdę ACT-14 baltymo 1–50, 176–203 ir 336–381 ar. regionuose. Šios sritys baltyme formuoja signalinę seką (1–20 ar.) ir α -spiralės struktūras baltymo išorėje (3.7 pav. A). Tuo tarpu visi 9 MAK klonai prieš NDM-1 atpažino NDM-1 baltymo 1–56 ar. regioną, kuris antigeno molekulės išorėje sudaro signalinę seką (1–38 ar.) ir β -klostės struktūrą (3.7 pav. B). Nustatyta, kad visų 8 MAK klonų prieš PDC-195

epitopai yra išsidėstę PDC-195 baltymo 1–53 ar. regione, kuris formuoja signalinę seką (1–26 ar.) bei α -spiralės ir β -klostės struktūras (3.7 pav. C). 2 MAk klonų prieš CMY-34 atpažinimo regionai yra išsidėstę CMY-34 baltymo 22–49 ir 136–174 ar. srityse, taip pat formuojančiose antrines baltymo struktūras baltymo išorėje (3.7 pav. D).



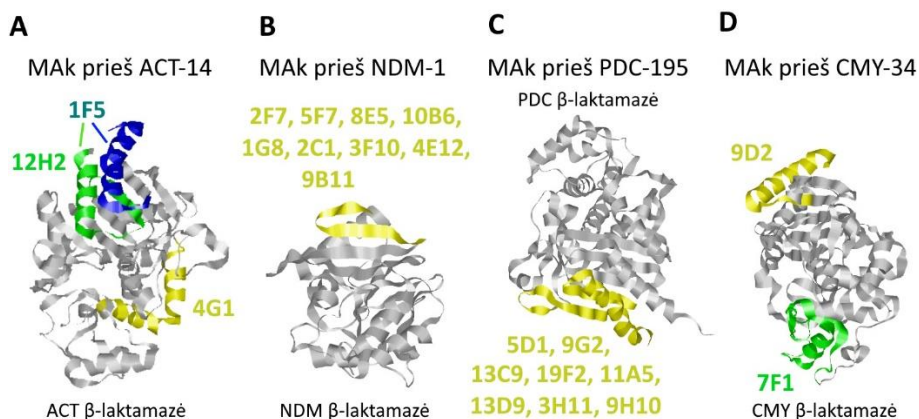
3.6 pav. MAk prieš CMY-34 atpažinimo sričių nustatymo su CMY-34 baltymo fragmentais IB rezultatai. **(A)** CMY-34 baltymo fragmentų (CMY-34_1–CMY-34_6) nustatymas *E. coli* lizatuose po baltymų sintezės indukcijos, detekcijai naudojant MAk 6C2 prieš His₆-žymę. **(B)** MAk 9D2 prieš CMY-34 reaktyvumo su CMY-34 baltymo fragmentais *E. coli* lizatuose po baltymų sintezės indukcijos tyrimas. *E. coli* BL21 lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.

Gauti tyrimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog 3.3 lentelėje pateikti MAk atpažįsta linijinius antigeno epitopus, kadangi antikūnai tiriant IB metodu reaguoja su denatūruotais ir redukuotais antigenų fragmentais. Tačiau, dalies sukurtų MAk atpažinimo sričių β -laktamazėse, taikant šią metodiką, nustatyti nepavyko. Galimai šių antikūnų epitopai yra suardomi, antigeną padalijant į fragmentus.

3.3 lentelė. Nustatytos MAK prieš β -laktamazes atpažinimo sritys antigenuose^a

MAK prieš ACT-14		MAK prieš NDM-1		MAK prieš PDC-195		MAK prieš CMY-34	
MAK	Regionas antigene	MAK	Regionas antigene	MAK	Regionas antigene	MAK	Regionas antigene
1F5	1–50 ir 336–381 ar.	2F7	1–56 ar.	5D1	1–53 ar.	9D2	22–49 ar.
12H2	336–381 ar.	5F7	1–56 ar.	9G2	1–53 ar.	7F1	136–174 ar.
4G1	176–203 ar.	8E5	1–56 ar.	13C9	1–53 ar.		
		10B6	1–56 ar.	19F2	1–53 ar.		
		1G8	1–56 ar.	11A5	1–53 ar.		
		2C1	1–56 ar.	13D9	1–53 ar.		
		3F10	1–56 ar.	3H11	1–53 ar.		
		4E12	1–56 ar.	9H10	1–53 ar.		
		9B11	1–56 ar.				

^aPagal ACT-14 ar. seką *GenBank* nr. AFU25647.1, NDM-1 – *GenBank* nr. AHM26723.1, PDC-195 – *GenBank* nr. AHH52937.1, CMY-34 – *GenBank* nr. ABN51006.1



3.7 pav. Nustatyti MAK atpažinimo regionai β -laktamazėse. (A) MAK prieš ACT-14 (PDB 2ZC7). (B) MAK prieš NDM-1 (PDB 7VQJ). (C) MAK prieš PDC-195 (PDB 6S1S). (D) MAK prieš CMY-34 (PDB 7PA5). Pavaizduotos β -laktamazių struktūros be signalinio peptido.

3.1.5. MAK atranka imunologinių analitinių sistemų kūrimui

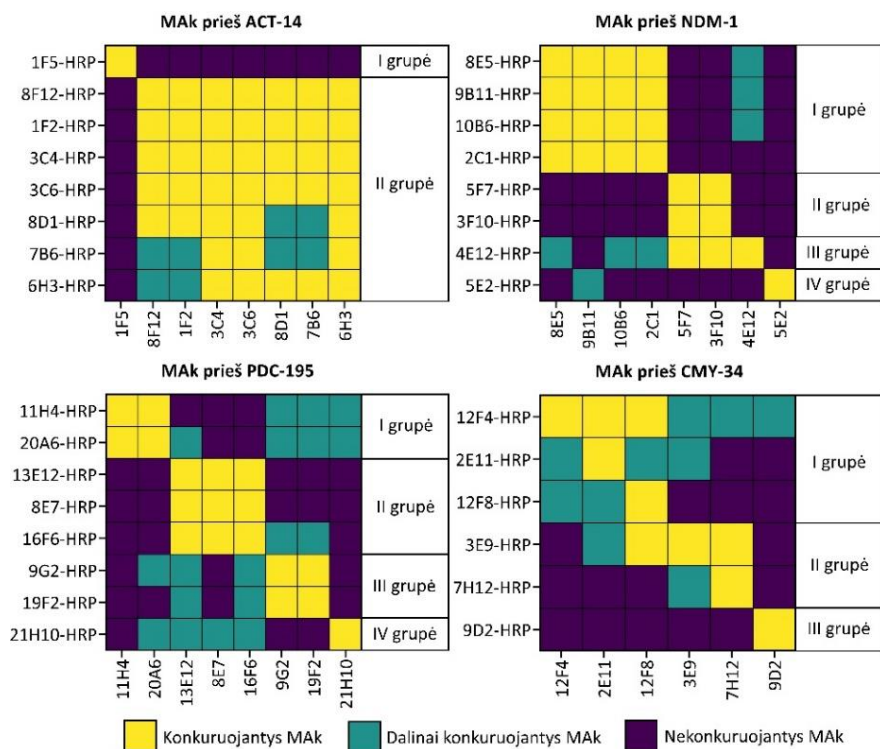
Antikūnais paremtų imunologinių detekcijos sistemų kūrimui dažniausiai naudojamos antigenams specifiskų antikūnų poros. Tokią porą gali sudaryti du skirtingi dėl prisijungimo prie antigeno tarpusavyje nekonkuruojantys MAK. Vienas iš antikūnų yra imobilizuojamas ant kietosios fazės ir atlieka antigeno „išgaudymo“ iš tiriamojo mėginio funkciją, o antrasis, detekcine žyme žymėtas MAK, jungdamasis prie imobilizuoto MAK-antigeno komplekso, atlieka nustatymo funkciją. Todėl, šiame darbe, siekiant MAK pritaikyti β -laktamazių nustatymui ir atrinkti imunologinių detekcijos sistemų kūrimui tinkančias antikūnų poras, pirmiausia atliktas MAK konkurencijos tyrimas. Šiuo tikslu, reminatis IB ir K_d nustatymo rezultatais (3.2 lentelė), iš

kiekvienos MAK prieš ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34 kolekcijos konkurencijos tyrimui atrinkta po 6–8 MAK klonus (3.4 lentelė).

3.4 lentelė. Konkurencijos tyrimui atrinkti MAK prieš β -laktamazes

Nr.	MAK prieš ACT-14	MAK prieš NDM-1	MAK prieš PDC-195	MAK prieš CMY-34
1.	1F5	8E5	11H4	12F4
2.	8F12	9B11	20A6	2E11
3.	1F2	10B6	13E12	12F8
4.	3C4	2C1	8E7	3E9
5.	3C6	5F7	16F6	7H12
6.	8D1	3F10	9G2	9D2
7.	7B6	4E12	19F2	
8.	6H3	5E2	21H10	

Atrinkti MAK buvo pažymėti detekcine žyme – krienų peroksidazės fermentu (angl., *horse radish peroxidase*, HRP) ir konkurencinės IFA metodu testuotos MAK ir HRP žymėtų MAK (MAK-HRP) kombinacijos. Remiantis konkurencinės IFA rezultatais, MAK suskirstyti į grupes pagal persidengiančias arba tik jiems būdingas atpažinimo sritis antigeno molekulėje (3.8 pav.).



3.8 pav. Konkurencinės IFA rezultatai. MAK suskirstyti į grupes pagal persidengiančius arba tik jiems būdingus epitopus.

Atskirą grupę sudaro MAK, kurie konkurencinėje IFA konkuravo arba dalinai konkuravo dėl prisijungimo prie antigeno. Remiantis konkurencinės analizės rezultatais, MAK prieš ACT-14 suskirstyti į 2, MAK prieš NDM-1 ir PDC-195 – 4 ir MAK prieš CMY-34 – 3 grupes (3.8 pav.). Kombinuojant skirtingoms grupėms priklausančius MAK, atrinkta po dvi potencialiai imunologinėms detekcinėms sistemoms tinkančias MAK poras, kurias sudaro tarpusavyje dėl prisijungimo prie antigeno nekonkuruojantys antikūnai. Atrinktos poros pateiktos 3.5 lentelėje.

3.5 lentelė. Atrinktos tarpusavyje dėl prisijungimo prie antigeno nekonkuruojančios MAK poros

Nr.	MAK prieš ACT-14	MAK prieš NDM-1	MAK prieš PDC-195	MAK prieš CMY-34
1.	1F5 ir 7B6	5E2 ir 3F10	16F6 ir 20A6	9D2 ir 2E11
2.	1F5 ir 6H3	2C1 ir 5F7	11H4 ir 8E7	2E11 ir 7H12

Norint atrinktas MAK poras taikyti detekciniuose metoduose, svarbu atlikti išsamų šių porų ir jiems priklausančių antikūnų apibūdinimą, kuris aprašytas tolesniuose skyriuose.

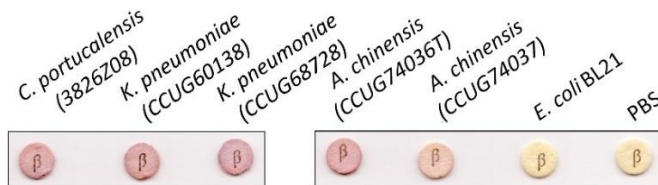
3.1.6. MAK reaktyvumo su natyviomis β -laktamazėmis tyrimas, naudojant bakterijų izoliatus

Siekiant detalai apibūdinti 3.1.5 skyriuje atrinktas potencialiai imunologiniams analitiniams metodams tinkančias MAK prieš β -laktamazes poras, toliau vertintas šių antikūnų reaktyvumas su natyviomis β -laktamazėmis. Šiuo tikslu atrinktieji MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 buvo tirti su NDM ir CMY tipo β -laktamazės produkuojančiais bakterijų izoliatais. Tačiau MAK prieš ACT-14 ir PDC-195 su natyviomis β -laktamazėmis nebuvo testuoti, nes nepavyko gauti tam reikalingų bakterijų izoliatų. Todėl toliau šiame skyriuje aprašomi tik atrinktų MAK prieš CMY-34 ir NDM-1 tyrimo su bakterijų izoliatais rezultatai.

MAK testavimui buvo naudoti anksčiau apibūdinti bakterijų izoliatai: CMY-34 produkuojantis *Citrobacter portucalensis* (3826Z08), NDM-1 produkuojantys *Klebsiella pneumoniae* (CCUG60138, CCUG68728) ir *Acinetobacter chinensis* (CCUG74036T, CCUG74037), kurių apibūdinimas pateiktas Metodų 2.1.13 skyriuje. β -laktamazės koduojantys *bla*_{CMY} ir *bla*_{NDM} genai izoliatuose papildomai patvirtinti PGR metodu, naudojant anksčiau aprašytus 701 bp *bla*_{CMY} ir 258 bp *bla*_{NDM} regionams specifiskus pradmenis [129] (2 priedas). Atlikus PGR, abiejuose *K. pneumoniae* izoliatuose (CCUG60138, CCUG68728) patvirtintas *bla*_{NDM} (2 priedas). Šiuos izoliatus patikrinus su *bla*_{CMY} specifiskais pradmenimis, nustatytas CMY tipo β -laktamazę koduojantis genas, kuris anksčiau šiuose izoliatuose nebuvo apibūdintas (2 priedas). Atlikus PGR produkto sekoskaitą ir analizę, patvirtinta, kad abu *K. pneumoniae* izoliatai koduoja CMY-4 β -laktamazę,

todėl toliau MAK apibūdinimo darbuose šie izoliatai naudoti kaip natyvių NDM-1 ir CMY-4 β -laktamazių producentai.

Šiame darbe MAK reaktyvumas su natyviomis β -laktamazėmis tirtas panaudojant bakterijų izoliatų lizatus. Bradford metodu nustatyta lizato baltymų koncentracija, o po lizatų ruošimo procedūros išlikęs natyvių β -laktamazių fermentinis aktyvumas patvirtintas *BL Cefinase* testu (3.9 pav.).

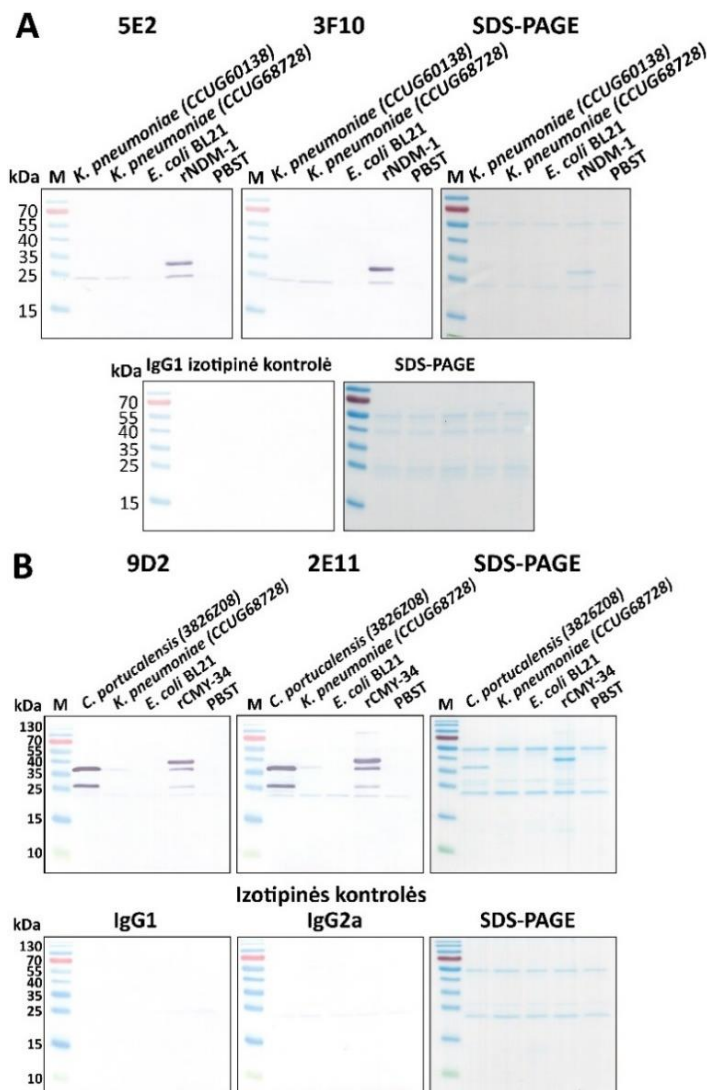


3.9 pav. β -laktamazės produkuojančių bakterijų lizatų tikrinimas *BL Cefinase* testu. Kaip neigiamos kontrolės naudoti lizatų skiedimo buferinis tirpalas (PBS) ir *E. coli* BL21 kamieno lizatas. Raudona spalva nurodo nitrocefino hidrolizę (teigiamas rezultatas), geltona – hidrolizė nevyksta (neigiamas rezultatas).

Toliau paruoštieji bakterijų lizatai IB, imunoprecipitacijos (IP) ir netiesioginės IFA metodais testuoti su atrinktų MAK prieš NDM-1 porų klonais 3F10, 5E2, 2C1 ir 5F7. Ištyrus NDM-1 produkuojančių *K. pneumoniae* lizatus, nustatyta, kad visi tirtieji MAK imunoprecipituoja ne tik rNDM-1, bet ir natyvią NDM-1 β -laktamazę iš bakterijų lizato. MAK nesąveikauja su neigiamos kontrolės (*E. coli* BL21 lizato) baltymais – tai patvirtina, kad MAK sąveika su tiksliniu antigenu yra specifiška. MAK 5E2 ir 3F10 IP rezultatų pavyzdys pateiktas 3.10 A paveiksle, MAK 2C1 ir 5F7 IP rezultatai – 3 priede. Analizuojant rezultatus, matomos IB metodu identifikuotos ~24 kDa dydžio natyvų NDM-1 baltymą atitinkančios juostos. ~32 kDa juosta atitinka rNDM-1, galimai dėl šio baltymo degradacijos žemiau matoma papildoma mažesnės molekulinės masės baltymo juosta (3.10 pav. A).

IB ir netiesioginės IFA metodais ištyrus NDM-1 produkuojančių *A. chinensis* ir *K. pneumoniae* lizatus, papildomai patvirtintas visų tirtų MAK prieš NDM-1 reaktyvumas su natyviu antigenu. MAK 5E2 ir 3F10 IB rezultatų pavyzdys pateiktas 3.11 A paveiksle, MAK 2C1 ir 5F7 – 3 priede. IFA rezultatai pateikti 3 priede.

Imunocheminiais metodais atliktas atrinktų MAK 9D2, 2E11 ir 7H12 prieš CMY-34 reaktyvumo su natyviais antigenais testavimas. IP metodu testuojant CMY-34 produkuojančią *C. portucalensis* ir *K. pneumoniae*, kuriam būdinga CMY-4, lizatus, nustatyta, jog visi MAK imunoprecipituoja natyvias CMY-34 ir CMY-4 β -laktamazės iš bakterijų lizato. Patvirtinta, kad nevyksta MAK nespecifinė sąveika su neigiamai kontrolei naudoto *E. coli* BL21 lizato baltymais. MAK 9D2 ir 2E11 testavimo rezultatų pavyzdys pateiktas 3.10 B paveiksle, MAK 7H12 – 3 priede.

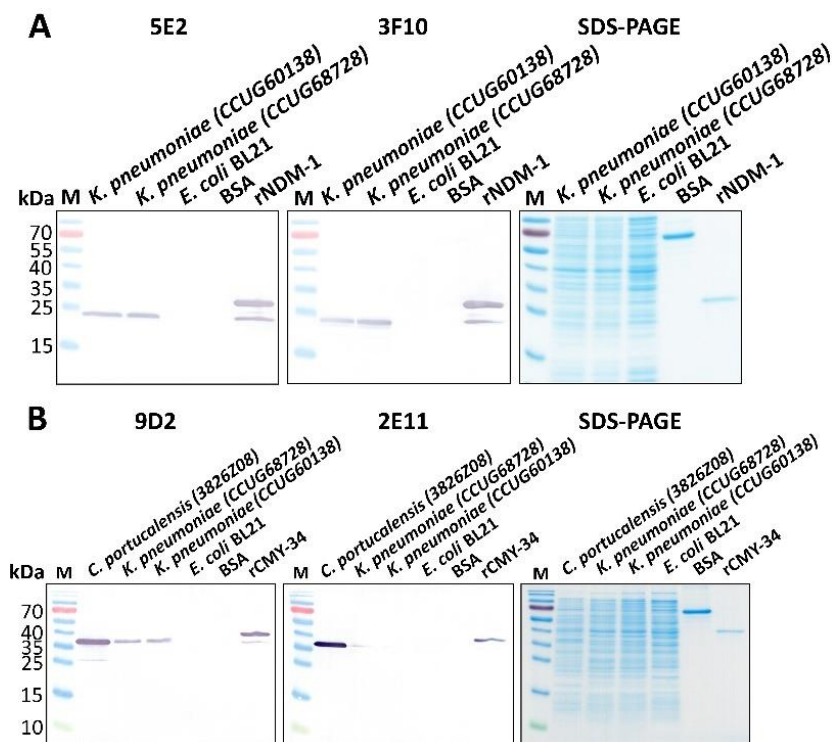


3.10 pav. Natyvių ir rekombinantinių β -laktamazių IP su MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 rezultatai. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvios CMY-34, *K. pneumoniae* – CMY-4 ir NDM-1, šaltinis. **(A)** IP su MAK 5E2 ir 3F10 prieš NDM-1. Detekcijai naudotas HRP-konjuguotas MAK 5E2 prieš NDM-1. **(B)** IP su MAK 9D2 ir 2E11 prieš CMY-34. Detekcijai naudotas HRP konjuguotas MAK 9D2 prieš CMY-34. Izotipinėms kontrolėms naudoti: IgG1 MAK prieš Der p 23 alergeną ir IgG2a MAK 20G11 prieš SARS-CoV-2 spyglio baltymą. *E. coli* BL21 lizatas ir mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBST) tirti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.

IB rezultatuose matomos ~38 kDa natyvios CMY-34 ir CMY-4 baltymus atitinkančios juostos, aukščiau 25 kDa standarto žymės esančios juostos galimai atitinka dėl degradacijos sutrumpėjusias tikslinio baltymo formas

(3.10 pav. B). Taip pat nustatyta, kad abu MAK imunoprecipitavo rCMY-34 baltymą, kurio atveju baltymo juosta matoma ties 40 kDa žyme, o žemiau yra išsidėsčiusios degraduoto rCMY-34 baltymo formos (3.10 pav. B).

IB ir netiesiogine IFA su CMY-34 ir CMY-4 produkuojančių izoliatų lizatais patvirtintas visų MAK prieš CMY-34 reaktyvumas su natyviais CMY-34 bei CMY-4 baltymais. MAK 9D2 ir 2E11 IB rezultatų pavyzdys pateiktas 3.11 B paveiksle, MAK 7H12 – 3 priede. IFA rezultatai pateikti 3 priede.



3.11 pav. MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 reaktyvumo su natyviomis β -laktamazėmis IB rezultatai. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvios CMY-34, *K. pneumoniae* – CMY-4 ir NDM-1, šaltinis. (A) MAK 5E2 ir 3F10 prieš NDM-1 tyrimas. (B) MAK 9D2 ir 2E11 prieš CMY-34 tyrimas. BSA – jaučio serumo albuminas. *E. coli* BL21 lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiama kontrolė M – baltymų molekulinės masės standartas.

Imunocheminiais tyrimų metodais patvirtinus MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 reaktyvumą su natyviomis β -laktamazėmis bakterijų lizatuose, toliau siekta įvertinti MAK kryžminį specifiškumą.

3.1.7. MAK kryžminio specifiškumo tyrimas

Žinoma didelė β -laktamazių įvairovė, todėl MAK, kaip molekulinį β -laktamazių nustatymo įrankių, taikymui svarbu ištirti jų kryžminį reaktyvumą

su šiais baltymais. Šiuo tikslu 3.1.5 skyriuje atrintų porų MAK ištirti IB ir netiesioginės IFA metodais, naudojant 12-os rekombinantinių β -laktamazių kolekciją. Tyrimui atrinktos pagal Ambler klasifikaciją A, B, C ir D β -laktamazių klasėms priklausančios β -laktamazės.

Atlikus MAK 1F5, 7B6 ir 6H3 prieš ACT-14 analizę IB ir IFA metodais, nustatytas MAK 1F5 kryžminis reaktyvumas su rCMY-34 β -laktamaze (4 priedas). Sugretinus ACT-14 ir CMY-34 ar. sekas, nustatytas 76,1 % sekų panašumas (3.6 lentelė), kadangi šie baltymai priklauso tai pačiai C β -laktamazių klasei.

3.6 lentelė. β -laktamazių ar. sekų identiškumo matrica, išreikšta procentais.

Palyginimas atliktas su *Clustal O*

	ACT-14	NDM-1	PDC-195	CMY-34
ACT-14	100 %	22,9 %	43,9 %	76,1 %
NDM-1	22,9 %	100 %	20 %	21,3 %
PDC-195	43,9 %	20 %	100 %	42,1 %
CMY-34	76,1 %	21,3 %	42,1 %	100 %

Pagal ACT-14 ar. seką *GenBank* nr. AFU25647.1, NDM-1 – *GenBank* nr. AHM26723.1, PDC-195 – *GenBank* nr. AHH52937.1, CMY-34 – *GenBank* nr. AFU25647.1

Detaliau išanalizavus nustatytą MAK 1F5 epitopą (3.1.4 skyrius), matoma, jog pastarasis yra sudarytas iš dviejų, erdviškai greta ACT-14 molekulėje išsidėsčiusių 1–50 ir 336–381 ar. regionų (3.1.4 skyrius, 3.3 lentelė, 3.7 pav.). Palyginus šiuos regionus su kryžmiškai reagavusio CMY-34 baltymo ar. seka, buvo identifikuoti tarpusavyje dideliu panašumu pasižymintys ar. segmentai (3.12 pav. A). Šis panašumas galėjo lemti MAK 1F5 kryžminį reaktyvumą su rCMY-34.

Palyginus MAK 1F5 epitopą su ACT šeimai priklausančių β -laktamazių ar. sekomis, nutatyta, kad ACT-14 1–50 ar. regionas yra identiškas 7-ioms (ACT-5, -21, -23, -39, -47, -57, -90) ACT β -laktamazėms. 1 ar. skirtumas šiame regione būdingas 5-oms ACT tipo β -laktamazėms, 2 ar. skirtumai – 33, 3 arba 4 ar. skirtumai – 14 ir daugiau nei 5 ar. – likusiems ACT variantams. Sekų palyginio pavyzdžiai, kai nustatyti 1, 2 ir daugiau ar. skirtumų, pateiki 3.12 B paveiksle.

Atlikus MAK 1F5 epitopo 336–381 ar. ACT regiono analizę, šiai sričiai 100 % identiškų ACT šeimos fermentų nenustatyta, tačiau identifikuota 13 ACT atstovų, kuriems būdingas 1 ar. pasikeitimas, 22 variantai su 2 ar. pakaitomis, 50 variantų su 3 arba 4 ar. ir likę – su 5 arba daugiau ar. skirtumais šiame regione. Sekų analizės pavyzdžiai pateikti 3.12 B paveiksle. Tačiau, norint detaliau įvertinti MAK 1F5 reaktyvumą su ACT šeimos β -laktamazėmis, reikalingas MAK epitopo ACT-14 baltyme patikslinimas, sukonkretinant ir sutrumpinant šiuo metu identifikuotą atpažinimo regioną. Svarbu ir tai, kad lyginant ACT-14 336–381 ar. regioną, didelei daliai ACT-tipo β -laktamazių yra būdingi 5 ir daugiau ar. skirtumų šioje srityje. Patikslinus MAK epitopą, būtų galima tiksliau apibūdinti potencialų MAK reaktyvumą su skirtingais ACT variantais.

Paminėtina, jog atrinktų porų MAK 7B6 ir 6H3 prieš ACT-14 epitopų šiame darbe nustatyti nepavyko, todėl šių MAK atpažinimo sričių sugretinimas su ACT β -laktamazėmis nebuvo atliktas.

A

```
CMY-34      1MMKKSLLCCALLLTASFSSTFAAAKTEQQIADIVNRTITPLMQEQAIIPGMAV50
ACT-14_1-50 1MMKKSLLCCALLLGISSALAAPVSEKQLAEVVANTVTPLMKAQSIIPGMAV50
***** *::*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*****
```

```
CMY-34      336TGSTGGFGSYVAFVPEKNLGIIVMLANKSYNPNVRVEAAWRILEKLQ381
ACT-14_336-381 336TGSTGGFGSYLAFIPEKQIGIVMLANKSYNPNARVEAAHYHILDALQ381
*****::*:*:*:*:*****:***:***
```

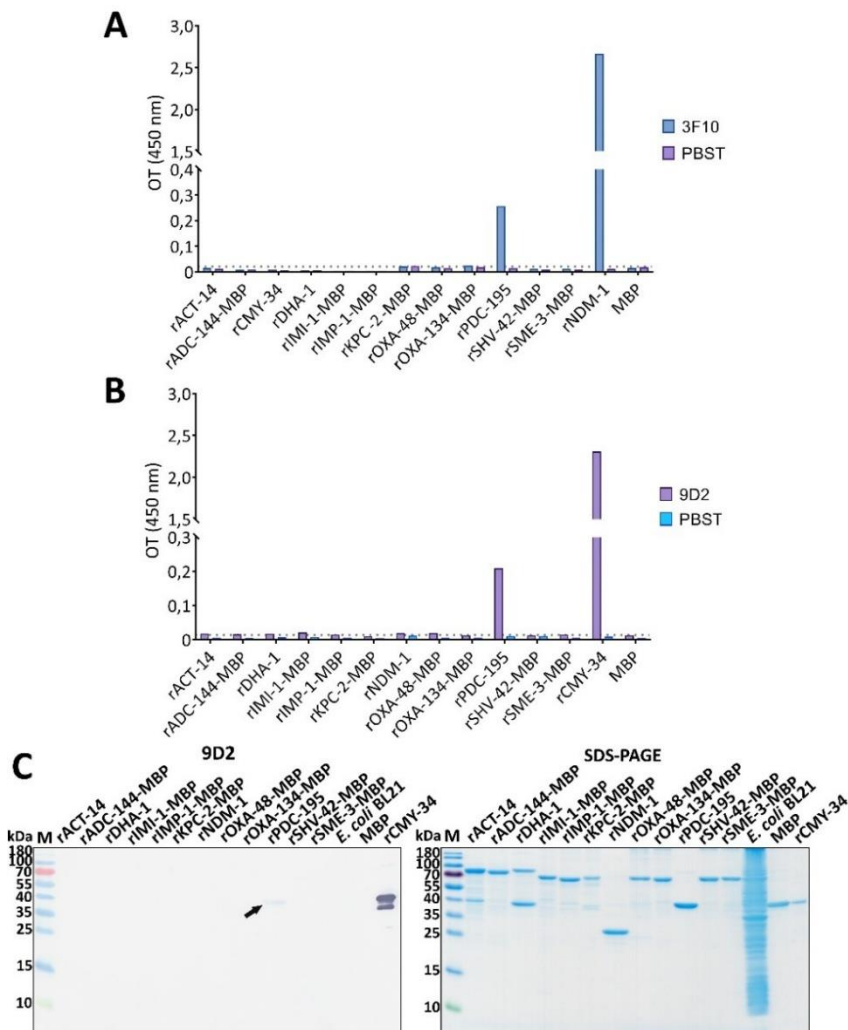
B

```
ACT-14_1-50 1MMKKSLLCCALLLGISSALAAPVSEKQLAEVVANTVTPLMKAQSIIPGMAV50
ACT-5      1MMKKSLLCCALLLGISSALAAPVSEKQLAEVVANTVTPLMKAQSIIPGMAV50
ACT-24     1MMKKSLLCCALLLGISSALAAPVSEKQLAEVVANTVTPLMKAQSIIPGMAV50
ACT-83     1MMKKSLLCCALLLGISSALATPVSEKQLAEVVANTVTPLMKAQSVPGMAV50
ACT-116    1MMTKSLCCALLLSTSCSVLAAPMSEKQLAEVVERTVTPLMKAQAIIPGMAV50
*****:*****:***:***:*****:*****:*****:*****
```

```
ACT-14_336-381 336TGSTGGFGSYLAFIPEKQIGIVMLANKSYNPNARVEAAHYHILDALQ381
ACT-24      336TGSTGGFGSYVAFIPEKQIGIVMLANKSYNPNARVEAAHYHILDALQ381
ACT-83      336TGSTGGFGSYVAFIPEKQIGIVMLANKSYNPNARVEAAHYHILEALQ381
ACT-7       336TGSTGGFGSYVAFIPEKQIGIVMLANTSYNPNARVEAAHYHILEALQ381
ACT-52      336TGSTGGFGSYVAFIPEKELGIIVMLANKSYNPNARVEAAHYRILSALQ381
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
```

3.12 pav. MAK 1F5 prieš ACT-14 epitopo (1–50 ir 336–381 ar.) sugretinimo rezultatai. **(A)** MAK 1F5 epitopo sugretinimo su CMY-34 baltymo 1–50 ir 336–381 ar. regionais rezultatai. **(B)** MAK 1F5 epitopo sugretinimo su ACT tipo β -laktamazėmis pavyzdžiai. Sutampančios ar. pažymėtos pilkai, nesutampančios – geltonai. Pagal CMY-34 ar. seką *GenBank* nr. AFU25647.1, ACT-14 – AFU25647.1, ACT-5 – ACJ05689.1, ACT-7 – ACJ05688.1, ACT-24 – AHL39336.1, ACT-52 – AIX56560.1, ACT-83 – QIC04101.1, ACT-116 – AOL14308.1. Sugretinimas atliktas su *ChstA* O.

Ištyrus MAK 3F10, 5E2, 2C1 ir 5F7 prieš NDM-1 reaktyvumą su rekombinantinių β -laktamazių kolekcija, nustatyta, jog MAK 3F10 netiesioginės IFA tyrime kryžmiškai reagavo su rPDC-195 (3.13 pav. A). Tačiau antikūnų kryžminis reaktyvumas IB metodu nebuvo nustatytas. Galimai MAK 3F10 atpažinimui reikalinga erdvinė epitopo struktūra, kuri buvo suardyta rPDC-195 tiriant IB metodu. Šiame darbe nustatytas MAK 3F10 prieš NDM-1 epitopas (NDM-1 1–56 ar.) (3.1.4 skyrius, 3.3 lentelė, 3.7 pav.) buvo palygintas su PDC-195 ar. seka. Šio palyginio fragmentas pateiktas 3.14 A paveiksle. Atlikus sekų analizę, nustatyti keli PDC-195 baltymo regionai, pasižymintys NDM-1 1–56 ar. regionui identiškomis ar panašiomis ar. Galimai, šios sritys erdvinėje PDC-195 baltymo struktūroje formuoja konformacinį MAK 3F10 epitopą, kuris, kaip parodyta eksperimentiškai (3.13 pav. A), yra atpažįstamas MAK IFA tyrime, tačiau šios sąveikos nepavyko nustatyti IB metodu, kuomet PDC-195 baltymas yra denatūruotas ir redukuotas.



3.13 pav. Mak prieš NDM-1 ir CMY-34 kryžminio specifiškumo su rekombinantinėmis β -laktamazėmis tyrimo rezultatai. **(A)** Mak 3F10 prieš NDM-1 netiesioginės IFA rezultatai. Mak 9D2 prieš CMY-34 netiesioginės IFA **(B)** ir IB **(C)** rezultatai. Neigiamai kontrolei naudoti maltozę surišantis baltymas (MBP) ir *E. coli* BL21 lizatas. IFA atveju naudota papildoma neigiama kontrolė, kuomet vietoje Mak ant antigeno užneštas Mak skiedimo buf. tirpalas (PBST). Mak 9D2 kryžminis reaktyvumas su rPDC-195 **(C)** pažymėtas rodykle. M – baltymų molekulinės masės standartas.

Svarbu paminėti, kad MAK 3F10 epitopas NDM-1 baltyme taip pat sutampa su atrinktų potencialių porų MAK 2C1 ir 5F7 nustatytais epitopais (3.1.4 skyrius, 3.3 lentelė). Tačiau, atrinktoms poroms priklausančio MAK 5E2 atpažinimo srities nustatyti nepavyko. Bioinformatiniu *BLDB* įrankiu išanalizavus NDM-1 1–56 ar. regioną, nustatytas 100 % ar. sekos identiškumas su 43-imis NDM β -laktamazių variantais. 1 ar. nesutapimas

šiam regione nustatytas 14-oje NDM variantų ir 5 ar. skirtumai – viename NDM variante. Palyginio pavyzdys, kai sugretintos 1–56 ar. regione nei vieno, 1 arba 5 ar. skirtumus turinčių NDM baltymų sekos, pateiktas 3.14 B paveiksle.

A

```

PDC-195      61 KGEPHYFSYGLASKEDGRVTPETLFEIGSVSKTFTATLAGYALAQDKMRLDDRASQHWP 120
NDM-1_1-56   4 -----P NIMHPVAKLSTALAA----- 19
                *: . . . . *: . . . . *

PDC-195      121 ALQGSRFDGISLLDLATYTAGGLPLQFPDSVQKDAQIIRDYYRQWQPTYAPGSQRLYSNF 180
NDM-1_1-56   20 -----ALMLSGCMPGEIR----- 33
                * : * : * : *

PDC-195      181 S IGLFGYLAARSLGQPFERLMEQQVFPALGLEQTHLDVPEAALAQYAQGYGKDDRPLRVG 240
NDM-1_1-56   34 T IQQQME---TGDQRFGLVFRQLAP----- 56
                : ** : . * * * : : * :

```

B

```

NDM-1_1-56 1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALMLSGCMPGEIRPTIGQQMETGQDQ-----FGDLVFRQLAP56
NDM-6      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALMLSGCMPGEIRPTIGQQMETGQDQ-----FGDLVFRQLAP56
NDM-2      1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALMLSGCMAGEIRPTIGQQMETGQDQ-----FGDLVFRQLAP56
NDM-10     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALMLSGCMPGEISPTIDQQMETGQDQ-----FGDLVFRQLAP56
NDM-18     1 MELPNIMHPVAKLSTALAAALMLSGCMPGEIRPTIGQQMETGQDQFGDQRFGLVFRQLAP61
                ***** ** * . *****

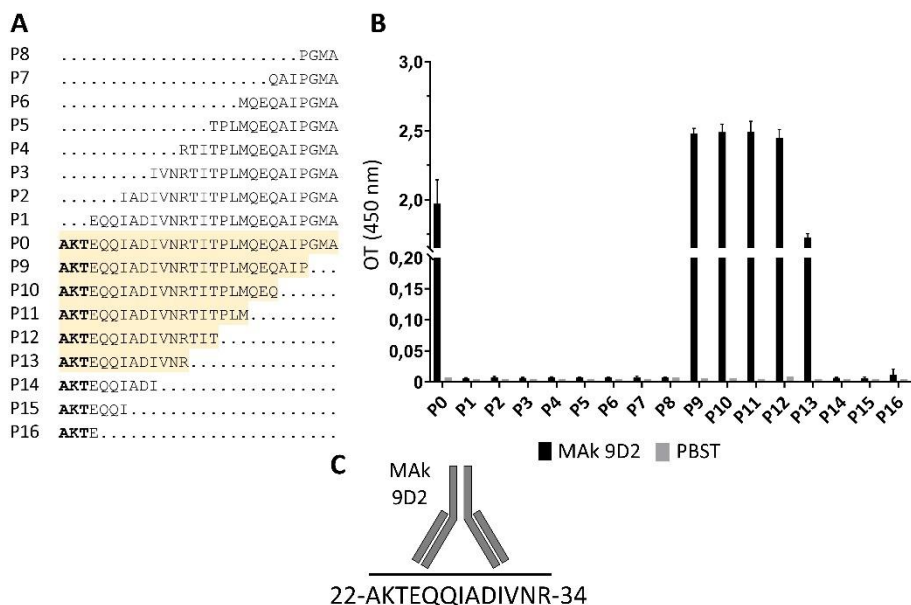
```

3.14 pav. MAk 3F10 prieš NDM-1 epitopo (1–56 ar.) NDM-1 baltyme sugretinimas ir analizė. (A) PDC-195 ir MAk 3F10 epitopo NDM-1 baltyme sugretinimo rezultatai. (B) MAk 3F10 epitopo NDM-1 baltyme sugretinimo su NDM tipo β-laktamazėmis rezultatų pavyzdžiai. Sutampančios ar. pažymėtos pilkai, nesutampančios – geltonai. Pagal PDC-195 ar. seką *GenBank* nr. AHH52937.1, NDM-1 – AHM26723.1, NDM-2 – AEA41876.1, NDM-6 – AEX08599.1, NDM-10 – AGT37351.1, NDM-18 – APZ75411.1. Sugretinimas atliktas su *Clustal O*.

IB ir netiesioginės IFA metodais ištyrus MAk 16F6, 20A6, 11H4 ir 8E7 prieš PDC-195 kryžminį specifiškumą, nustatyta, kad MAk 16F6 ir 11H4 netiesioginėje IFA kryžmiškai reagavo su rNDM-1, tačiau kryžminis reaktyvumas su denatūruotomis ir redukuotomis β-laktamazėmis, tarp jų ir rNDM-1, IB metodu nebuvo nustatytas. MAk tyrimo IB ir IFA rezultatai pateikti 4 priede. Paminėtina, jog MAk 16F6, 20A6, 11H4 ir 8E7 epitopų PDC-195 baltyme nustatyti nepavyko. Detaliau išanalizavus PDC-195 ir NDM-1 ar. sekas, nustatyta, jog šių baltymų ar. sekos identiškumas siekia 20 % (3.6 lentelė). Palyginus pilno ilgio PDC-195 ir NDM-1 ar. sekas, nustatyti 4–7 ar. ilgio NDM-1 regionai, kuriuos sudaro PDC-195 identiškų arba panašių ar. motyvai (4 priedas). Dalis šių segmentų galimai sudaro erdvinis MAk 16F6 ir 11H4 atpažinimo regionus NDM-1 baltymo molekulėje, todėl IFA metodu nustatyta silpna MAk sąveika su šia β-laktamaze.

Atlikus atrinktas poras sudarančių MAk 9D2, 2E11 ir 7H12 prieš CMY-34 kryžminio specifiškumo tyrimą IB ir netiesiogine IFA, abiem metodais nustatytas MAk 9D2 kryžminis reaktyvumas su rPDC-195 (3.13 pav. B, C). Paminėtina, kad CMY-34 ir PDC-195 ar. sekos tarpusavyje pasižymi 42,1 % ar. sekos panašumu (3.6 lentelė).

Atsižvelgiant į MAK 9D2 savybes ir jo potencialą diagnostinių sistemų kūrimui ir siekiant detaliau įvertinti šio MAK kryžminio reaktyvumo savybes, šiame darbe nustatytas MAK 9D2 epitopas, (CMY-34 22–49 ar. regionas (3.1.4 skyrius, 3.3 lentelė, 3.7 pav.)), buvo detaliau išanalizuotas. Pirmiausia, atliktas MAK 9D2 atpažinimo srities CMY-34 22–49 ar. regione detalizavimas. Šiuo tikslu MAK 9D2 reaktyvumas buvo tirtas IFA metodu su persidengiančiais sintetiniiais peptidais (P0–P16), apimančiais CMY-34 22–49 ar. sritį (3.15 pav. A, B). Tyrime P0 peptidas atitinko pilno ilgio CMY-34 22–49 ar. regioną. Atlikus šį testavimą, identifikuotas MAK 9D2 reaktyvumas su P0 ir P9–P13 peptidais (3.15 pav. B). Remiantis šiais rezultatais, nustatyta, kad MAK 9D2 epitopą sudaro 13 ar. ilgio segmentas, kuris yra lokalizuotas CMY-34 22–34 ar. regione (3.15 pav. C).



3.15 pav. MAK 9D2 prieš CMY-34 epitopo patikslinimas, naudojant sintetinius 22–49 ar. CMY-34 regioną apimančius peptidus (P0–P16). **(A)** Epitopo nustatymui naudotų sintetinių peptidų (P0–P16) ar. sekos. P0 peptidas atitinka anksčiau nustatytą MAK 9D2 22–49 ar. atpažinimo sritį CMY-34 baltyme. Peptidai, su kuriais nustatytas MAK 9D2 reaktyvumas, pažymėti geltonai. **(B)** MAK 9D2 testavimo su sintetiniiais peptidais IFA rezultatai. Kaip neigiama kontrolė testuoti šulinėliai be MAK (PBST). Pateikti trijų pakartojimų vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. **(C)** Patikslinto MAK 9D2 epitopo ar. seka. Patikslintas epitopas lokalizuotas CMY-34 22–34 ar. regione.

Atlikus išsamią patikslinto MAK 9D2 epitopo analizę *BLDB* įrankiu, nustatytas 100 % ar. identiškumas 173-ims iš 181-os identifikuotos ir patvirtintos CMY šeimos β -laktamazės, įskaitant ir MAK apibūdinimo darbuose testuotą CMY-4 variantą. Likusios CMY šeimai priklausančios β -laktamazės pasižymėjo 1 arba 2 ar. skirtumais šiame regione (3.16 pav. A). MAK 9D2 epitopą palyginus su kryžmiškai reagavusio PDC-195 baltymo ar.

seka, identifiukuotas PDC-195 152–164 ar. regionas, kuriame išsidėstę CMY-34 baltymui identiški 1 arba 2 ar. segmentai (3.16 pav. B).

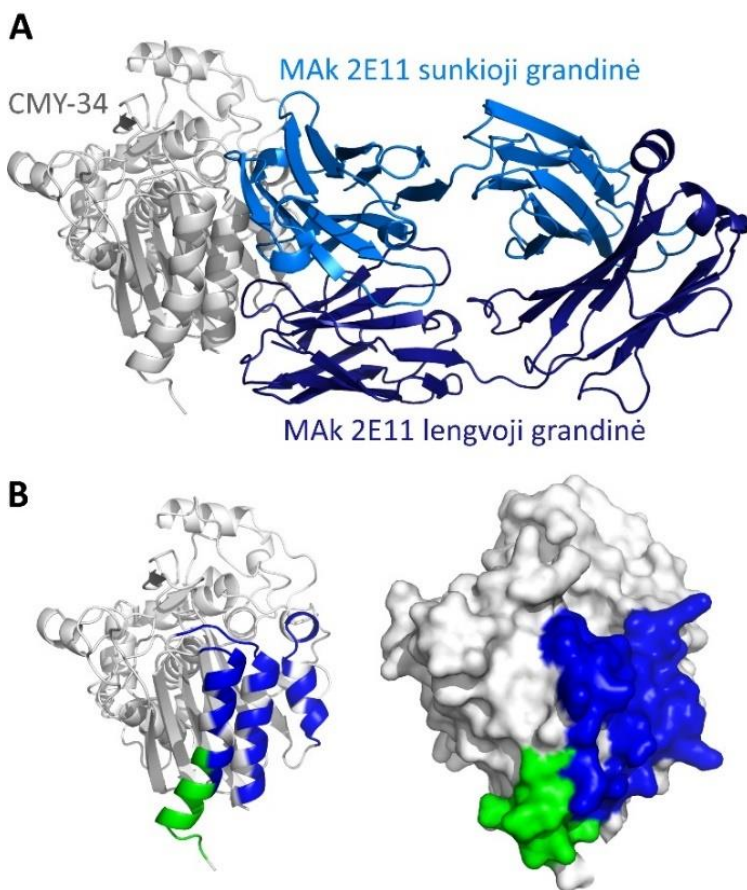
Atlikus detalesnę MAK 9D2 prieš CMY-34 analizę, nuspręsta išsamiau išanalizuoti kartu su šiuo antikūnu poroje atrinkto MAK 2E11 savybes. Nustatyta, kad šis MAK nepasižymi kryžminiu reaktyvumu su tirtomis rekombinantinėmis β -laktamazėmis, naudojant IFA ir IB metodus. Šio MAK atpažinimo srities CMY-34 molekulėje eksperimentiškai identifikuoti nepavyko. Todėl atliktas šio antikūno epitopo prognozavimas, pasitelkiant bioinformatinius metodus. Šiuo tikslu, bioinformatiniais modeliavimo metodais buvo identifikuoti potencialūs MAK 2E11 ir CMY-34 sąveikos regionai. Modeliavimui buvo panaudotos šiame darbe nustatytos MAK 2E11 sunkiosios (VH) ir lengvosios (VL) grandinių variabiliosios sekos (VH ir VL nustatymas aprašytas 3.1.9 skyriuje). Modeliavimo tikslais VH ir VL domenai buvo sujungti su pelės IgG2a klasės antikūno Fab dalimi (be variabiliųjų domenų). Naudojant standartinį *AlphaFold2* protokolą, buvo sugeneruota daugiau nei 6000 MAK-CMY-34 sąveikos modelių, iš kurių 20 turėjo aukštą patikimumo įvertį, o 19 modelių iš atrinktų 20-ies pasižymėjo dideliu panašumu.

A		GenBank nr.
CMY-179	22-SKTEQHIADIVNR-34	MBC6501781.1
CMY-102	22-AKTEQQIADIVNC-34	AHA80103.1
CMY-104	22-AKTEQQIADIVNH-34	AGR82311.1
CMY-80	22-AKTEPQIADIVNR-34	AFK73449.1
CMY-96	22-AKTEPQIADIVNR-34	AFZ85212.1
CMY-155	22-AKTEPQIADIVNR-34	ALF62843.1
CMY-71	22-AKTEQQIADTVNR-34	AFK08538.1
CMY-34	22-AKTEQQIADIVNR-34	ABN51006.1
: *** : *** **		
B		GenBank nr.
CMY-34	22-AKTEQQIADIVNR-34	ABN51006.1
CMY-4	22-AKTEQQIADIVNR-34	KSY23356.1
PDC-195	152-QKDQAQIRDYYRQ-164	AHH52937.1
* : ** * .:		

3.16 pav. β -laktamazių ar. sekų palyginys su MAK 9D2 prieš CMY-34 epitopu (CMY-34 22–34 ar.). **(A)** CMY tipo β -laktamazių, kurių 22–34 ar. regione identifikuoti sekos skirtumai, palyginys. Nesutampančios ar. pažymėtos geltonai. **(B)** MAK 9D2 epitopo ir kryžmiškai reaguojančių CMY-4 bei PDC-195 β -laktamazių palyginys. Sutampančios ar. pažymėtos geltonai. Sugretinimas atliktas su *Clustal O*.

Gauti modeliavimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog jie yra tinkami MAK ir CMY-34 sąveikos nustatymui, todėl, remiantis baltymų sąveikos modelių parametrais, detalesnei analizei buvo pasirinktas patikimiausias modelis (3.17 pav. A). Remiantis juo, nustatyta, kad tikėtinas MAK 2E11 epitopas yra konformacinis ir yra sudarytas iš trumpų, erdviškai greta

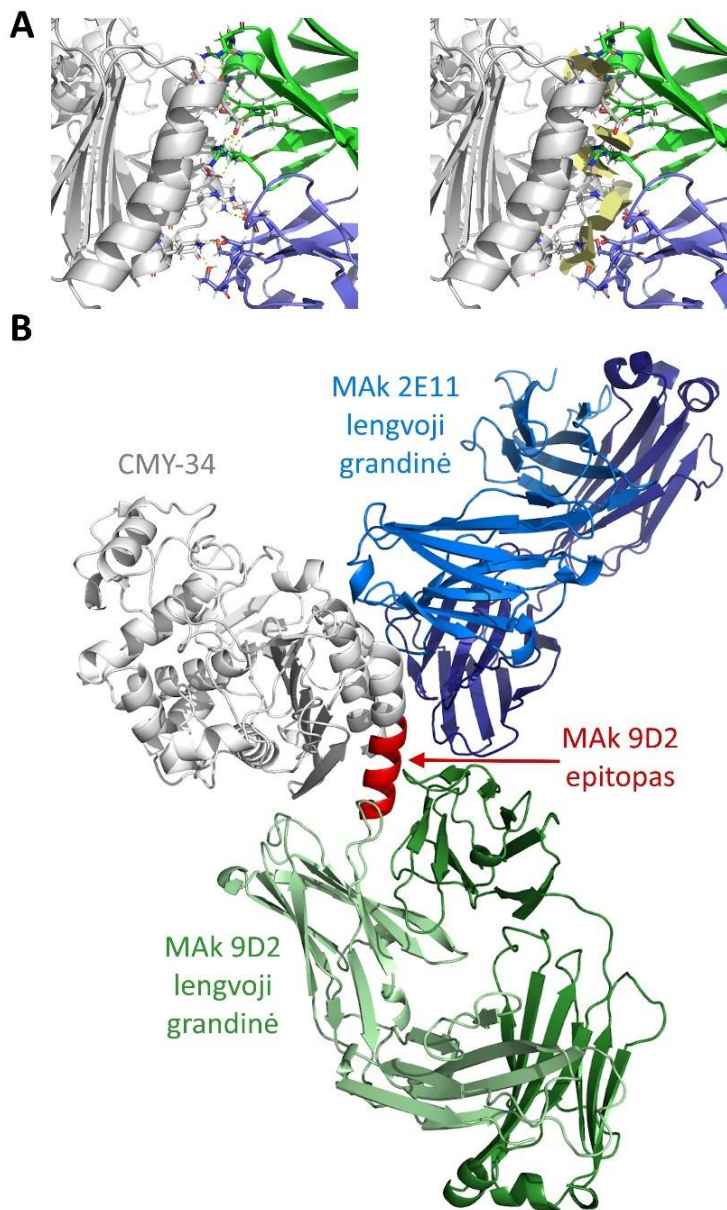
išsidėsčiusių CMY-34 baltymo fragmentų, esančių 38–44, 299–311 ir 362–379 ar. regionuose (3.17 pav. B). Antikūno variabiliųjų sričių ir CMY-34 sąveikos srityse identifikuota daug vandenilinių ryšių ir keli druskų tilteliai, kurie papildomai parodo tikėtiną epitopo poziciją (3.18 pav. A).



3.17 pav. *AlphaFold2* sugeneruotas CMY-34 ir MAK 2E11 sąveikos modelis (**A**) Nustatytas patikimiausias CMY-34 (žymima pilkai, vaizduojamas baltymas be signalinės 1–20 ar. sekos) ir MAK 2E11 (žymima mėlynai) modelis. (**B**) MAK 9D2 (nustatytas eksperimentiškai, žymima žaliai) ir MAK 2E11 (prognozuojamas, žymimas mėlynai) epitopų CMY-34 baltymo molekulėje (be signalinės 1–20 ar. sekos) vizualizacija.

Taip pat pastebėta, kad erdvinis spėjamo MAK 2E11 epitopo išsidėstymas CMY-34 baltyme yra greta eksperimentiškai nustatyto MAK 9D2 epitopo (3.17 pav. B). Šiame darbe konkurencinės IFA metodu buvo patvirtinta, kad šie MAK nekonkuruoja tarpusavyje dėl prisijungimo prie CMY-34, todėl 3.17 pav. B nurodytas epitopų išsidėstymas neprieštarauja eksperimentiniams rezultatams. Tai buvo papildomai patvirtinta su *AlphaFold3* sugeneruotu CMY-34-MAK 9D2 ir 2E11 sąveikos modeliu (3.18 pav. B). Juo parodyta, jog

MAk 9D2 jungiasi prie CMY-34 skirtingoje nei MAk 2E11 sąveikos srityje, o pastaroji atitinka eksperimentiškai nustatytą MAk 9D2 epitopą (3.18 pav. B). Modeliavimą atliko dr. Justas Dapkūnas (VU GMC BTI).



3.18 pav. MAk 2E11 ir CMY-34 sąveikos modeliai. **(A)** MAk 2E11 ir CMY-34 sąveikos kontaktinės sritys. Pavaizduoti sąveikoje dalyvaujantys vandeniliniai ryšiai (kairėje) ir kontaktinės sritys (dešinėje). **(B)** Su *AlphaFold3* sugeneruotas CMY-34-MAk 2E11 ir 9D2 modelis. CMY-34 baltymas vaizduojamas be signalinės sekos (1–20 ar.). Eksperimentiškai nustatytas MAk 9D2 epitopas nuspalvintas raudonai.

Atlikus spėjamo MAK 2E11 epitopo sugretinimą su CMY šeimos β -laktamazėmis, nustatyta didelė ar. sekos homologija daugeliui šiai šeimai priklausančių CMY baltymų. Nustatyta, kad 38–44 ar. CMY-34 regionas yra 100 % identiškas visoms CMY šeimai priklausančioms β -laktamazėms. Palyginus 299–311 ar. epitopo fragmentą, nustatyti 1 arba 2 ar. skirtumai 19-oje CMY baltymų (3.7 lentelė). Atlikus 362–379 ar. regiono analizę, 48-iems CMY fermentams buvo būdingas 1-os ar. nesutapimas ir 5-iems fermentams – 2-jų ar. nesutapimai šiame segmente.

3.7 lentelė. Spėjamo MAK 2E11 epitopo segmento (299–311 ar.) CMY-34 baltyme palyginimas su CMY šeimos β -laktamazėmis

CMY β -laktamazė	CMY-34 299–311 ar. regiono palyginimas ^a	GenBank nr.
CMY-34	299-KADSIINGSDSKV-311	ABN51006.1
CMY-20, CMY-28, CMY-140, CMY-146	299-KADSIINGSDN ^Y KV-311	AAX58682.2, ABQ51091.1, ANJ78051.1, APD79117.2
CMY-133	299-KADSIINGN ^D DSKV-311	AKZ20821.1
CMY-56	299-K ^T DSIINGSDSKV-311	ADT91162.1
CMY-70, CMY-74, CMY-82, CMY-83, CMY-93, CMY-100, CMY-101, CMY-125, CMY-137, CMY-179, CMY-182	299-KADSI ^I SGSDSKV-311	KKC62625.1, AFU25632.1, AHL39324.1, AFU25638.1, AHM76768.1, AHA80101.1, EOQ33708.1, AKO62862.1, WP_053390271.1, MBC6501781.1, AUV24482.1
CMY-157	299-KAD ^T IINGSDSK ^I -311	ASW32315.1
CMY-18	299-KADSI ^I NGNGSDSKV-313	AAU95778.1

^aSu CMY-34 nesutampančių ar. pozicijos pažymėtos geltonai

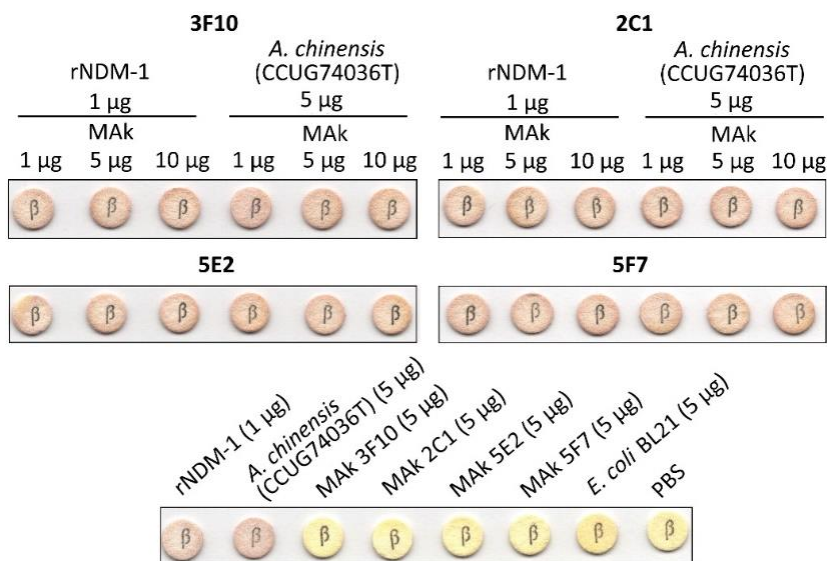
Grįžtant prie atrinktų porų MAK prieš CMY-34, paminėtina, jog šioms poroms priklausančio MAK 7H12 atpažinimo sities šiame darbe nustatyti nepavyko, todėl potencialaus kryžminio reaktyvumo su CMY baltymais analizė nebuvo atlikta.

3.1.8. MAK neutralizuojančių savybių tyrimas

Šiame darbų etape, išsamiai apibūdinant MAK savybes, siekta įvertinti atrinktų MAK gebėjimą neutralizuoti β -laktamazių fermentinį aktyvumą. Ankstesnių darbų metų parodyta, jog šiame darbe susintetintos rekombinantinės ir bakterijų lizatuose esančios natyvos β -laktamazės pasižymi fermentiniu aktyvumu (3.1.1 ir 3.1.6 skyriai). Todėl, atliekant neutralizuojančių savybių tyrimą, MAK buvo inkubuoti su rekombinantinėmis β -laktamazėmis arba su natyvias β -laktamazes produkuojančių bakterijų lizatais. Po inkubacijos, MAK ir rekombinantinės β -laktamazės arba bakterijų lizato mišiniai testuoti *BL Cefinase* testu. MAK 5E2, 3F10, 2C1 ir 5F7 prieš NDM-1 ir MAK 9D2, 2E11 ir 7H12 prieš CMY-34 inkubuoti atitinkamai su rNDM-1 ir rCMY-34 baltymais. MAK prieš CMY-34 papildomai testuoti su CMY-34 produkuojančio *C. portucalensis* izoliato (3826Z08) lizatu, o MAK prieš NDM-1 – su NDM-1 teigiamu *A. chinensis* (CCUG74036T) lizatu. MAK prieš NDM-1 tyrimo *BL Cefinase* testu rezultatų pavyzdys pateiktas 3.19

paveiksle, MAK prieš CMY-34 – 5 priede. Lyginant su antigeno ir lizato kontrolėmis, kai baltymai su MAK neinkubuoti, nustatyta, jog MAK prisijungimas prie β -laktamazių neslopina jų fermentinio aktyvumo – hidrolizuotas nitrocefinas nudažo testavimo diskus raudona spalva.

MAK 1F5, 7B6 ir 6H3 prieš ACT-14 ir MAK 16F6, 20A6, 11H4 ir 8E7 prieš PDC-195 atitinkamai inkubuoti su rACT-14 ir rPDC-195 baltymais (bakterijų lizatai netestuoti). Lyginant su antigeno kontrole be MAK, nustatyta, kad MAK sąveika su antigenu neblokuoja jo fermentinio aktyvumo – rACT-14 ir rPDC-195 hidrolizuoja nitrocefina, vizualiai stebima raudona disko spalva. MAK prieš ACT-14 ir PDC-195 tyrimo rezultatai pateikti 5 priede.



3.19 pav. MAK 3F10, 5E2, 2C1 ir 5F7 prieš NDM-1 neutralizuojančių savybių tyrimo *BL Cefinase* testu rezultatai. Testuotas rNDM-1 ir NDM-1 produkuojančio *A. chinensis* lizato fermentinis aktyvumas po inkubacijos su kiekvienu iš MAK. Teigiamai kontrolei testuoti rNDM-1 ir *A. chinensis* lizatas be MAK. Kaip neigiama kontrolė testuoti MAK be β -laktamazių, *E. coli* BL21 lizatas ir mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBS). Raudona spalva nurodo nitrocefino hidrolizę (teigiamas rezultatas), geltona – hidrolizė nevyksta (neigiamas rezultatas).

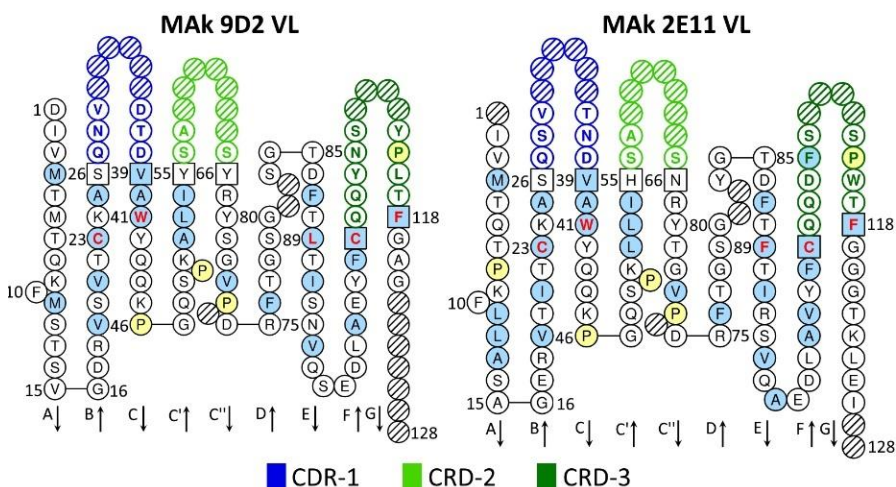
Taigi, nustatyta, jog nė vienas iš atrinktų MAK prieš ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34 neslopino β -laktamazių fermentinio aktyvumo, kai testavimas atliktas *BL Cefinase* testu.

3.1.9. MAK variabiliųjų sričių nustatymas

Tęsiant MAK apibūdinimo darbus, nuspręsta pasirinkti perspektyviausią bei detalai apibūdintą MAK porą ir atlikti šių antikūnų variabiliųjų sričių sekų analizę. Šiam tyrimui pasirinkta MAK 9D2 ir 2E11 pora prieš CMY-34. Šie

MAk pasižymi reaktyvumu su natyvia CMY-34, jų epitopai yra žinomi, o atlikus išsamią epitopų analizę, įvertintas tikėtinais platus MAk reaktyvumas su daugeliu CMY šeimos β -laktamazių.

Šio darbo metu buvo nustatyti MAk 9D2 ir 2E11 variabilieji sunkiosios (angl., *variable heavy chain*, VH) ir lengvosios (angl., *variable light chain*, VL) grandinių regionai. Šiuo tikslu, iš hibridomų 9D2 ir 2E11 išskirta suminė RNR, kuri toliau panaudota kopijinės DNR sintezei. VH ir VL koduojančios sekos pagausintos PGR metodu su anksčiau aprašytais [127], [128] pelės imunoglobulinų variabiliesiems regionams specifiskais pradmenimis (2.1.8 skyrius, 2.2 lentelė). Pagausinti PGR produktai klonuoti, nusekvenuoti ir išanalizuoti su *IgBlast* ir *IMGT/V-QUEST* įrankiais [149], [150], [151]. Šių įrankių pagalba buvo nustatytos VH ir VL koduojančios ar. sekos ir identifikuotos jose išsidėsčiusios hipervariabiliosios sritys (angl., *complementarity-determining regions* 1–3, CDR1–3). Nustatytų MAk 9D2 ir 2E11 VL regionų pavyzdžiai pateikti 3.20 paveiksle. Nustatytos MAk 9D2 ir 2E11 sekos pateiktos į ABCD duomenų bazę [154] (<https://web.expasy.org/abcd/>), joms suteikiant atitinkamai ABCD_BD767 ir ABCD_BD768 identifikacijos numerius.



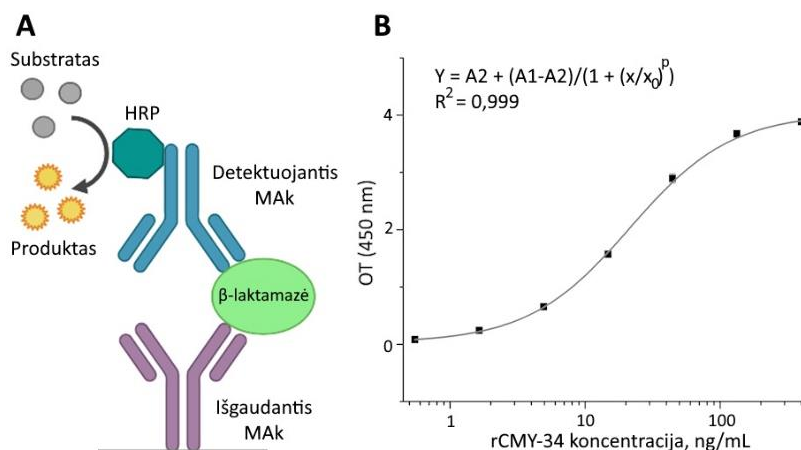
3.20 pav. MAk 9D2 ir 2E11 prieš CMY-34 VL regionų vizualizacija. Žydros spalvos pozicijos nurodo hidrofobines ar. arba triptofaną (W). Raudonos spalvos raidėmis žymimos penkios konservatyvios variabiliojo domeno pozicijos. Inkarinės pozicijos žymimos kvadratais. Užbrūkšniuotos pozicijos žymi tarpus, remiantis *IMGT* būdingu variabiliojo domeno išdėstymu. Geltonos spalvos pozicijos žymi proliną (P). Rodyklės nurodo β -klostes ir jų kryptį. Sekos analizuotos su *IMGT/DomainGapAlign* įrankiu [155], [156], vizualizacija sudaryta su *IMGT/Collier-de-Perles* [152], [153].

Taigi, šie variabiliųjų sričių nustatymo rezultatai patvirtina MAk 9D2 ir 2E11 klonų skirtumus, kadangi, palyginus nustatytų regionų sekas, identifikuoti ar. skirtumai už antigeno atpažinimą atsakinguose CDR regionuose.

3.1.10. MAK taikymas dviepitopės IFA kūrimui

Atrinktos apibūdintų MAK prieš ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34 poros (3.1.5 skyrius) taikytos imunologinių analitinių sistemų, skirtų β -laktamazių nustatymui bakterijų izoliatuose, kūrimui. Pirmajame žingsnyje, taikant dviepitopės IFA metodą, siekta ištirti MAK porų gebėjimą nustatyti rekombinantines arba natyvias β -laktamazes mėginiuose ir toliau šiuos MAK išbandyti įvairiems analitiniams metodams.

Dviepitopė IFA skirta kiekybiniam tiriamosios analitės nustatymui mėginiuose, sistemoje naudojant du tarpusavyje dėl prisijungimo prie analitės nekonkuruojančius MAK ar MAK ir polikloninių antikūnų kombinacijas. Ant kietos fazės imobilizuoti išgaudantieji MAK suriša analizę, pavyzdžiui, β -laktamazę, o detekcine žyme, pavyzdžiui HRP, žymėti MAK (MAK-HRP) jungiasi prie MAK-analitės komplekso ir atlieka nustatymo funkciją sistemoje (3.21 pav. A).



3.21 pav. Dviepitopės IFA schematinis vaiztas (A) ir optimizuotos dviepitopės IFA, skirtos CMY β -laktamazių nustatymui, kalibracinė kreivė (B). HRP – krienų peroksidazė. Paveikslas A sukurtas su *BioRender.com*.

Šiame darbe dviepitopėje IFA buvo išbandyti atrinktų MAK deriniai, kai vienas iš porą sudarančių antikūnų atlieka išgaudymo, o kitas – detekcinę funkciją, ir atvirkščiai. MAK poros testuotos ir IFA sistemos optimizuotos, naudojant rekombinantines β -laktamazes. Remiantis IFA rezultatais, buvo atrinktos tos MAK kombinacijos, kurios gebėjo aptikti antigeną bei pasižymėjo didžiausiu jautrumu. Pagal tai tolesniam dviepitopės IFA sistemų optimizavimui buvo atrinktos šios poros: ACT β -laktamazių nustatymui atrinkti MAK 1F5 ir 7B6-HRP, NDM detekcijai – MAK 3F10 ir 5E2-HRP, PDC nustatymui – 20A6 ir 16F6-HRP ir CMY detekcijai – MAK 2E11 ir 9D2-HRP (3.8 lentelė).

Siekiant padidinti ACT, NDM, PDC ir CMY nustatymo dviepitopės IFA sistemų jautrumą, atliktas jų optimizavimas, išbandant įvairias skirtingų sistemos parametrų sąlygas, kurios nurodytos 3.8 lentelėje. IFA optimizavimo rezultatai analizuoti *OriginPro* programa, pagal kuriuos, taikant logistinių kreivės modelį, nubaižytos kalibracinės kreivės. Optimizuotos CMY sistemos kalibracinės kreivės pavyzdys pateiktas 3.21 B paveiksle. Remiantis rezultatais, buvo atrinktos sąlygos, kurioms esant dviepitopės IFA sistemų jautrumas, atitinkamai testuojant rACT-14, rNDM-1, rPDC-195 ar rCMY-34 serijinius skiedimus, buvo didžiausias (3.8 lentelė). Po optimizavimo ACT nustatymui skirtos dviepitopės IFA jautrumas siekė 56 pg/mL, NDM sistemos – 23 pg/mL, PDC sistemos – 17 pg/mL ir CMY – 43 pg/mL antigeno.

3.8 lentelė. Optimizuotos dviepitopės IFA sistemos, skirtos ACT, NDM, PDC ir CMY β -laktamazių nustatymui ir optimizavimui išbandytos sistemos sąlygos

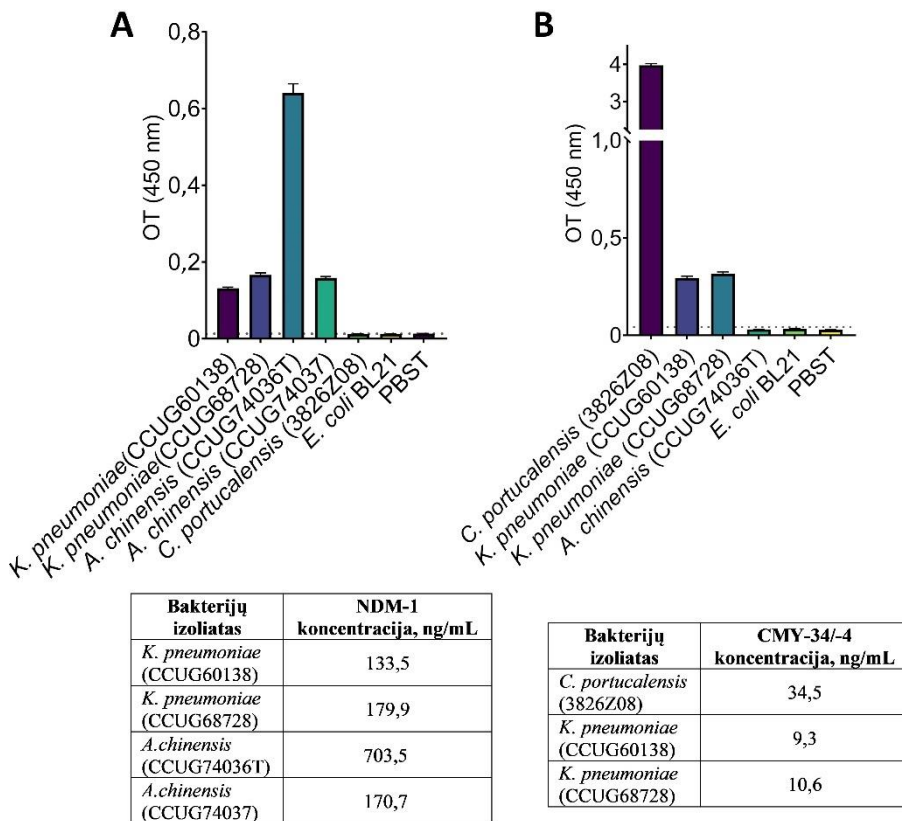
Sistemos parametras	Išbandytos sąlygos	Atrinktos sąlygos			
		ACT sistema	NDM sistema	PDC sistema	CMY sistema
Išgaudantis MAK	Skirtingi MAK klonai	1F5	3F10	20A6	2E11
Detektuojantis MAK-HRP	Skirtingi MAK klonai	7B6	5E2	16F6	9D2
IFA plokštelė (pagal baltymų adsorbciją)	1. 600–650 ng/cm ² (<i>MaxiSorp, Nunc</i>) 2. 250 ng/cm ² (<i>Nerbe plus</i>)	<i>MaxiSorp (Nunc)</i>			
Imobilizacijos tirpalas	1. Imobilizacijos buf. tirpalas 2. PBS	Imobilizacijos buf. tirpalas			
Blokavimo tirpalas	1. PBS su 2 % BSA 2. PBS su 4 % pieno miltelių ir 0,05 % <i>Tween-20</i> 3. <i>Roti®-Block</i>	PBS su 4 % pieno miltelių ir 0,05 % <i>Tween-20</i>	<i>Roti®-Block</i>		
Imobilizuoto MAK koncentracija	1. 2,5 µg/mL 2. 5 µg/mL 3. 10 µg/mL	2,5 µg/mL			
MAK-HRP skiedimas	1. 150 x 2. 500 x 3. 1000 x 4. 2000 x	500 x	150 x	1000 x	150 x

BSA – jaučio serumo albuminas; MAK-HRP – krienų peroksidaze žymėtas MAK

Kitame tyrimų etape siekta įvertinti, ar optimizuotos dviepitopės IFA geba aptikti ir kiekybiškai nustatyti natyvias β -laktamazes bakterijų izoliatų lizatuose. Šiame etape su bakterijų lizatais, kurių baltymų koncentracija yra žinoma, testuotos NDM ir CMY sistemos (3.22 pav.). ACT ir PDC sistemos su natyvias β -laktamazes produkuojančių bakterijų izoliatais nebuvo testuotos.

NDM sistema buvo tirti NDM-1 produkuojančių *K. pneumoniae* (CCUG60138, CCUG68728) ir *A. chinensis* (CCUG74036T, CCUG74037)

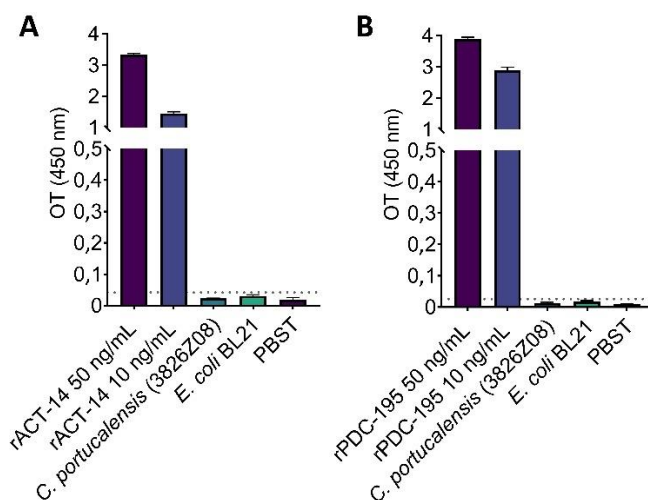
lizatai. CMY-34 produkuojančio *C. portucalensis* (2826Z08) ir *E. coli* BL21 kamieno lizatai naudoti kaip neigiama kontrolė. Tuo tarpu CMY sistemos testavimui naudoti CMY-34 ir CMY-4 variantus produkuojančių *C. portucalensis* (3826Z08) ir *K. pneumoniae* (CCUG60138, CCUG68728) lizatai atitinkamai, o neigiamai kontrolei naudoti NDM-1 produkuojančio *A. chinensis* (CCUG74036T) ir *E. coli* BL21 lizatai.



3.22 pav. Dviepitopės IFA sistemų taikymo natyvių β -laktamazių nustatymui bakterijų lizatuose rezultatai. Grafikuose pavaizduotos dviepitopės IFA optinio tankio (OT) reikšmės, kai testuota 555 μ g/mL lizato baltymų. Lentelėse nurodytos nustatytos β -laktamazių koncentracijos lizatuose. **(A)** NDM sistema testuoti NDM-1 teigiami *K. pneumoniae* ir *A. chinensis* lizatai. CMY-34 teigiamo *C. portucalensis* ir *E. coli* BL21 lizatai bei mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBST) naudoti neigiamai kontrolei. **(B)** CMY sistema testuoti CMY-34 ir CMY-4 teigiami *C. portucalensis* ir *K. pneumoniae* lizatai. NDM-1 produkuojančio *A. chinensis* ir *E. coli* BL21 lizatai bei PBST naudoti kaip neigiama kontrolė. Pateikti OT reikšmių vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. Punktyrine linija žymimos NDM ir CMY sistemų ribinės reikšmės – 0,013 ir 0,043 atitinkamai.

Lizatų testavimas patvirtino sukurtų analitinių sistemų veiksmingumą. NDM sistema buvo nustatyti visi NDM-1 teigiami, o CMY sistema – visi CMY-34 ir CMY-4 teigiami izoliatai. Dviepitopės IFA rezultatai, kai testuotų lizatų baltymų koncentracija siekė 555 µg/mL pateikti 3.22 paveiksle. Esant 555 µg/mL lizato baltymų koncentracijai, NDM sistema nustatė nuo 133,5 iki 703,5 ng/mL NDM-1 baltymo (3.22 pav. A). CMY sistema nustatytų CMY-34 ir CMY-4 β-laktamazių koncentracija siekė nuo 9,3 iki 34,5 ng/mL (3.22 pav. B).

Siekiant įvertinti optimizuotas ACT ir PDC sistemas, į *E. coli* BL21 kamieno lizatą buvo įnešta rACT-14 ir rPDC-195 baltymų. Sistemomis buvo testuota 555 µg/mL lizato baltymų, atitinkamai praturtintų 50 ir 10 ng/mL rACT-14 ar rPDC-195 β-laktamazėmis. CMY-34 produkuojančio *C. portucalensis* ir *E. coli* BL21 lizatai naudoti kaip neigiama kontrolė (3.23 pav.).



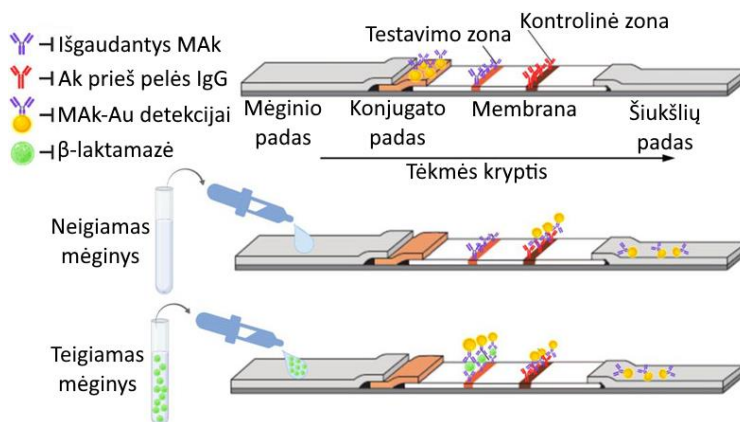
3.23 pav. ACT ir PDC dviepitopės IFA sistemų testavimas su rekombinantinėmis β-laktamazėmis praturtintu *E. coli* BL21 lizatu. Pavaizduotos dviepitopės IFA sistemomos optinio tankio (OT) reikšmės, kai testuota 555 µg/mL *E. coli* BL21 lizato baltymų su 50 ir 10 ng/mL rACT-14 arba rPDC-195 atitinkamai. Kaip neigiama kontrolė testuota 555 µg/mL CMY-34 produkuojančio *C. portucalensis* ir *E. coli* BL21 lizato baltymų. Punktyrine linija žymimos ACT ir PDC sistemų ribinės reikšmės – 0,042 ir 0,026 atitinkamai.

Nustatyta, kad ACT ir PDC sistemos gebėjo aptikti rACT-14 ir rPDC-195 baltymus lizatuose, kai β-laktamazių koncentracija siekė 50 ir 10 ng/mL. Nespecifinė MAK sąveika su *C. portucalensis* ir *E. coli* lizato baltymais nebuvo stebima – tai patvirtina analinių sistemų specifiškumą. Detalesniam šių sistemų apibūdinimui ateityje jas reikėtų išbandyti su natyviais ACT ir PDC β-laktamazės produkuojančių bakterijų izoliatais.

Įvertinus, jog atrinktos MAK prieš β -laktamazes poros dviepitopės IFA formate gerba nustatyti β -laktamazes bakterijų lizatuose, toliau šios poros išbandytos kituose imunologinių detekcinių metodų formatuose.

3.1.11. MAK taikymas imunochromatografinio testo kūrimui

Dviepitopės IFA formatu įvertinus ir atrinkus β -laktamazes mėginiuose išgaudančių ir detektuojančių MAK poras, toliau šie MAK taikyti imunochromatografinio testo (angl., *lateral flow immunoassay*), dar kitaip vadinamo greituoju testu, kūrimui. Šie testai yra skirti greitam kokybiniam analitės nustatymui mėginiuose ir diagnostikoje plačiai naudojami ligos sukėlėjų ar žmogaus organizme susidariusių jiems specifinių antikūnų, nustatymui. Greitojo testo veikimo principas toks: mėginyje esanti analizė yra atpažįstama detekcine žyme, pavyzdžiui, aukso nanodalelėmis, žymėtų antikūnų (3.24 pav.). Susidarę analizės ir detektuojančių antikūnų kompleksai dėl kapiliarinių jėgų migruoja membrana, ant kurios paviršiaus imobilizuotos išgaudančių antikūnų juostos ar taškai. Dėl išgaudančių antikūnų sąveikos su analizės-detektuojančių antikūnų kompleksais, testavimo zonoje vizualiai matome teigiamą rezultatą. Su analite nesusijungę pertekliniai detektuojantys antikūnai yra išgaudomi kontrolinėje zonoje, imobilizuotų jiems specifinių antikūnų. Ši zona nurodo, jog testas veikia. Tyrimo rezultatai paaiškėja per 5–15 min [157].



3.24 pav. Greitojo testo, skirto β -laktamazių nustatymui, schematinis vaizdas. MAk-Au – aukso nanodalelėmis žymėti detektuojantis MAK, Ak – antikūnai. Modifikuota pagal [157].

Šiame darbe greitojo testo kūrimui naudotos optimizuotos IFA sistemoms (3.1.10 skyrius) atrinktos MAK poros: MAK 1F5 ir 7B6 prieš ACT-14, MAK 3F10 ir 5E2 prieš NDM-1, MAK 20A6 ir 16F6 prieš PDC-195 bei

MAk 2E11 ir 9D2 prieš CMY-34. Išgaudantieji IFA sistemų MAk greitajame teste taip pat naudoti antigeno išgaudymui, o detektuojantys MAk – detekcijai.

Konstruojant greitąjį testą, pirmiausiai detektuojantys MAk buvo kovalentiškai pažymėti detekcine žyme – 40 nm skersmens aukso nanodalelėmis. Kitame žingsnyje atliktas atskirų testo komponentų ir sąlygų optimizavimas, testavimui naudojant rekombinantines β -laktamazes. Atrinkti tie testo komponentai ir sąlygos, kuriems esant pasiektas didžiausias testo jautrumas. Išbandytos ir atrinktos analizės sąlygos apibendrintos 3.9 lentelėje.

3.9 lentelė. Išbandyti ir atrinkti greitojo testo, skirto β -laktamazių nustatymui, parametrai

Teste naudoti MAk prieš:			
	ACT-14	NDM-1	CMY-34
Išgaudantis MAk	1F5	3F10	20A6
Detektuojantis MAk-Au	7B6	5E2	16F6
			9D2
Sistemos parametras	Išbandytos sąlygos ^a		Atrinktos sąlygos
MAk-Au skiedimas	1. 10 x 2. 15 x 3. 20 x 4. 25 x 5. 30 x		10 x
Imobilizuotų MAk koncentracija	1. 0,3 mg/mL 2. 0,5 mg/mL 3. 1 mg/mL		1 mg/mL
Membrana	1. CN95 2. Vivid120 3. MDI70 4. MDI90 5. MDI150		Vivid120
Konjugato padas	1. Stiklo pluošto 8950 2. Stiklo pluošto 8950 3. Poliesterio 6613 4. Poliesterio 6614		Poliesterio 6613
Mėginio padas	1. Kraują atskiriantis 1660 2. Kraują atskiriantis 1662 3. Medvilninis 1281		Medvilninis 1281
Mėginio pado paruošimas	1. Blokuotas 2. Neblokuotas		Blokuotas
Mėginių užnešimo tirpalas	1. PBS, 0,5 % BSA, 0,5 % Tween-20 su 0,5 ar 1 % CHAPS 2. Tris-HCl pH 8, 0,15 M NaCl, 0,5 % Tween-20, 0,1 % BSA su 0,5 ar 1 % CHAPS 3. Užnešimo tirpalas kartu su mėginio kaitinimu (100 °C 10 min)		PBS, 0,5 % BSA, 0,5 % Tween-20 su 1 % CHAPS (be kaitinimo)

^aNaudoti *Lateral Flow Material Starter Kit (nanoComposix)* rinkinio komponentai
 MAk-Au – su aukso nanodalelėmis konjuguotas MAk; BSA – jaučio serumo albuminas; CHAPS – detergentas

Atrinkus testo komponentus, nuspręsta sukonstruoti ir išbandyti du greitojo testo variantus – multipleksinį, skirtą ACT, NDM, PDC ir CMY tipo

β -laktamazių nustatymui, ir supaprastintą testo variantą, kuriuo būtų nustatomos tik vienos šeimos β -laktamazės. Šio testo atveju pasirinkta sukonstruoti CMY β -laktamazių nustatymo sistemą, kadangi šiame darbe MAK prieš CMY-34 buvo detalai apibūdinti ir pasižymėjo plačiu reaktyvumu CMY šeimos β -laktamazėms. Konstruojant greituosius testus, pirmiausiai buvo paruoštos testo membranos. Automatizuotu prietaisu ant membranos užneštos kontrolinės ir testavimo linijos, jas formuojant iš nedidelio tūrio lašų su antikūnais. Testavimo zonoje užnešti išgaudantys β -laktamazėms specifiški MAK, o kontrolinėje zonoje – ožkos polikloniniai antikūnai (PAk) prieš pelės IgG. Vizualiai patogesniai testo rezultatų vertinimui ant membranos papildomai užneštos mėlynos kontūro linijos, testavimo zonos nudažytos žalia, o kontrolinė – šviesiai mėlyna spalvomis. Sukonstruotų greitųjų testų schematinis vaizdas pateiktas 3.25 A ir C paveiksluose.

3.10 lentelė. MAK apibūdinimui ir imunologinių detekcinių sistemų kūrimui naudoti bakterijų izoliatai ir jų testavimo rezultatai

Bakterijų rūšis	Identifikacijos numeris	β -laktamazių profilis ^a	Greitas testas ^c	TPX ^c
<i>C. portucalensis</i>	3826Z08	CMY-34	+	N
<i>K. pneumoniae</i>	CCUG60138	NDM-1, CMY-4^b	++	N
<i>K. pneumoniae</i>	CCUG68728	NDM-1, CMY-4^b	++	N
<i>A. chinensis</i>	CCUG74036T	NDM-1	+	N
<i>A. chinensis</i>	CCUG74037	NDM-1	+	N
<i>K. pneumoniae</i>	50627996	CMY-6, NDM-1, OXA-1, CTX-M-15, SHV-11	++	++
<i>K. pneumoniae</i>	50531633	NDM-1, OXA-181	+	+
<i>E. coli</i>	50639799	CMY-4, OXA-1, VIM-29, CTX-M-15	+	+
<i>P. mirabilis</i>	50664164	CMY-16, NDM-1, OXA-10	++	++
<i>E. coli</i>	50664179	NDM-5, SHV-12, TEM-1B	+	+
<i>Citrobacter</i> sp.	50677481	NDM-1	+	+
<i>E. coli</i>	50694638	CMY	+	+
<i>E. coli</i>	50816743	CMY-2, OXA-1, OXA-181, CTX-M-15, TEM-1	+	+
<i>K. aerogenes</i>	50796520	Neigiamas	-	-
<i>P. mirabilis</i>	50793946	Neigiamas	-	-

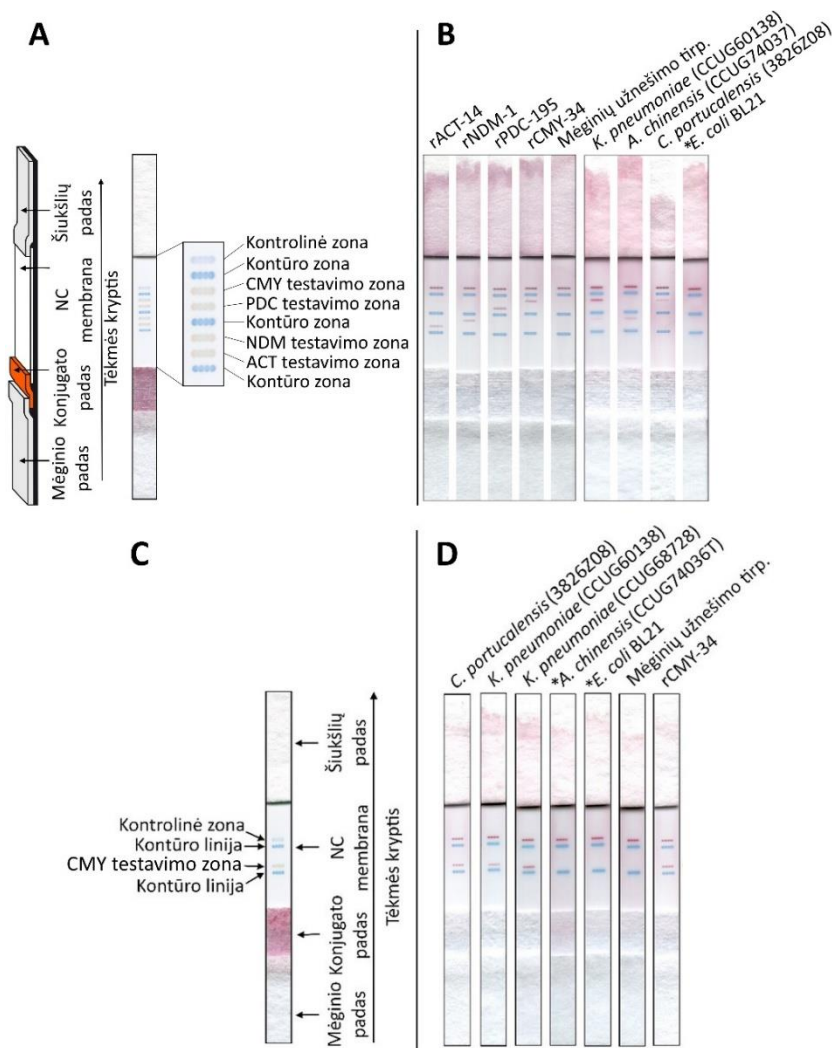
^aNDM ir CMY tipo β -laktamazės yra paryškintos

^b*blac_{CMY}* nustatytas PGR metodu, CMY variantas identifikuotas atlikus PGR produkto sekoskaitą

^cTeigiamas rezultatas, kai nustatyta atitinkamai NDM arba CMY tipo β -laktamazė (+), kai nustatytos ir NDM, ir CMY tipo β -laktamazės (++), neigiamas rezultatas (-), netestuota (N)

Testuojant rekombinantinių β -laktamazių serijinius skiedimus, nustatytas multipleksinio testo jautrumas siekė 11 ng/mL rACT-14, rNDM-1, rPDC-195 ir rCMY-34. CMY β -laktamazių nustatymui skirtu greitojo testo jautrumas taip pat buvo 11 ng/mL rCMY-34.

Kitame etape, sukonstruoti testai tikrinti su β -laktamazės produkuojančių bakterijų izoliatais. Iš viso testuoti 9 NDM-1 arba NDM-5 variantą ir 8 CMY-2, CMY-4, CMY-6, CMY-16, CMY-34 bei vieną nepatikslingą CMY variantą produkuojantys patogeniškų bakterijų izoliatai (3.10 lentelė).



3.25 pav. Greitųjų testų, skirtų β -laktamazių nustatymui, kūrimo rezultatai. **(A)** ACT, NDM, PDC ir CMY tipo β -laktamazių nustatymui skirto multiplexinio testo schematinis vaizdas ir **(B)** testavimo su rekombinantinėmis β -laktamazėmis bei bakterijų izoliatais rezultatai. **(C)** CMY tipo β -laktamazių nustatymui skirto testo schematinis vaizdas ir **(D)** testavimo su rekombinantinėmis β -laktamazėmis bei bakterijų izoliatais rezultatai. Testuoti: CMY-34 produkuojantis *C. portucalensis*, NDM-1 ir CMY-4 produkuojantis *K. pneumoniae* ir NDM-1 produkuojantis *A. chinensis* izoliatas. „*“ – nurodo neigiamos kontrolės bakterijų mėginius. Kaip papildoma neigiamą kontrolę testuotas mėginių ruošimui naudotas mėginių užnešimo tirpalas.

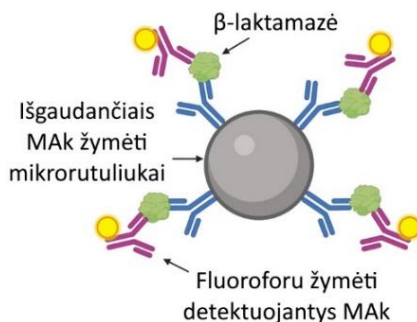
Atliekant tyrimą, bakterijų kolonija suspenduota mėginių užnešimo tirpale ir mėginys užneštas ant testo juostos. Testavimo rezultatų pavyzdžia pateikti 3.25, B ir D paveiksluose, apibendrinti rezultatai nurodyti 3.10 lentelėje. Nustatyta, jog multipleksinis testas gebėjo aptikti visus NDM ir CMY teigiamus izoliatus (3.25 pav. B, 3.10 lentelė). Visi CMY teigiami izoliatai sėkmingai nustatyti su CMY nustatymui skirtu greituoju testu (3.25 pav. D). Nespecifinė MAK sąveika, kai neigiamai kontrolei testuotos *β*-laktamazių neprodukuojančios *K. aerogenes*, *Proteus mirabilis* ir *E. coli* BL21 bakterijos bei mėginių užnešimo tirpalas, nenustatyta – tai patvirtina testų specifiškumą.

Taigi, atrinkti MAK prieš *β*-laktamazes gali būti pritaikyti šių baltymų nustatymui imunochromatografiniu metodu. Kitame etape MAK buvo išbandyti diagnostinėje dviejų fotonų sužadavimo (angl., *two-photon excitation microfluorometric*, TPX) technologiją taikančioje platformoje.

Imunochromatografiniai testai paruošti bendradarbiaujant su dr. Martynu Simanavičiumi (VU GMC BTI Imunologijos skyrius) ir UAB *Imunodiagnostika*.

3.1.12 MAK taikymas TPX sistemoje

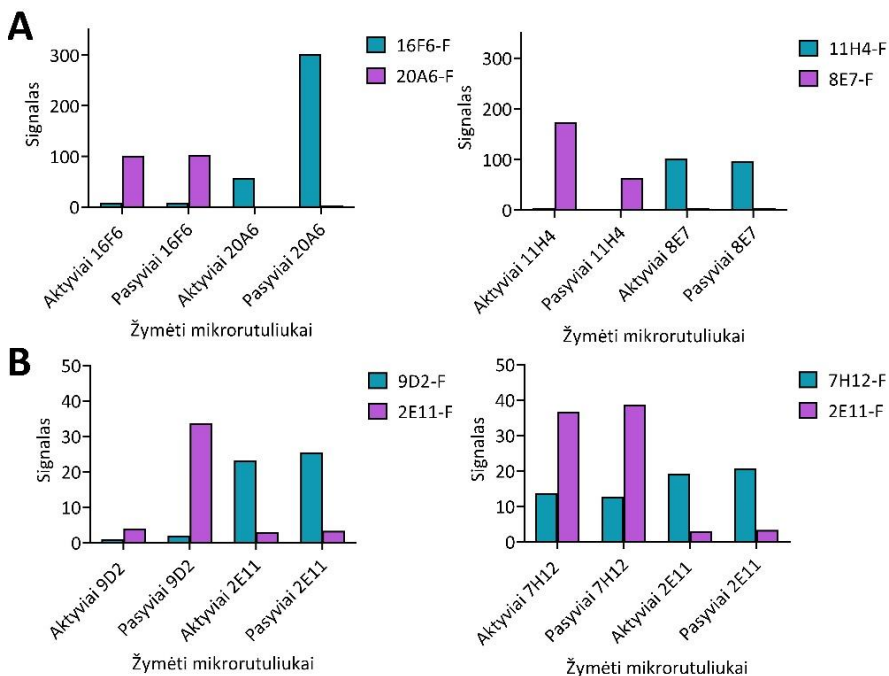
Šiame žingsnyje siekta įvertinti, ar sukurtieji MAK prieš *β*-laktamazes geba atpažinti natyvias *β*-laktamazes bakterijų izoliatuose, juos išbadant su *ArcDia Oy Ltd* sukurta ir patentuota TPX technologija ir automatizuotu detekcijos prietaisu [136], [158]. Šis prietaisas, matuodamas fluorescencijos intensyvumą, realiu laiku vertina reakcijos kinetiką, o rezultatai paaiškėja per 15–20 min. TPX sistema yra paremta dviepitopės IFA principu, tačiau TPX sistemos atveju kietąja faze naudojami polistireno mikrorutuliukai. Pastarieji yra pažymėti išgaudančiais antikūnais, kurie suriša mėginyje esančią analitę, o detekcijai naudojami nekonkuruojantys fluoroforu žymėti antikūnai. Antikūnų–analitės kompleksų susidarymas automatizuotu prietaisu sekamas realiu laiku (3.26 pav.).



3.26 pav. TPX sistemos veikimo principo schematinis vaizdas. Antigenas mėginyje yra surišamas išgaudančių, su polistireno mikrorutuliukais konjuguotų MAK. Susidariusių kompleksų detekcijai naudojami analitei specifiški fluoroforu žymėti MAK. Ant kiekvieno rutuliuko susiformavę MAK–analitės kompleksai detektuojami individualiai, panaudojant TPX technologiją. Paveikslas sukurtas su *BioRender.com*.

Šiame darbe TPX sistemoje buvo išbandytos 3.1.5 skyriuje atrinktos ir 3.5 lentelėje nurodytos MAK prieš ACT-14, NDM-1, PDC-195 ir CMY-34 poros. Pirmiausia, siekiant įvertinti MAK savybę iš mėginio išgauti β -laktamazes, visi MAK aktyviai (kovalentiškai) ir pasyviai (pasyvios adsorbcijos būdu) konjuguoti su polistireno mikrorutuliukais. Siekiant įvertinti MAK detekcines savybes, visi antikūnai konjuguoti su florescencine *ArcDia*TM BF530 žyme.

Toliau TPX sistema buvo testuotos visos galimos išgaudančių ir detektuojančių MAK kombinacijos su atitinkamais baltymais – rACT-14, rNDM-1, rPDC-195 ir rCMY-34. Keli testuotų kombinacijų pavyzdžiai pateikti 3.27 paveiksle ir 6 priede.



3.27 pav. TPX sistema su rekombinantiniais antigenais tirtos MAK prieš β -laktamazes poros ir jų kombinacijos. MAK porą sudaro aktyviai arba pasyviai su mikrorutuliukais žymėti išgaudantys MAK ir fluoroforu žymėti detektuojantys MAK (MAK-F). **(A)** Testuotos MAK prieš PDC-195 poros: 16F6 ir 20A6, 11H4 ir 8E7. **(B)** Testuotos MAK prieš CMY-34 poros: 2E11 ir 9D2 ir 2E11 ir 7H12.

Remiantis gautais rezultatais, atrinktos kelios MAK kombinacijos, kurias testuojant sistemoje gautas stipriausias detekcijos signalas. Atrinktos MAK porų kombinacijos pateiktos 3.11 lentelėje.

Toliau siekta įvertinti, ar atrinktos MAK poros TPX sistemoje atpažįsta natyvias β -laktamazes bakterijų izoliatuose. Šiuo tikslu, atrinktos MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 kombinacijos šia sistema testuotos su 5-iais NDM-1 arba NDM-5 variantus ir 5-iais CMY-2, CMY-4, CMY-6, CMY-16 bei nepatikslingą CMY variantą produkuojančiais bakterijų izoliatais, kurių

apibūdinimas pateiktas 3.1.11 skyriaus 3.10 lentelėje. Neigiamai kontrolei naudoti β -laktamazių neprodukuojantys *P. mirabilis* ir *K. aerogenes* izoliatai. Atliekant testavimą, bakterijų kolonija suspenduota mėginio užnešimo tirpale, suspensija sumaišyta su TPX reakcijos komponentais ir analizuota diagnostiniu prietaisu. Gauti rezultatai pateikti 3.28 A ir B paveiksluose.

3.11 lentelė. Atrinktos MAK porų kombinacijos po antikūnų testavimo TPX sistema su rekombinantinėmis β -laktamazėmis

Atrinktos MAK porų kombinacijos				
	MAK prieš ACT-14	MAK prieš NDM-1	MAK prieš PDC-195	MAK prieš CMY-34
1.	1F5-P ir 7B6-F	5E2-P ir 3F10-F	20A6-P ir 16F6-F	9D2-P ir 2E11-F
2.	1F5-P ir 6H3-F	5E2-P ir 5F7-F	20A6-P ir 8E7-F	7H12-P ir 2E11-F
3.		2C1-P ir 5F7-F	11H4-A ir 16F6-F	
4.		5F7-P ir 5E2-F	11H4-A ir 8E7-F	
5.		5F7-P ir 2C1-F		

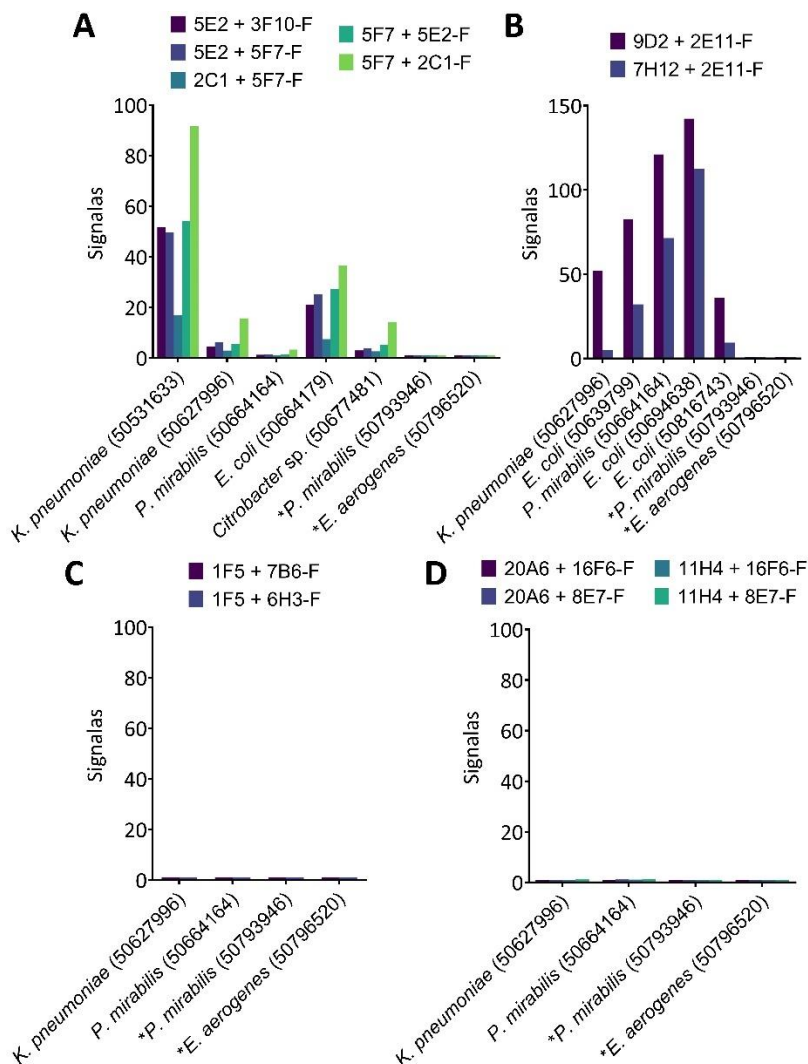
MAK-P – MAK pasyviai žymėti su mikrorutuliukais; MAK-A – MAK aktyviai žymėti su mikrorutuliukais; MAK-F – MAK ir fluoroforo konjugatas

Išanalizavus TPX analizės rezultatus, nustatyta, jog MAK prieš NDM-1 gebėjo nustatyti NDM-1 ir NDM-5 visuose NDM teigiamuose bakterijų izoliatuose (3.28 pav. A). Atsižvelgiant į testavimo metu gautas signalo reikšmes, atrinkta aukščiausią signalą generuojanti MAK pora: pasyviai mikrorutuliukais žymėtas MAK 5F7 ir fluoroforu žymėtas MAK 2C1. Tuo tarpu TPX sistemoje MAK prieš CMY-34 gebėjo nustatyti CMY-2, CMY-4, CMY-6, CMY-16 ir vieną napatikslintą CMY variantą visuose CMY teigiamuose bakterijų izoliatuose (3.28 pav. B). Atrinkta geriausiai veikianti MAK prieš CMY-34 pora: pasyviai mikrorutuliukais žymėtas MAK 9D2 ir fluoroforu žymėtas MAK 2E11.

Atrinktos MAK prieš ACT-14 ir PDC-195 kombinacijos su šio tipo β -laktamazes produkuojančiais izoliatais nebuvo testuotos, nes nepavyko gauti tyrimui reikalingų bakterijų izoliatų. Tačiau įvertintas šių MAK kryžminis reaktyvumas, juos testuojant su dviem NDM, CMY, OXA, SHV ir CTX-M tipo β -laktamazes produkuojančiais *K. pneumoniae* ir *P. mirabilis* izoliatais, kurių tyrimo rezultatai pateikti 3.28 C ir D paveiksluose. TPX sistema ištyrus MAK prieš ACT-14 ir PDC-195 porų kombinacijas, MAK kryžminis reaktyvumas, kai buvo tirti minėtas β -laktamazes produkuojantys bakterijų izoliatai, nenustatytas (3.28 pav. C ir D). Tolesniam tyrimui pasirinkta naudoti MAK poras, kurios anksčiau sėkmingai pritaikytos dviepitopės IFA ir greitojo testo formatuose: MAK 1F5 ir fluoroforu žymėtą MAK 7B6 prieš ACT-14 bei MAK 20A6 ir detektuojantį MAK 16F6 prieš PDC-195.

Kitame etape siekta įvertinti TPX sistemos analitinį ir klinikinį jautrumą, naudojant testavimo su β -laktamazes produkuojančiais bakterijų izoliatais metu atrinktas MAK poras. Vertinant sistemos analitinį jautrumą, MAK poros tirtos su skirtingomis rekombinantinių β -laktamazių koncentracijomis. Signalų intensyvumo priklausomybės nuo rCMY-34 koncentracijos grafiko pavyzdys pateiktas 3.29 paveiksle, rACT-14, rNDM-1 ir rPDC-195 titravimo

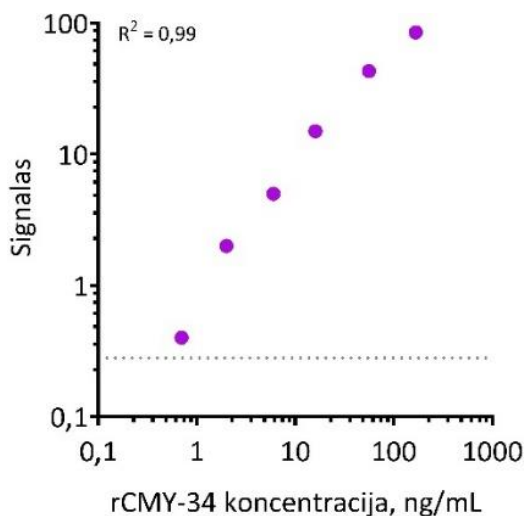
rezultatai pateikti 6 priede. Remiantis antigenų titravimo rezultatais, nustatytas sistemų analitinis jautrumas siekė nuo 0,07 iki 1,9 ng/mL antigeno. Apibendrinti rezultatai pateikti 3.12 lentelėje.



3.28 pav. TPX sistema su bakterijų izoliatais tirtos atrinktų MAK prieš β -laktamazes porų kombinacijos. MAK porą sudaro su mikrorutuliukais žymėti išgaudantys MAK ir fluoroforu žymėti detektuojantys MAK (MAK-F). **(A)** MAK prieš NDM-1 testavimas. **(B)** MAK prieš CMY-34 testavimas. **(C)** MAK prieš ACT-14 testavimas. **(D)** MAK prieš PDC-195 testavimas. „*“ – žymi neigiamą kontrolę.

Vertinant analitinių sistemų klinikinį jautrumą, atrinktos MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 poros TPX sistema testuotos su NDM ir CMY tipo β -laktamazes produkuojančiais bakterijų izoliatais, atliekant bakterijų serijinius skiedimus.

Po testavimo gauti signalo intensyvumo priklausomybės nuo bakterijų koncentracijos grafikai pateikti 3.30 paveiksle. Nustatyto klinikinio jautrumo reikšmės skyrėsi kiekvieno bakterijų izoliato atveju ir siekė nuo $8,17 \cdot 10^4$ iki $4,79 \cdot 10^5$ ląstelių/mL MAk prieš NDM-1 atveju ir nuo $8,73 \cdot 10^3$ iki $2,49 \cdot 10^4$ ląstelių/mL MAk prieš CMY-34 atveju. Apibendrinti rezultatai pateikti 3.12 lentelėje.

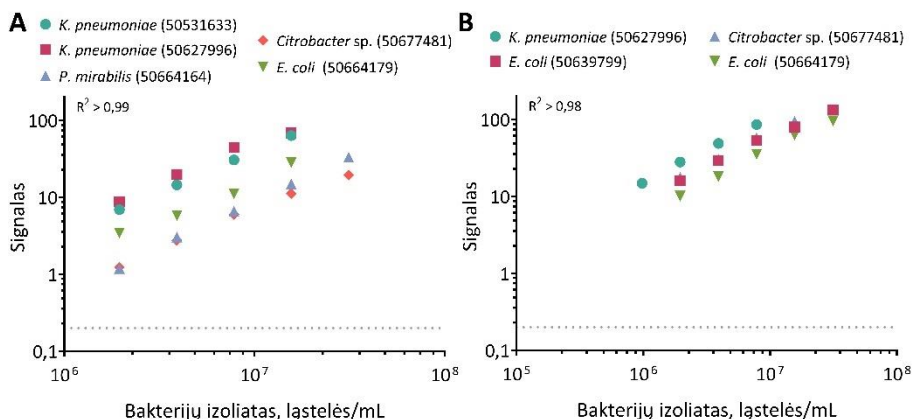


3.29 pav. Signalo intensyvumo priklausomybės nuo rCMY-34 koncentracijos grafikas, skirtas analitinio jautrumo nustatymui. Tirta išgaudančio MAk 9D2 ir fluoroforu žymėto MAk 2E11 pora prieš CMY-34. Punktyrinė linija žymi ribinę reikšmę 0,28.

3.12 lentelė. Nustatytas TPX sistemos, kai tirti MAk prieš β -laktamazes, analitinis ir klinikinis jautrumas

	MAk prieš ACT-14	MAk prieš NDM-1	MAk prieš PDC-195	MAk prieš CMY-34
MAk pora	1F5 ir 7B6-F	5F7 ir 2C1-F	16F6 ir 20A6-F	9D2 ir 2E11-F
Analitinis jautrumas, ng/mL	0,1	1,9	0,07	0,3
Klinikinis jautrumas, ląstelės/mL	Netestuota	$8,17 \cdot 10^4$ – $4,79 \cdot 10^5$	Netestuota	$8,73 \cdot 10^3$ – $2,49 \cdot 10^4$

Taigi, šiuo tyrimu buvo parodytas sukurtų MAk prieš β -laktamazes pritaikomumas įvairaus tipo metoduose, įstaitant ir TPX technologiją. Siekiant detalesnio MAk vertinimo, reikalingas išbandytų sistemos komponentų optimizavimas ir optimizuotos sistemos tyrimas su didesne natyviais β -laktamazes produkuojančių izoliatų įvairove.



3.30 pav. Signalų intensyvumo priklausomybės nuo bakterijų koncentracijos grafikai, skirti klinikinio jautrumo nustatymui. **(A)** Tirti išgaudantis MAK 5F7 ir fluoroforu žymėtas MAK 2C1-F NDM-1. **(B)** Tirti išgaudantis MAK 9D2 ir fluoroforu žymėtas MAK 2E11 prieš CMY-34. Punktyrinė linija žymi ribines reikšmes: MAK prieš NDM-1 atveju – 0,24, MAK prieš CMY-34 – 0,2.

3.2. Plataus reaktyvumo MAK prieš β -laktamazes kūrimas ir apibūdinimas

Šiame darbe buvo kryptingai sukurti plačiu reaktyvumu AmpC β -laktamazės, kurios taip pat vadinamos C klasės β -laktamazėmis, pasižymintys MAK. Kryptingam antikūnų kūrimui buvo atrinkta dideliu konservatyvumu tarp skirtingų AmpC atstovų pasižyminti DHA-1 β -laktamazės 17 ar. ilgio seka. Kuriant platų β -laktamazių spektrą atpažįstančius MAK, imunogenu naudotas mielėse susintetintas chimerinis, multimerinę struktūrą formuojantis bakteriofago vB_EcoS_NBD2 uodegėlės baltymas gp39 su įterpta tikslinė DHA-1 β -laktamazės seka. Hibridomų technologija sukurti MAK detaliam apibūdinti imunocheminiais, fizikiniais ir bioinformatiniais metodais, panaudojant rekombinantines ir natūralias β -laktamazes. Atliktas MAK epitopų nustatymas ir detali atpažinimo sričių tarp AmpC β -laktamazių analizė. Remiantis gautais rezultatais, įvertintas šių MAK diagnostinis potencialas.

3.2.1. Chimerinio antigeno sintezė ir apibūdinimas

Pirmajame MAK kūrimo žingsnyje buvo atrinkta tarp skirtingų AmpC β -laktamazių konservatyvumu pasižyminti ar. seka. Šiuo tikslu, palygintos AmpC priklausančių β -laktamazių šeimų sekos. DHA-1, CMY-34, ACT-14, PDC-195 ir ADC-144 β -laktamazių ar. sekų palyginio fragmentas, kaip pavyzdys, pateiktas 3.31 paveiksle. Išanalizavus rezultatus, nustatytas dideliu konservatyvumu tarp šių baltymų pasižymintis 17 ar. ilgio regionas (3.31 pav.). Remiantis sugretinimu, antigeno sintezei universalią AmpC β -laktamazių seka toliau pasirinkta naudoti DHA-1 77–93 ar. regione

lokalizuotą 17 ar. fragmentą (pagal DHA-1 seką *GenBank* AEP68014.1), kuris tekste toliau įvardijamas, kaip DHA-1₇₇₋₉₃.

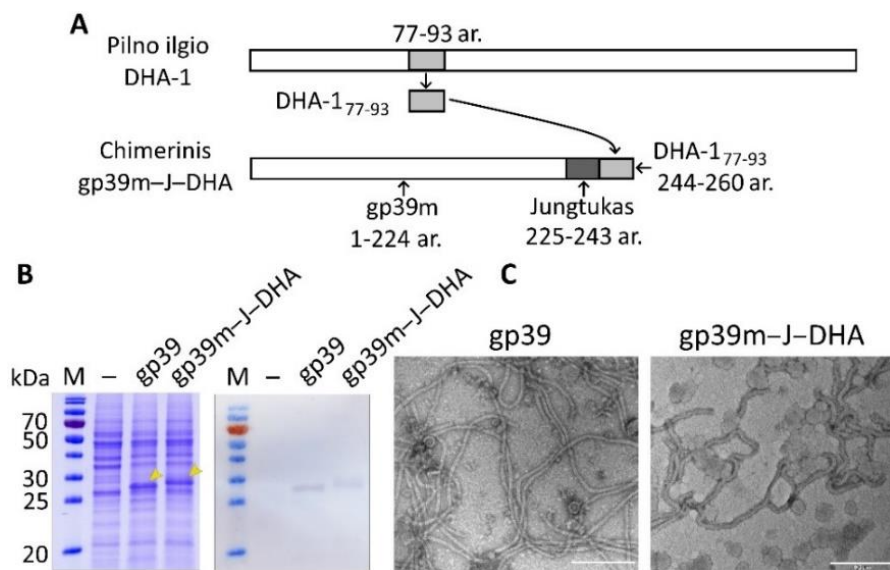
		GenBank Nr.
ADC-144	82 -TIFELGSVSKLFTATAG- 98	OVK75103.1
PDC-195	84 -TLFEIGSVSKTFTATLA- 100	AHH52937.1
DHA-1	77 -TLFELGSVSKTFTGVLG- 93	AEP68014.1
ACT-14	78 -TLFELGSISKFTFTGVLG- 94	AFU25647.1
CMY-34	78 -TLFELGSVSKTFNGVLG- 94	ABN51006.1
	*.:**.:**.:** *... .	

3.31 pav. Dideliu konservatyvumu tarp AmpC β -laktamazių DHA-1, CMY-34, ACT-14, PDC-195 ir ADC-144 pasižyminčio ar. regiono palyginys. DHA-1 seka apibraukta geltonai. Sugretinimas atliktas su *Clustal O*.

Kitame etape kryptingam MAK prieš homologišką β -laktamazių fragmentą kūrimui imunogeno konstravimui pasirinkta tikslinio fragmento eksponavimo baltymo nešiklio paviršiuje strategija. Nešikliu pasirinktas anksčiau aprašytas [3] chimerinis nanovamzdelius formuojantis bakteriofago vB_EcoS_NBD2 uodegėlės baltymas gp39. Konstruojant imunogeną, baltymas gp39 buvo modifikuotas, C-gale prijungiant serino-glicino [GGGGS]3x jungtuką, sukonstruojant baltymo variantą gp39m-J, kuris ties jungtuku buvo sulietas su DHA-1₇₇₋₉₃ fragmentu, gaunant chimerinį gp39m-J-DHA baltymą (3.32 pav. A, 7 priedas).

Sukonstruotas chimerinis baltymas buvo susintetintas *Saccharomyces cerevisiae* AH22-214 mielėse, o jo sintezė įvertinta baltymų elektroforezės denatūruojančiomis sąlygomis ir IB metodais (3.32 pav. B). Testuojant mielių lizatus po baltymų sintezės, nustatyta gp39m-J-DHA (27,5 kDa) atitinkanti baltymų juosta, kuri gelyje yra išsidėsčiusi aukščiau už gp39 baltymo (24,4 kDa), prie kurio nėra prijungtas jungtukas ir DHA-1₇₇₋₉₃ seka, juostą. Chimerinių baltymų sintezė mielėse papildomai patvirtinta, mielių lizatus analizuojant IB metodu su pelės polikloninius antikūnais [159] prieš gp39 (3.32 pav. B). Chimerinio baltymo sintezę ir gryninimą atliko dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė ir dr. Aliona Avižinienė (VU GMC BTI Eukariotų ir genų inžinerijos skyrius).

Chimerinio gp39m-J-DHA baltymo savybė formuoti savaime susirenkančius nanovamzdelius buvo patvirtinta elektroninės mikroskopijos metodu (3.32 pav. C). Lyginant su gp39 baltymo formuojamais nanovamzdeliais, nustatyta, kad gp39m-J-DHA formavo panašia morfologija į gp39 formuojamus nanovamzdelius pasižyminčias oligomerines 12–14 nm pločio ir nuo 0,1 iki daugiau nei 1 μ m ilgio siekiančias struktūras. Papildomai prijungtas 17 ar. ilgio DHA-1 fragmentas nesutrikdė vamzdelių formavimo. Atsižvelgiant į rezultatus, nuspręsta, jog sukonstruotas chimerinis baltymas yra tinkamas MAK prieš universalų β -laktamazių fragmentą kūrimui.

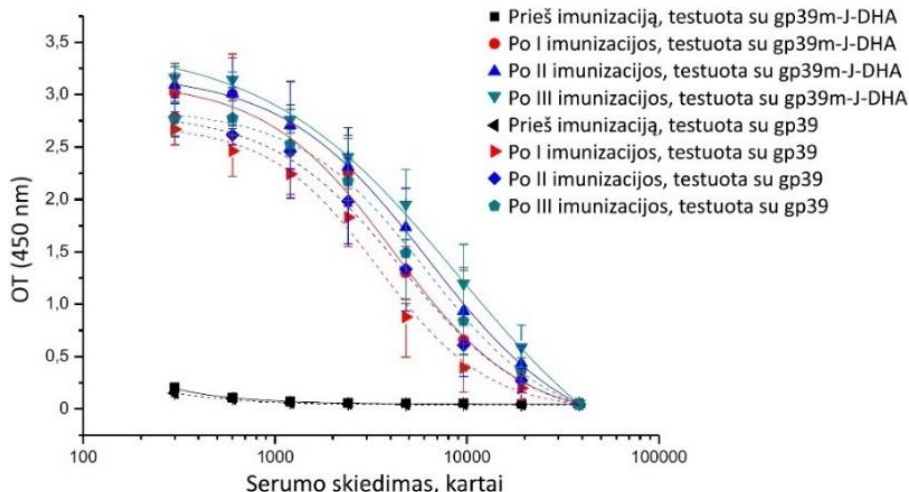


3.32 pav. Chimerinio gp39m-J-DHA baltymo konstravimas ir sintezė. Bakteriofago baltymas gp39m jungtuku (J) sulietas su universalia DHA-1 seka (77–93 ar. regionas, DHA-1_{77–93}). (A) Chimerinio gp39m-J-DHA baltymo konstravimo schema. (B) Susintetintų chimerinių gp39 ir gp39m-J-DHA baltymų variantų tyrimo mielių lizatuose IB rezultatai. „–“ nurodo kontrolę, kai tirtas mielių, transformuotų vektoriumi be gp39 koduojančios sekos, lizatas. Tyrimui naudoti pelės polikloniniai antikūnai prieš gp39. M – baltymų molekulinės masės standartas. (C) gp39 ir gp39m-J-DHA formuojamų nanovamzdelių elektroninės mikroskopijos nuotraukos. Skalės juosta atitinka 200 nm.

3.2.2. Plataus reaktyvumo MAK kūrimas ir apibūdinimas imunocheminiais metodais

Kuriant β -laktamazėms specifiskus MAK, chimeriniu gp39m-J-DHA baltymu 3 kartus imunizuota po 3 BALB/c linijos peles. Prieš kiekvieną imunizaciją buvo surinkti pelių kraujo mėginiai. Netiesiogine IFA su gp39m-J-DHA testuojant pelių kraują po kiekvienos imunizacijos, įvertintas antigeno imunogeniškumas. Remiantis gautais rezultatais, nubraižytos OT priklausomybės nuo kraujo serumo skiedimo logistinės kreivės (3.33 pav.) ir įvertintas antigenui specifiskų IgG antikūnų titras. Nustatyta, kad po imunizacijų pelėms susidarė stiprus imuninis atsakas prieš gp39m-J-DHA, kuris buvo šiek tiek didesnis už susidariusį atsaką prieš nešiklį gp39 (3.33 pav.). Baltymui gp39m-J-DHA specifiskų IgG titras po II imunizacijos (1:9041) buvo apie 2,2 kartus didesnis nei IgG titras po I imunizacijos (1:4140). Kadangi visų imunizuotų pelių antigenui specifiskų IgG titras po III imunizacijos buvo panašus, viena iš pelių buvo pasirinkta hibridomų kūrimui. Po pelės blužnies ląstelių ir mielomos ląstelių hibridizacijos atlikta antigenui specifiskus MAK sekretuojančių hibridinių ląstelių atranka, augimo terpę testuojant netiesiogine IFA su gp39m-J-DHA, gp39m_J ir rekombinantine

DHA-1 (rDHA-1) β -laktamaze. Atrinktos hibridomos, kurių augimo terpėje nustatyti su gp39m-J-DHA ir rDHA-1 reaguojantys MAK. Iš viso buvo atrinkta 13 IgG klasės MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ sekretuojančių hibridinių ląstelių linijų (3.13 lentelė). Hibridomų kūrimo darbai buvo atlikti kartu su dr. Indre Kučinskaite-Kodze (VU GMC BTI Imunologijos skyrius).



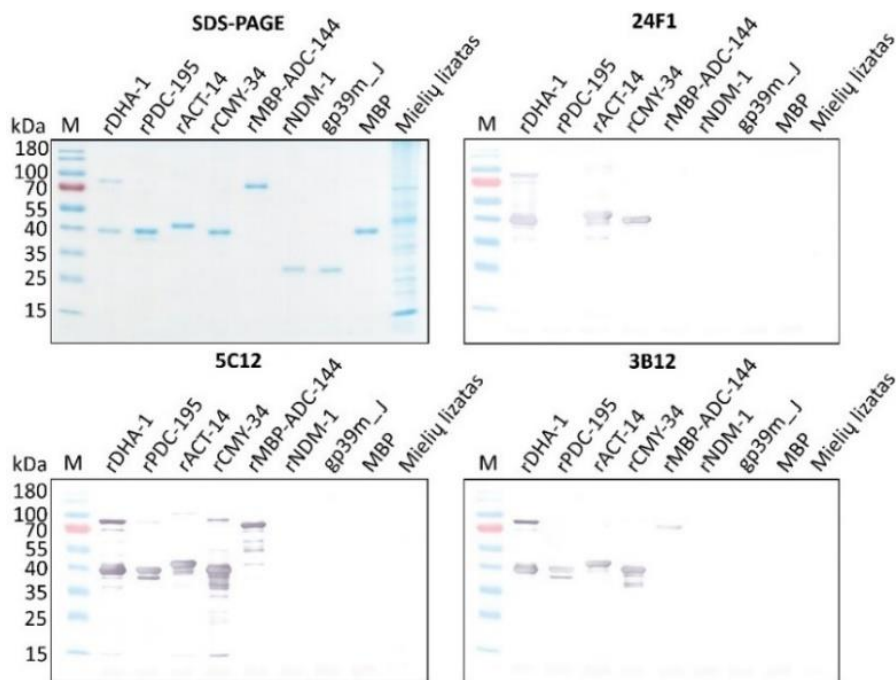
3.33 pav. Chimerinio gp39m-J-DHA baltymo imunogeniškumo tyrimo netiesiogine IFA rezultatai. Pateikti optinio tankio (OT) vidurkiai su standartiniais nuokrypiais, atliekant pelių ($n = 3$) kraujo serumo serijinius akiedimus.

Sukurti MAK buvo detaliam apibūdinti IB ir IFA metodais (3.13 lentelė). MAK tirti su AmpC priklausančiomis giminingomis rekombinantinėmis DHA-1, PDC-195, ACT-14, CMY-34 ir su maltozę surišančiu baltymu (MBP) sulietu ADC-144 (rMBP-ADC-144) β -laktamazėmis. IB metodu nustatyta, jog visi MAK klonai, išskyrus MAK 24F1 ir 15F2, reagavo su visomis tirtomis denatūruotomis ir redukuotomis rekombinantinėmis β -laktamazėmis (3.13 lentelė, 3.34 pav., 8 priedas).

Tiriant IB metodu, MAK 24F1 ir 15F2 sąveika su rPDC-195 ir rMBP-ADC-144 baltymais nenustatyta (3.13 lentelė, 3.34 pav., 8 priedas). Tirtų MAK sąveika su neigiamos kontrolės baltymais – B klasei priklausančia rNDM-1 β -laktamaze, gp39m-J, suliejimo partneriu MBP ir mielių lizatu – taip pat nenustatyta.

Kitame etape MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ apibūdinti netiesioginės IFA metodu, serijinius MAK skiedimus testuojant su giminingomis rekombinantinėmis β -laktamazėmis. Remiantis IFA rezultatais, apskaičiuotos MAK K_d reikšmės, kurios pateiktos 3.13 lentelėje. Nustatyta, kad visi tirtieji MAK pasižymėjo dideliu giminingumu pilno ilgio rDHA-1 baltymui – K_d siekė nuo 0,05 iki 0,4 nM. Dauguma MAK pasižymėjo dideliu giminingumu tai pačiai klasei priklausančioms β -laktamazėms – rPDC-195, rACT-14, rCMY-34 ir rMBP-ADC-144 (K_d siekė nuo 0,03 iki 1 nM). MAK 24F1 ir 15F2 atveju nustatytas

nedidelis giminingumas rPDC-195 baltymui (K_d buvo atitinkamai 60,5 ir 9,1 nM). Pastarieji MAK silpnai reagavo ir su rMBP-ADC-144 baltymu – $K_d > 100$ nM (3.13 lentelė). Silpną MAK 24F1 ir 15F2 sąveiką su rPDC-195 ir rMBP-ADC-144 patvirtina ir anksčiau gauti IB rezultatai (3.34 pav., 8 priedas).



3.34 pav. MAK 24F1, 5C12 ir 3B12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ reaktyvumo su giminingomis rekombinantinėmis β -laktamazėmis tyrimo IB metodu rezultatai. Neigiamai kontrolei naudota B klasei priklausanti rNDM-1 β -laktamazė, gp39m-J, maltozę surišantis baltymas (MBP) ir mielių lizatas. M – baltymų molekulinės masės standartas.

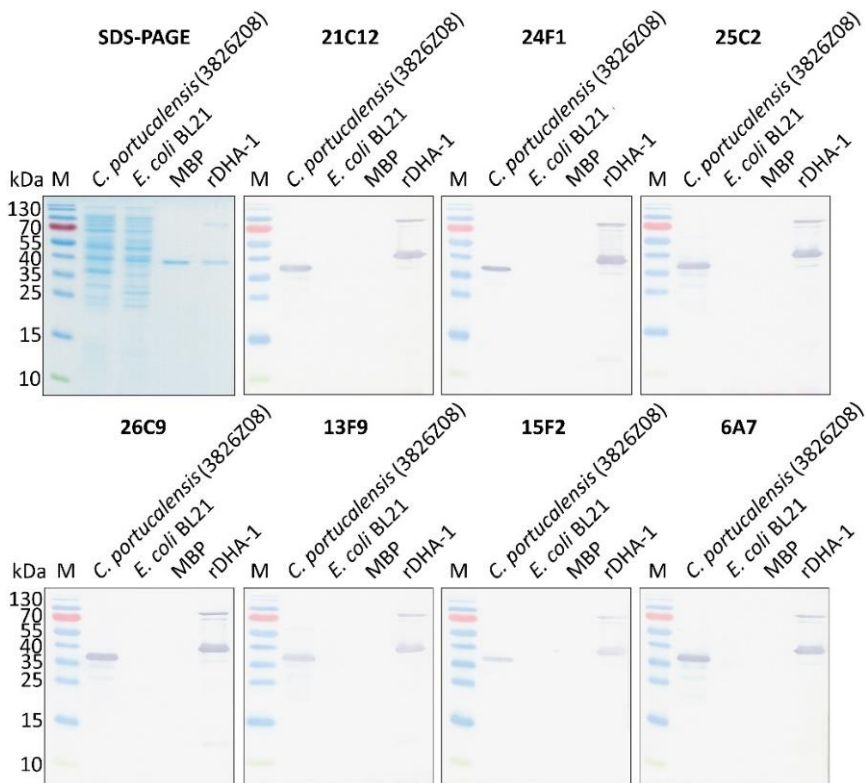
MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ ištyrus IB metodu su natyvią CMY-34 β -laktamazę produkuojančių *C. portucalensis* bakterijų (3826Z08) lizatu (izoliato apibūdinimas pateiktas 3.1.13 skyriuje, 2.8 lentelėje), patvirtintas visų sukurtųjų MAK reaktyvumas su denatūruota ir redukuota natyvia CMY-34 β -laktamaze (matoma juosta virš 35 kDa standarto žymės) (3.35 pav., 9 priedas). MAK sąveika su neigiamos kontrolės *E. coli* BL21 lizato ir MBP baltymais nenustatyta.

3.13 lentelė. MAk prieš DHA-1₇₇₋₉₃ apibūdinimo rezultatai

Nr.	MAk klonas	IgG poklasis	Metodas ^a	MAk reaktyvumas su rekombinantinėmis β-laktamazėmis				
				rDHA-1	rPDC-195	rACT-14	rCMY-34	rMBP-ADC-144
1.	21C12	IgG3	IFA IB	0,4 +	0,2 +	0,5 +	0,2 +	1,1 +
2.	24F1	IgG3	IFA IB	0,3 +	60,5 –	0,3 +	0,2 +	– –
3.	15F7	IgG1	IFA IB	0,07 +	0,1 +	0,2 +	0,05 +	0,3 +
4.	3B9	IgG2a	IFA IB	0,06 +	0,05 +	0,1 +	0,04 +	0,2 +
5.	25C2	IgG3	IFA IB	0,4 +	0,3 +	0,4 +	0,1 +	0,9 +
6.	26C9	IgG1	IFA IB	0,08 +	0,2 +	0,4 +	0,9 +	0,4 +
7.	13F9	IgG3	IFA IB	0,3 +	0,3 +	0,4 +	0,2 +	0,8 +
8.	15F2	IgG3	IFA IB	0,2 +	9,1 –	0,4 +	0,2 +	– –
9.	16E6	IgG3	IFA IB	0,2 +	0,2 +	0,4 +	0,2 +	0,7 +
10.	6A7	IgG3	IFA IB	0,3 +	0,2 +	0,4 +	0,2 +	0,6 +
11.	5G8	IgG3	IFA IB	0,4 +	0,3 +	0,5 +	0,2 +	0,9 +
12.	5C12	IgG2a	IFA IB	0,05 +	0,07 +	0,1 +	0,03 +	0,2 +
13.	3B12	IgG3	IFA IB	0,3 +	0,05 +	0,5 +	0,2 +	0,7 +

^aIFA rezultatai pateikti kaip tariamosios disociacijos konstantos (K_d) reikšmės (nM), nustatytos netiesiogine IFA testuojant rekombinantines β-laktamazes. „–“ nurodo neigiamą rezultatą, kai nustatyta K_d reikšmė yra > 100 nM.

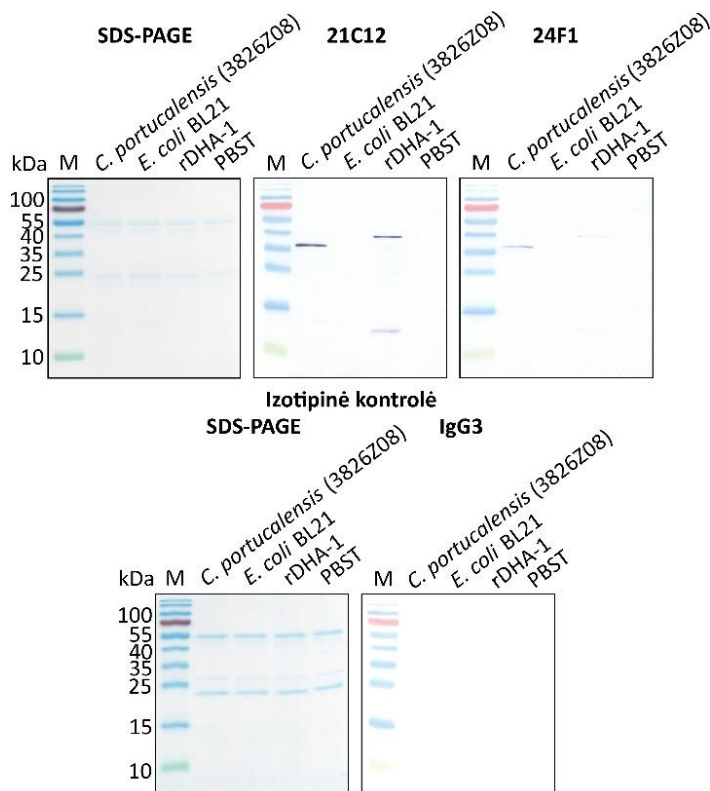
Imunoblotinge vizualiai matoma antigeno juosta atitinka teigiamą rezultatą (+), jei juosta nenustatyta – neigiamą rezultatą (–).



3.35 pav. Mak prieš DHA-1₇₇₋₉₃ reaktyvumo su natyvia CMY-34 β -laktamaze tyrimo IB metodu rezultatai. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvos CMY-34 šaltinis. *E. coli* BL21 lizatas ir matozę surišantis baltymas (MBP) tirti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.

Mak prieš DHA-1₇₇₋₉₃ reaktyvumas su pilno ilgio rDHA-1 ir natyvia CMY-34 papildomai patvirtintas IP metodu. Gauti rezultatai parodė, kad visi Mak specifiskai imunoprecipitavo natyvų CMY-34 baltymą (matoma juosta virš 35 kDa standarto žymės) iš *C. portucalensis* (3826Z08) lizato bei rDHA-1 baltymą (matoma juosta ties 40 kDa standarto žyme) (3.36 pav., 10 priedas).

Apibendrinant Mak prieš DHA-1₇₇₋₉₃ kūrimo ir apibūdinimo rezultatus, šiame darbe, panaudojant chimerinį gp39m-J-DHA baltymą su įterpta universalio 17 ar. ilgio AmpC β -laktamazių seka, buvo sukurta 13-os Mak kolekcija. Visi sukurtieji Mak reagavo su rDHA-1 baltymu, o iš jų 11 Mak klonų pasižymėjo reaktyvumu su AmpC priklausančiomis giminingomis rekombinantinėmis PDC-195, ACT-14 ir MBP-ADC-144 β -laktamazėmis bei rekombinantine ir natyvia CMY-34 β -laktamazės formomis.



3.36 pav. Natyvio CMY-34 ir rDHA-1 β -laktamazių IP su MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvio CMY-34 β -laktamazės šaltinis. Detekcijai naudotas HRP konjuguotas MAK 26C9 prieš DHA-1₇₇₋₉₃. *E. coli* BL21 lizatas ir mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBST) naudoti kaip neigiama kontrolė. IgG3 klasės MAK 20D1 prieš SARS-CoV-2 spyglio baltymą naudotas kaip izotipinė kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.

3.2.3. Platus reaktyvumo MAK epitopų patikslinimas ir analizė

Šiame darbų etape atliktas sukurtųjų MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ atpažinimo sričių patikslinimas. Šiuo tikslu, MAK testuoti konkurencinės IFA metodu su DHA-1₇₇₋₉₃ ar. regioną apimančiais trumpintais sintetiniai peptidais P0–P8. Peptidų apibūdinimas nurodytas 2.1.9 skyriaus 2.6 lentelėje, o testavimo rezultatai pateikti 3.14 lentelėje.

Atlikus tyrimą, buvo identifikuotos dvi MAK prisijungimo DHA-1₇₇₋₉₃ ar. regione sritys, pagal kurias antikūnai suskirstyti į dvi grupes (3.14 lentelė). I grupės MAK reagavo su P0–P2 ir P5–P7 peptidais ir atpažino 11 ar. ilgio epitopą, lokalizuotą DHA-1₇₉₋₈₉ ar. regione (3.14 lentelė, 3.37 pav. A ir B). MAK 24F1 ir 15F2 buvo priskirti II-ai grupei, kadangi šie antikūnai reagavo su P0–P5 peptidais, kurie atitinka 9 ar. ilgio epitopą, esantį DHA-1₈₅₋₉₃ ar. srityje (3.14 lentelė, 3.37 pav. A ir B).

3.14 lentelė. MAk prieš DHA-1₇₇₋₉₃ atpažinimo sričių nustatymo, naudojant sintetinius, DHA-1 77–93 ar. regioną apimančius peptidus, rezultatai

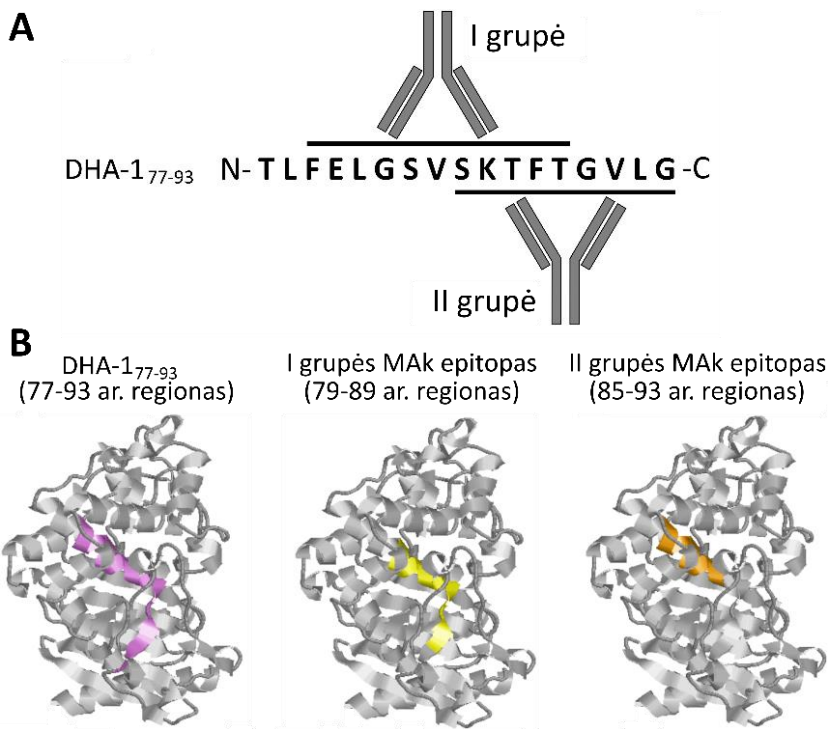
MAk	Nustatyta atpažinimo sritis DHA-1 baltyme ^a	MAk reaktyvumas su sintetiniais peptidais ^b										MAk skirstymas pagal epitopus
		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8		
21C12	79–89 ar.	+	+	+			+	+	+		I grupė	
15F7		+	+	+			+	+	+			
3B9		+	+	+			+	+	+			
25C2		+	+	+			+	+	+			
26C9		+	+	+			+	+	+			
13F9		+	+	+			+	+	+			
16E6		+	+	+			+	+	+			
6A7		+	+	+			+	+	+			
5G8		+	+	+			+	+	+			
5C12		+	+	+			+	+	+			
3B12		+	+	+			+	+	+			
24F1	85–93 ar.	+	+	+	+	+	+				II grupė	
15F2		+	+	+	+	+	+					

^aPagal pilno ilgio DHA-1 baltymo seką: *GenBank* nr. AEP68014.1

^bKonkurencine IFA nustatytas MAk reaktyvumas su peptidu (+)

Palyginus DHA-1₇₇₋₉₃ ar. seką su MAk apibūninimo darbuose naudotų ACT-14, PDC-195, CMY-34 ir ADC-144 β-laktamazių ar. sekomis, sugretinto segmento C-galas pasižymėjo sekos heterogeniškumu (3.38 pav. A). Identifikuoti 3 ar. skirtumai PDC-195 baltymo 84–100 ar. regione ir 4 ar. nesutapimai ADC-144 82–98 ar. segmente. Galimai šie sekos skirtumai lėmė apibūdinimo metu nustatytą silpną MAk 24F1 ir 15F2, kurių epitopas yra lokalizuotas DHA-1₇₇₋₉₃ C-gale, reaktyvumą su rPDC-195 ir rMBP-ADC-144 baltymais.

Nustatyta, kad I-os grupės MAk epitopas pasižymėjo dideliu panašumu giminingoms ACT-14, PDC-195, CMY-34 ir ADC-144 β-laktamazėms (3.38 pav. A). Įžvelgiant didelį plataus reaktyvumo MAk potencialą, nuspręsta detaliau ištirti I-os grupės MAk kryžminį reaktyvumą. Šiuo tikslu, I-os grupės MAk epitopas buvo sugretintas su C klasei priklausančių β-laktamazių šeimomis, kurios sugrupuotos pagal konservatyvaus regiono ar. sekos panašumus. Atlikus analizę, nustatyta, kad I-os grupės MAk epitopas buvo identiškas tarp visų DHA šeimai priklausančių β-laktamazių alelinių variantų bei identiškas tarp kitų 14-os β-laktamazių šeimų, kurios pateiktos 3.38 B paveiksle. Pagal ar. sekos panašumus konservatyviame regione, PDC šeima sugrupuota su kitomis 6-iomis, ACT – su 1, CMY – su 2-iem β-laktamazių šeimomis (3.38 pav. B). Kadangi MAk apibūdinimo darbuose IFA ir IB metodais parodytas I grupei priklausančių antikūnų reaktyvumas su rekombinantinėmis DHA-1, ACT-14, PDC-195, CMY-34 ir ADC-144 β-laktamazėmis, šios analizės rezultatai rodo galimai platų MAk specifiskumą β-laktamazių šeimoms (3.38 pav. B).



3.37 pav. MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ epitopų nustatymo rezultatai. **(A)** Nustatytos MAK atpažinimo sritys DHA-1 77–93 ar. regione. Pagal atpažinimo regionus MAK suskirstyti į I ir II grupes. **(B)** MAK epitopų vizualizacija DHA-1 baltymo erdvinėje struktūroje. DHA-1₇₇₋₉₃ atitinkantis 77–93 ar. regionas pažymėtas oranžine, nustatytas I grupės MAK epitopas (79–89 ar.) – violetine, II grupės MAK epitopas (85–93 ar.) – geltona spalvomis. Pavaizduota DHA-1 baltymo struktūra (23–397 ar.) be signalinės sekos (*AlphaFold Protein Structure Database*, AF-G5DDZ0-F1-v4).

MAK reaktyvumas su DHA, ACT, PDC, CMY ir ADC grupėms nepriskirtomis C klasės β -laktamazių šeimomis buvo įvertintas tyrimui panaudojant šių β -laktamazių šeimų konservatyvias sritis atitinkančius sintetinius peptidus (P_1–P_9). Tirtos β -laktamazių šeimos ir jų konservatyvią sritį atitinkantys peptidai pateikti 3.39 A paveiksle. Atlikus tyrimą, netiesioginės IFA metodu nustatytas I-os grupės MAK reaktyvumas su visais analizuotais sintetiniais peptidais (3.39 pav. B). Nustatyta, kad 8 iš 11 tirtų MAK pasižymėjo dideliu giminingumu visiems tirtiems peptidams – nustatytos K_d reikšmės siekė nuo 0,03 iki 1 nM (3.39 pav. B). Tuo tarpu MAK 26C9 pasižymėjo mažesniu giminingumu (K_d 3,7, 1,3 ir 1,6 nM) P_5, P_6 ir P_7, MAK 5G8 – P_6 ir P_7 (K_d 1,8 ir 1,5 nM) ir MAK 3B12 – P_6 (K_d 1,2 nM) peptidams (3.39 pav. B). Antikūnų testavimas su peptidais leidžia daryti prielaidą, kad I-os grupės MAK galimai pasižymi plačiu reaktyvumu su 3.39 A paveiksle nurodytomis C klasės β -laktamazių šeimomis.

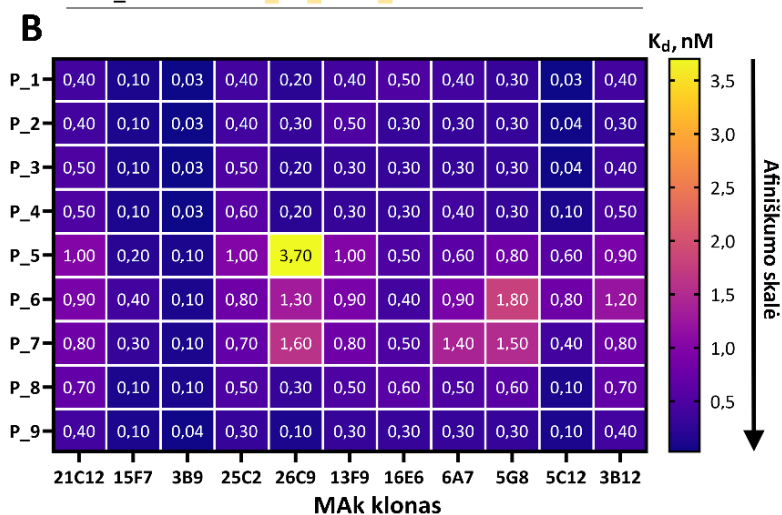
A		
	I grupė	GenBank nr.
DHA-1 ₇₇₋₉₃	77-TLFELGSVSKTFTGVLG-93	AEP68014.1
ACT-14	78-TLFELGSISKTFGTGVLG-94	AFU25647.1
PDC-195	78-TLFEIGSVSKTFTATLA-100	AHH52937.1
CMY-34	78-TLFELGSVSKTFNGVLG-94	ABN51006.1
ADC-144	82-TIFELGSVSKLFTATAG-98	OKV75103.1
II grupė		
B		
C klasės β-laktamazių šeima	I grupės MAk epitopo palyginys	
DHA, BUT, CDA, CMH, Era, EC, EDC, ERH, LAQ, MOR, PSZ, SFDC, YEC, YOC, YRC	FELGSVSKTFT	
ADC	FELGSVSKLFT	
PDC, MYCC1, OCH, PFL, PNC, RSC1, TRU	FEIGSVSKTFT	
ACT, MIR	FELGSIKTF	
CMY, CFE, LAT	FELGSVSKTFN	

3.38 pav. MAk prieš DHA-1₇₇₋₉₃ epitopų analizė. **(A)** DHA-1₇₇₋₉₃ ir β-laktamazių, naudotų MAk apibūdinimui, konservatyvaus regiono palyginys. **(B)** I grupės MAk epitopo palyginys su ACT, PDC, CMY, ADC ir kitų C klasės β-laktamazių šeimų konservatyviais regionais. Nesutampiančių ar. pozicijos pažymėtos geltonai.

Nustačius, kad I-ai grupei priklausančios MAk pasižymi panašiomis savybėmis ir plačiu reaktyvumu su AmpC β-laktamazėmis, toliau nuspręsta pasirinkti ir detaliau apibūdinti tris MAk prieš DHA-1₇₇₋₉₃ klonus, kurie priklausytų skirtingiems antikūnų poklasiams. Todėl, detalesniems tyrimams buvo atrinkti šie MAk: IgG1 poklasio MAk 26C9, IgG2a MAk 5C12 ir IgG3 MAk 21C12.

Taikant fizikinius metodus – spektrinę elipsometriją kartu su paviršiaus plazmonų rezonansu, buvo įvertinti MAk 26C9, 5C12 ir 21C12 sąveikos su β-laktamazėmis kinetiniai parametrai. Šiuo metodu pasirinkta ištirti antikūnų sąveiką su kryžmiškai reaguojančia rCMY-34 β-laktamaze. Atliekant tyrimą, ant sensorinės aukso plokštelės suformuotas baltymo G monosluoksnis ir užnešti tiriamieji MAk. Nusistovėjus sistemos pusiausvyrai, įneštas rCMY-34 baltymas (3.40 pav. A). Sukonstruotu imunojutikliu MAk ir rCMY-34 sąveiką analizuojant realiu laiku, buvo išmatuoti elipsometriniai parametrai Δ ir Ψ spektrai. Tyrimo metu matuoti fazės skirtumo (Δ) ir amplitudės pokyčio (Ψ) parametrai. Tiek fazės, tiek amplitudės pokyčiai atsiranda poliarizuotai šviesai atsispindėjus nuo bandinio, šiuo atveju lusto su imobilizuotais MAk bei prie antikūnų prisijungusio rCMY-34 baltymo. Pritaikius modelius, nustatytos Δ ir Ψ parametrai reikšmės normalizuotos, gauti rezultatai pateikti 3.40 B paveiksle.

A	Peptidas	I grupės MAK epitopui homologiškos sekos	C klasės β-laktamazių šeima
	DHA-1	79-FELGSVSKTFT-89	DHA
	P_1	FEIGSLSKTFT	CMA, CSA, PAC, PLY, SGC, SLC
	P_2	FEVGSLSKTFT	SPC, SRT, SST
	P_3	FEIGSVSKVFT	IDC
	P_4	FEIGSVSKTYT	AsbA1, CepH, CepS
	P_5	FEIGSVSKTLT	AQU, ASA3, CAV, FOX, MOX
	P_6	FEIGSVSKPLT	
	P_7	FEVGSVSKPLT	
	P_8	FEIGSLSKPFT	LHK
	P_9	FEVGSLSKTFA	ACC

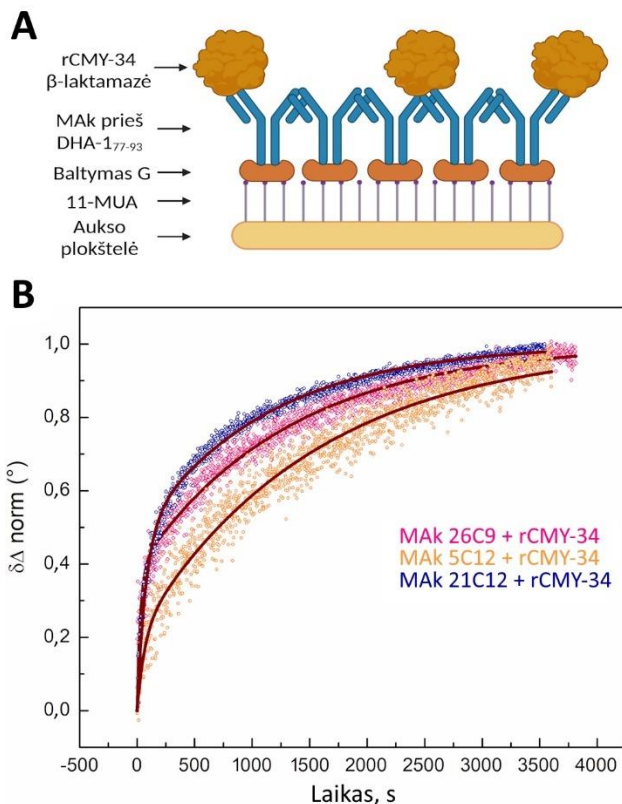


3.39 pav. MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ tyrimas su sintetiniais peptidais (P₁–P₉), atitinkančiais AmpC β-laktamazių konservatyvų regioną. **(A)** MAK kryžminio reaktyvumo tyrimui naudoti sintetiniai peptidai (P₁–P₉) ir jų palyginys su I grupės MAK epitopu. Kiekvienas peptidas atitinka C klasės β-laktamazių šeimų grupę, kurioms būdingas identiškas regionas. Su DHA-1 79–89 ar. regionu nesutampančių ar. pozicijos pažymėtos geltonai. **(B)** I grupės MAK kryžminio reaktyvumo su sintetiniais peptidais (P₁–P₉) tyrimo netiesiogine IFA rezultatai. Rezultatai pateikti, kaip tariamosios disociacijos konstantos (K_d) reikšmės (nM).

Eksperimentiškai išmatuotiems parametrams pritaikius matematinius modelius [160] (3.40 B pav.), kurie atsižvelgia į tarpinių imuninių kompleksų susidarymą, apskaičiuotos kinetinės MAK ir rCMY-34 sąveikos konstantos (3.15 lentelė). Nustatytos MAK 26C9, 5C12 ir 21C12 afiniškumo konstantos (K_d) reikšmės siekė atitinkamai 5,51, 2,98 ir 1,7 nM, patvirtinant netiesiogine IFA gautus rezultatus, kurie parodė didelį MAK giminingumą rCMY-34 (3.13

lentelė). Tai parodo ir nustatytos aukštos pusiausvyros asociacijos konstantos (k_a) vertės, kurios siekė nuo $1,25 \cdot 10^4$ iki $4,32 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (3.15 lentelė).

Kinetinius matavimus atliko dr. Ieva Plikusienė, dokt. Silvija Juciūtė ir dokt. Miglė Stančiauskaitė (VU, Chemijos ir geomokslų fakultetas, Chemijos institutas).

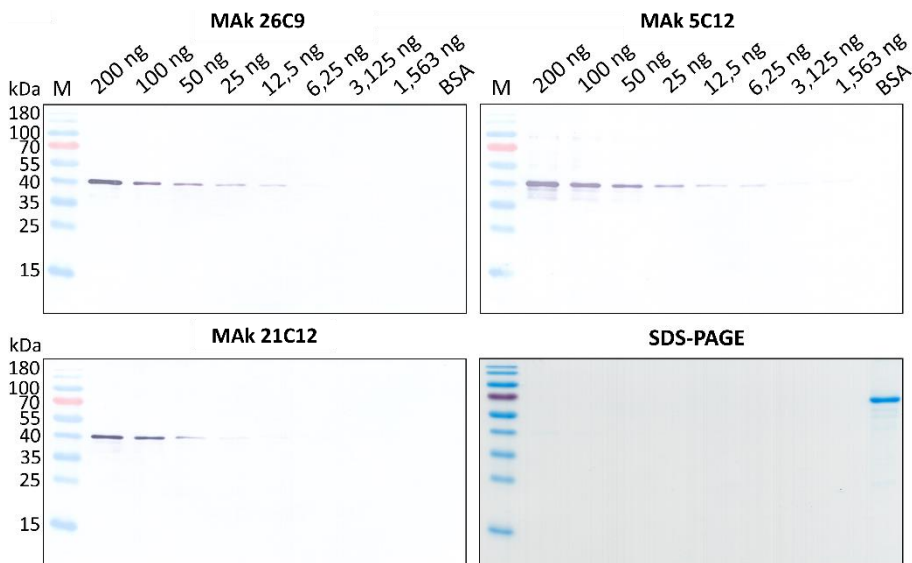


3.40 pav. MAk 26C9, 5C12 ir 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ tyrimas spektrine elipsometrija. **(A)** MAk ir rCMY-34 sąveikos tyrimui naudoto imunosensoriaus schematinis vaizdas. 11-MUA – 11-merkaptoundekano rūgštis. Paveikslas sukurtas su *BioRender.com*. **(B)** Nustatyta MAk ir rCMY-34 sąveika, pritaikius dviejų žingsnių kinetinės sąveikos modelį. Kreivė nurodo modelį, aplink kreivę išsibarstę taškai atitinka eksperimentinius rezultatus.

3.15 lentelė. Nustatytos MAk 26C9, 5C12 ir 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ sąveikos su rCMY-34 kinetinės konstantos

MAk klonas	$k_a, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	k_d, s^{-1}	k_r, s^{-1}	K_a, M^{-1}	K_d, M
26C9	$4,32 \cdot 10^4$	$2,38 \cdot 10^{-4}$	$2,49 \cdot 10^{-5}$	$1,82 \cdot 10^8$	$5,51 \cdot 10^{-9}$
5C12	$1,25 \cdot 10^4$	$3,72 \cdot 10^{-5}$	$1,03 \cdot 10^{-5}$	$3,36 \cdot 10^8$	$2,98 \cdot 10^{-9}$
21C12	$2,29 \cdot 10^4$	$3,89 \cdot 10^{-5}$	$1,21 \cdot 10^{-5}$	$5,89 \cdot 10^8$	$1,70 \cdot 10^{-9}$

MAk 26C9, 5C12 ir 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ detaliau apibūdinti IB metodu, įvertinant rekombinantinės ir natūralios CMY-34 β-laktamazės nustatymo jautrumą. Skirtingi rCMY-34 baltymo ar natūralią CMY-34 β-laktamazę produkujančio *C. portucalensis* lizato kiekiai buvo frakcionuoti SDS-PAGE metodu, toliau atliekant įprastas IB procedūras. Jautrumu laikytas mažiausias baltymų ar lizato kiekis takelyje, kuriam esant išryškėjo vizualiai matoma CMY-34 juosta. Nustatyta, kad IB jautrumas, naudojant MAk 26C9 yra 6,25 ng, MAk 5C12 – 1,6 ng ir MAk 21C12 – 12,5 ng rCMY-34 baltymo (3.41 pav.). Visi tirti MAk gebėjo nustatyti natūralią CMY-34 β-laktamazę, kai mėginyje buvo 78 ng *C. portucalensis* lizato baltymų (11 priedas).

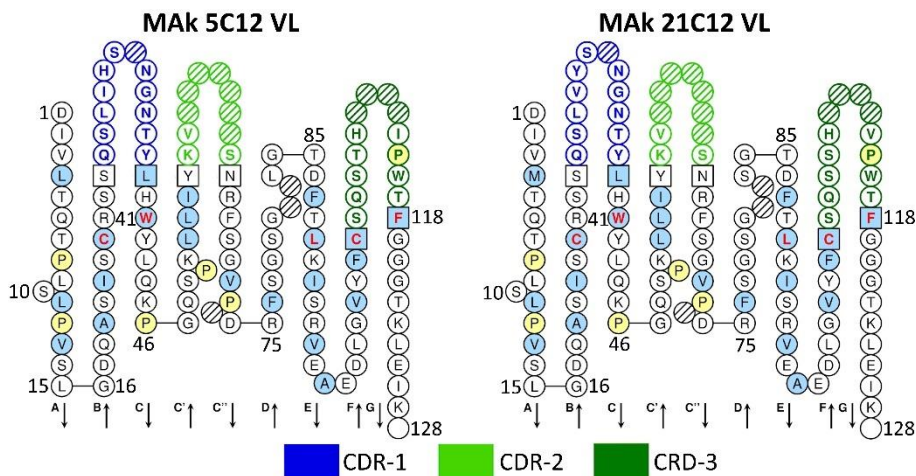


3.41 pav. MAk 26C9, 5C12 ir 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ reaktyvumo su skirtingais rCMY-34 baltymo kiekiais tyrimas IB metodu. Į takelį užnešta nuo 1,563 iki 200 ng rCMY-34 baltymo. Jaučio serumo albuminas (BSA) naudotas kaip neigama kontrolė. M – molekulinės masės standartas.

Tęsiant MAk 26C9, 5C12 ir 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ apibūdinimo darbus, remiantis rezultatų 3.1.9 skyriuje aprašyta metodika, nustatytos antikūnų VH ir VL sritys. Identifikuotų VL sekų pavyzdžiai pateikti 3.42 paveiksle (likusios nustatytos antikūnų sekos nėra atskleidžiamos). Atlikus VH ir VL sekų analizę, nustatyti 1–3 ar. skirtumai antikūnų CDR-1 ir CDR-3 regionuose. Taigi, šie sekoskaitos rezultatai patvirtina I-ai grupei priklausančių ir panašiomis savybėmis pasižyminčių MAk kloninius skirtumus. Nustatytos MAk 21C12 VH ir VL regionų sekos pateiktos į ABCD duomenų bazę [154] (<https://web.expasy.org/abcd/>), suteikiant identifikacijos numerį ABCD_BD769.

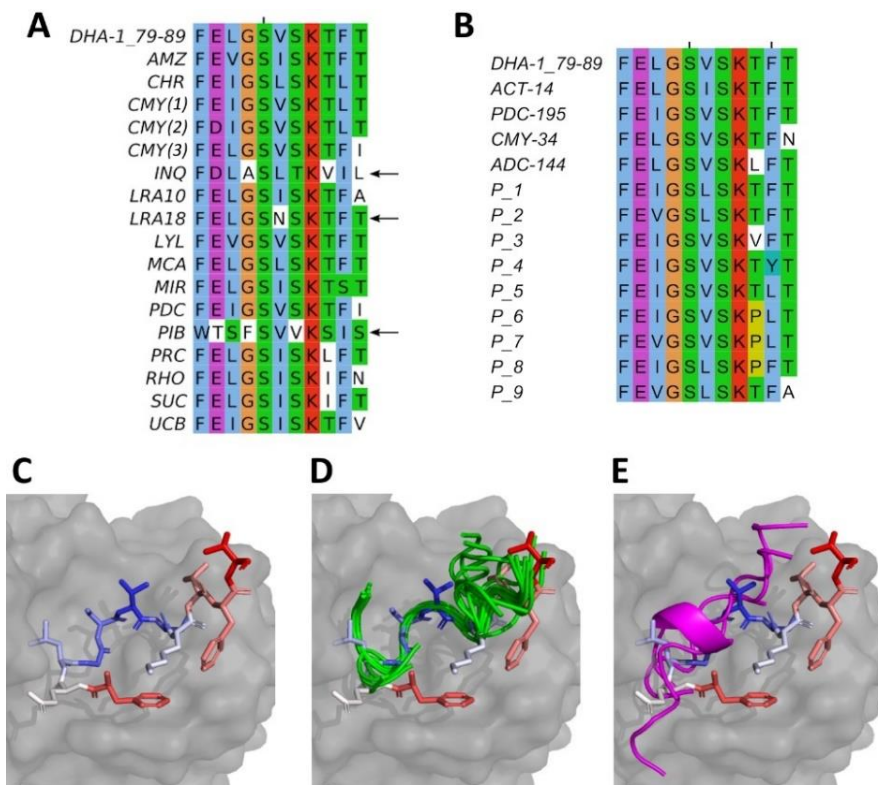
Kitame etape, I-os grupės MAk buvo detaliau apibūdinti *in silico*, įvertinant potencialų MAk reaktyvumą su likusiomis eksperimentiškai

netestuotomis C klasės β -laktamazių šeimomis ar jų aleliniais variantais. Šiuo tikslu, analizei buvo atrinkta 17-a konservatyvių β -laktamazių regionų, atpažįstamų I-os grupės MAK (3.43 A pav.). Ankstesnės analizės metu pastebėta, jog eksperimentiškai testuoti sintetiniai peptidai, su kuriais MAK reaktyvumas buvo nustatytas, pasižymi C-galo panašumu (3.43 B pav.). Atrinkti netestuoti peptidai taip pat pasižymi dideliu ar. sekos panašumu su eksperimentiškai testuotais peptidais (3.43 pav. A, B). Taigi, siekiant įvertinti I-os grupės MAK reaktyvumą su netestuotais peptidais, atliktas MAK ir peptidų sąveikos modeliavimas, panaudojant nustatytas MAK 21C12 VH ir VL domenų sekas. Pasitelkiant *AlphaFold2* [140], [141], [142], kiekvieno peptido ir MAK sąveikos atveju buvo sugeneruota po 6000 modelių, iš kurių atrinkti tik aukščiausius patikimumo įverčius turintys MAK-peptidų sąveikos modeliai (12 priedas). Daugumoje atrinktų modelių peptidų jungimosi su antikūno variabiliiais domenais orientacija buvo panaši, lyginant su DHA-1 79–89 ar. peptido, atitinančio I-os grupės MAK epitopą, sąveika (3.43 pav. C, D).



3.42 pav. MAK 5C12 ir 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ VL regionų vizualizacija. Žydros spalvos pozicijos nurodo hidrofobines ar. arba triptofaną (W). Raudonos spalvos raidėmis žymimos penkios konservatyvios variabiliojo domeno pozicijos. Inkarinės sritys žymimos kvadratais. Užbrūkšniuotos pozicijos žymi tarpus, remiantis *IMGT* būdingu variabiliojo domeno išdėstymu. Geltonos spalvos pozicijos žymi proliną (P). Rodyklės nurodo β -klostes ir jų kryptį. Sekos analizuotos su *IMGT/DomainGapAlign* įrankiu [155], [156], vizualizacija sudaryta su *IMGT/Collier-de-Perles* [152], [153].

Didžiausi sąveikos skirtumai matomi peptidų C-gale. Svarbu paminėti, jog nedideli ar. skirtumai eksperimentiškai testuotų peptidų C-gale MAK sąveikos su šiais peptidais nesutrikdė (3.39 pav., 3.43 B pav.). Tačiau, LRA18, INQ ir PIB peptidų atveju, patikimų modelių sugeneruoti nepavyko (3.43 E pav., 12 priedas).



3.43. pav. Mak 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ sąveikos su β -laktamazių peptidais modeliavimo rezultatai. **(A)** Eksperimentiškai netestuotų, įvairias C klasės β -laktamazių šeimas atitinkančių peptidų ir DHA-1 79–89 ar. regiono, atitinkančio I-os grupės MAK epitopą, palyginys. Ar. pozicijos nuspalvintos pagal *Clustal X* žymėjimą. Rodyklėmis pažymėti peptidai, su kuriais gauti nepatikimi MAK-peptido sąveikos modeliai. **(B)** Eksperimentiškai testuotų β -laktamazių ir sintetinių peptidų, atitinkančių įvairių C klasės β -laktamazių šeimų konservatyvias sritis, palyginys. Ar. pozicijos nuspalvintos pagal *Clustal X* žymėjimą. **(C)** Su *AlphaFold2* sugeneruotas DHA-1 peptido (79–89 ar.) sąveikos su MAK VH and VL domenais modelis. Antikūnas žymimas pilkai, peptidas nuspalvintas pagal *AlphaFold2* spėjamas ar. padėties patikimumo (pLDDT) vertes: ryškiai raudona, kai pLDDT < 50 (nepatikimi rezultatai), tamsiai mėlyna, pLDDT > 90 (patikimi rezultatai), balta ir šviesios spalvos, kai pLDDT tarp šių verčių. **(D)** Eksperimentiškai netestuotų β -laktamazių peptidų sąveikos su antikūno VH ir VL domenais modeliai. Peptidai, su kuriais sugeneruoti patikimi modeliai (nuspalvinti žaliai) jungiasi prie variabiliųjų domenų panašiu erdviiniu išsidėstymu kaip ir DHA-1 peptidas. Peptidams, su kuriais sugeneruoti nepatikimi modeliai **(E)** (nuspalvinti rožine spalva), būdinga kitokia nei DHA-1 peptido jungimosi orientacija.

Išanalizavus peptidų ar. sekas (3.43 A pav., pažymėta rodyklėmis), šiems peptidams būdingi ar. akirtumai, kurie nebūdingi kitiems atrinktiems β -laktamazių peptidams. Pavyzdžiui, LRA18 atitinkantis peptidas 6-oje

pozicijoje turi hidrofilinę asparagino (N) ar. liekaną. Tuo tarpu likę peptidai šioje pozicijoje turi hidrofobines valino (V), leucino (L) arba izoleucino (I) ar. liekanas. INQ ir PIB β -laktamazių peptidai pasižymi dar didesniais ar. skirtumais (3.43 A pav.). Modeliavimą atliko dr. Justas Dapkūnas (VU GMC BTI).

Taigi, išanalizavus modeliavimo rezultatus ir atsižvelgiant į modeliavimui naudotų β -laktamazių peptidų ar. sekos panašumus su eksperimentiškai testuotų peptidų sekomis, galima daryti prielaidą, jog I-os grupės MAk galėtų atpažinti konservatyvias sritis daugumoje β -laktamazių. Taigi, šie MAk galėtų būti universalus įrankis daugelio AmpC β -laktamazių nustatymui.

REZULTATŲ APTARIMAS

Bakterijų sparčiai įgijamo atsparumo β -laktaminiams antibiotikams problema kelia grėsmę žmonių, naminių ir laukinių gyvūnų sveikatai visame pasaulyje [161]. Perteklinis antibiotikų naudojimas sveikatos priežiūros įstaigose ir gyvulininkystėje yra siejamas su atsparumo antibiotikams mechanizmų atsiradimu ir plitimu žmogaus gyvenamojoje aplinkoje. Sveikatos priežiūros įstaigos, žemės ūkio sektorius bei nuotekos ir jų valymo įrenginiai yra laikomi pagrindiniais antibiotikams atsparių bakterijų šaltiniais [162], [163].

β -laktamazės yra natūraliai gamtoje bakterijų sintetinami fermentai, kurie mikroorganizmams suteikia atsparumą natūraliai aplinkoje sutinkamiems β -laktaminiams junginiams. Ekologiniu požiūriu, β -laktamazių sintezė daro poveikį ekosistemoms ir žmonių sveikatai, kadangi yra siejama su bakterijų kolonizacija ir atsparumo genų perdavimo procesu. Nustatyta, kad β -laktamazių sintezė yra pagrindinis atsparumo β -laktaminiams antibiotikams mechanizmas gramneigiamose bakterijose [164], [165]. PSO bei Ligų kontrolės ir prevencijos centras pabrėžia, kad β -laktamazės produkuojančios gramneigiamos bakterijos kelia grėsmę žmonių sveikatai visame pasaulyje [15], [164]. Svarbu ir tai, jog atsparumo antibiotikams profilis skirtinguose geografiniuose regionuose skiriasi. Nepaisant to, spartus naujų atsparumo mechanizmų plitimas į kitus regionus išlieka rimta grėsme žmonių sveikatai [43]. Vienas iš pavyzdžių – platų β -laktaminių antibiotikų spektrą hidrolizuojančią NDM-1 β -laktamazę koduojančio geno *bla*_{NDM-1} išplitimas. NDM-1 pirmą kartą identifikuota 2006 m., tuomet jos išplitimas buvo apribotas tik Indijos teritorijoje [64], [166], [167]. Dėl antibiotikams atsparių bakterijų sukeltomis infekcijomis sergančių žmonių migracijos į kitus geografiškai nutolusius regionus, per mažiau nei 5 metus *bla*_{NDM-1} išplito po visą pasaulį [168]. Šis pavyzdys demonstruoja atsparumo antibiotikams mechanizmų, tokių kaip β -laktamazių sintezė, identifikavimo ir paplitimo stebėsenos svarbą [43]. Taigi, atsparumo antibiotikams profilio nustatymas skirtinguose regionuose ar šalyse gali suteikti naudingos informacijos, prognozuojant kylančias atsparumo antibiotikams grėsmes, vertinant gydymui naudojamų antimikrobinių vaistų veiksmingumą ir tinkamumą, parenkant konkrečiam regionui tinkamus ir nerekomenduotinus antibiotikus bei sudarant naujas gydymo strategijas [169].

AmpC β -laktamazės, yra viena iš kliniškai svarbiausių β -laktamazių grupių. Šios, dažniausiai gramneigiamų bakterijų chromosominiuose genuose koduojamos cefalosporinazės, lemia bakterijų atsparumą cefalosporinams ir šių antibiotikų bei β -laktamazių slopiklių kombinacijoms. Būtent cefalosporinai yra antra pagal dydį žmonių ir naminių gyvūnų infekcinių ligų gydymui naudojamų β -laktamų grupė [1]. Tuo tarpu metalo β -laktamazės priklausančios NDM šeimos karbapenemazės geba hidrolizuoti daugelį šiuo metu sukurtų bei licencijuotų β -laktamų ir yra atsparios visų įprastai medicinoje naudojamų β -laktamazių slopiklių poveikiui [46], [70]. Tačiau

detalus AmpC paplitimas iki šiol nėra ištirtas. Susiduriama su AmpC produkuojančių bakterijų paplitimo tyrimų trūkumu bei ribotomis diagnostinių laboratorijų galimybėmis, identifikuojant šį atsparumo mechanizmą bakterijų izoliatuose [97]. Negana to, β -laktamazių nustatymą apsunkina bakterijų gebėjimas vienu metu sintetinti kelias skirtingas β -laktamazes, pavyzdžiui, įvairių AmpC variantų ir padidinto spektro β -laktamazių kombinacijas [170]. Remiantis BLDB duomenų baze (pagal 2025 m. rugpjūčio mėn. informaciją) [2], šiuo metu identifikuota daugiau nei 6780 AmpC alelinių variantų. Taigi, AmpC identifikuojančių metodų trūkumas bei auganti šių β -laktamazių įvairovė apsunkina šių baltymų nustatymą. Fenotipiniai ar molekuliniai metodai, pavyzdžiui, PGR, nėra diagnostinėse laboratorijose rutiniškai naudojami AmpC nustatymui bakterijų izoliatuose [171]. Tačiau literatūroje aprašyti keli daugybinės PGR variantai, skirti AmpC koduojančių genų nustatymui. Pavyzdžiui, Mlynarcik ir kolegų sukurta PGR sistema, kurioje naudojamos 67 pradmenų poros, leidžiančios detektuoti 12 AmpC šeimų [129]. Perez-Perez ir Hanson aprašyta MOX, CMY, LAT, DHA, ACC, MIR, ACT ir FOX šeimoms priklausančių 29 β -laktamazių variantų nustatymui skirta PGR sistemą [97]. Pastarąją šiuo metu priimta laikyti auksiniu AmpC koduojančių genų nustatymo standartu [172], [173]. Vėliau aprašyta panaši, tačiau patobulinta PGR sistema, leidžianti nustatyti 175 AmpC β -laktamazių alelinius variantus [174]. Tačiau tokių daugybinių PGR sistemų vystymą riboja sudėtingas pradmenų kūrimo procesas bei gaunami klaidingai teigiami testavimo rezultatai [172]. Svarbu ir tai, jog sukurtos PGR sistemos negeba nustatyti visų ar daugumos šiuo metu identifikuotų AmpC šeimų ir jų alelinių variantų.

Klinikiniu ir epidemiologiniu požiūriu, AmpC ir NDM β -laktamazių nustatymui skirti molekuliniai įrankiai ir imunologiniai analizės metodai yra svarbūs efektyvaus infekcinių ligų gydymo užtikrinimui bei detalesniam β -laktamazių paplitimo tyrimams. β -laktamazių detekcijai gali būti naudojami joms specifiški MAK. Todėl, šiame darbe MAK kūrimui, kaip diagnostinis taikiny, pagal aktualumą ir svarbą buvo pasirinkta AmpC β -laktamazių grupė bei jai priklausančios, mažai ištirtos ACT-14, PDC-195, CMY-34 β -laktamazės ir pasirinkta viena dažniausiai identifikuojamų metalo β -laktamazių – NDM-1. Tai β -laktaminį žiedą turinčius antibiotikus hidrolizuojantys bakterijų virulentiškumo veiksniai [44]. Nors β -laktamazių sintezė išlieka pagrindiniu gramneigiamų bakterijų atsparumo β -laktamams mechanizmu, dažnais atvejais bakterijų atsparumą lemia kelių skirtingų atsparumo mechanizmų kombinacijos, pavyzdžiui, β -laktamazių sintezė ir pernašos sistemų išreguliavimas. Negana to, bakterijų atsparumo antibiotikams profilio nustatymą apsunkina sparčiai plintantis daugybinis atsparumas β -laktamams, kurį lemia kelių tos pačios ar skirtingų klasių β -laktamazių sintezė [175].

Taigi, šio darbo tikslas buvo sukurti β -laktamazėms specifiškus MAK, juos detalai apibūdinti ir įvertinti jų tinkamumą šių fermentų nustatymui. MAK kūrimui pasitelktos dvi strategijos: pirmąją siekta sukurti ACT, PDC, CMY ir

NDM β -laktamazių šeimoms priklausančioms ACT-14, PDC-195, CMY-34 ir NDM-1 variantams specifiskus MAK. Taikant antrąją strategiją, siekta kryptingai sukurti plačią reaktyvumą su AmpC β -laktamazėmis pasižyminčius MAK, jų kūrimui panaudojant dideliu konservatyvumu tarp AmpC pasižyminčią DHA-1 β -laktamazės 17 ar. ilgio seką.

Taikant pirmąją MAK kūrimo strategiją, imunogenais naudojant *E. coli* susintetintas rekombinantines β -laktamazes, sukurtos 4 MAK kolekcijos (viso 60 hibridomų linijų) prieš ACT-14, PDC-195, CMY-34 ir NDM-1 baltymus. Remiantis MAK apibūdinimo rezultatais, detalesniams tyrimams ir išbandymui imunologiniuose metoduose, atrinktos potencialios MAK poros. Atrinktų porų MAK prieš ACT-14 kryžminio reaktyvumo tyrimas parodė MAK 1F5 reaktyvumą su rCMY-34 β -laktamaze. Tuo tarpu atrinktų porų MAK 16F6 ir 11H4 prieš PDC-195 reagavo su rNDM-1 baltymu. MAK 9D2 prieš CMY-34 pasižymėjo kryžminiu reaktyvumu su rPDC-195. Ištyrus MAK prieš NDM-1 kryžmines reakcijas, nustatytas MAK 3F10 reaktyvumas su rPDC-195. Nustatytos kryžminės reakcijos gali būti siejamos su tirtų β -laktamazių ar. sekos panašumais. ACT-14, PDC-195 ir CMY-34 β -laktamazės priklauso tai pačiai C klasei ir šie baltymai tarpusavyje pasižymi 42–76 % ar. sekos homologija. Atrinktų porų MAK kryžminio reaktyvumo savybės papildomai įvertintos nustatant MAK atpažinimo regionus (epitopus) ir atliekant šių regionų sekos palyginimą tarp skirtingų tos šeimos β -laktamazių. IB metodu tiriant *E. coli* susintetintus arba sintetinius β -laktamazių fragmentus, pavyko sėkmingai nustatyti tik dalies sukurtų MAK epitopus. Šio tyrimo rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog dalis sukurtų MAK atpažįsta linijinius epitopus, o pastarieji gali būti identifikuoti taikant IB metodą. Nustatytų epitopų analizė parodė potencialų MAK reaktyvumą su ACT, PDC, CMY ir NDM β -laktamazių šeimų aleliniais variantais. Tačiau, šio darbo metu dalies MAK atpažinimo regionų, naudojant trumpintus β -laktamazių fragmentus, nustatyti nepavyko. Galimai šie antikūnai atpažįsta erdvinis epitopus, todėl antikūno ir antigeno sąveikai reikalinga tretinė antigeno struktūra. Pastaroji yra suardoma, padalijant antigeną į atskirus baltymo fragmentus. Tokių nuo baltymo erdvinės struktūros priklausomų epitopų nustatymui ateityje būtų galima pasitelkti kitas metodikas, tokias kaip: kristalografija, krioelektroninė mikroskopija ar panaudojant bioinformatinius metodus [176].

Detali atrinktų porų MAK 1F5 prieš ACT-14, MAK 3F10, 2C1 ir MAK 5F7 prieš NDM-1 epitopų analizė atskleidė, jog identifikuotos atpažinimo sritys pasižymi dideliu ar. sekos panašumu tarp atitinkamų ACT ir NDM šeimos fermentų. Šiame darbe eksperimentiškai parodyta, kad atrinkta MAK 9D2 ir 2E11 pora prieš CMY-34 pasižymi dideliu giminingumu CMY β -laktamazėms. Atlikus MAK 9D2 epitopo analizę, nustatyta, kad šis antikūnas pasižymi plataus reaktyvumo su CMY šeimos fermentais savybėmis. Tuo tarpu MAK 2E11 prieš CMY-34 atpažinimo srities eksperimentiškai nustatyti nepavyko, todėl, pasitelkus bioinformatinius metodus, atliktas MAK 2E11 ir CMY-34 sąveikos modeliavimas *in silico*. Modeliavimui panaudotos šio

darbo metu nustatytos MAK 2E11 sunkiosios ir lengvosios grandinių variabilijų sričių sekos. Remiantis patikimiausiu MAK ir CMY-34 sąveikos modeliu, atrinktas tikėtinas šio antikūno epitopas. Pastarąjį sudaro trys skirtinguose CMY-34 regionuose išsidėstę, tačiau erdviškai greta esantys, segmentai. Kaip ir MAK 9D2 epitopo atveju, numanomam MAK 2E11 epitopui būdingas didelis konservatyvumas tarp CMY šeimos β -laktamazių. Taigi, epitopų analizės rezultatai parodo sukurtų MAK potencialiai platų reaktyvumą su β -laktamazėmis, tačiau modeliavimu ir sekų analize pagrįstą MAK reaktyvumo vertinimą ateityje reikėtų papildomai pagrįsti eksperimentiškai, MAK testuojant su rekombinantinėmis β -laktamazėmis arba β -laktamazes produkduojančiais bakterijų izoliatais.

Šiuo metu susirūpinimą kelia ne tik per didelis ir netinkamas antibiotikų vartojimas, tačiau vis daugiau dėmesio susilaukia AMR paplitimo ir perdavimo tarp žmonių ir gyvūnų mechanizmai. Manoma, kad tarp žmonių, naminių ir laukinių gyvūnų plintantys AMR mechanizmai, įskaitant β -laktamazių sintezę, yra glaudžiai susiję [161]. Taip pat parodyta, jog AMR plitimas tarp komensaliųjų žmogui ir gyvūnams būdingų mikroorganizmų gali būti siejamas su maisto grandinėmis [177]. PSO sudarytame antibiotikams atsparių prioritetinių patogenų sąrašė pateiktos gramneigiamos bakterijos, tokios kaip: *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. ir *Serratia* spp., yra išvysčiusios įvairius atsparumo antibiotikams mechanizmus. PSO šias bakterijas priskiria aukščiausio prioriteto patogenų, keliančių didžiausią grėsmę sveikatos priežiūros sistemai, grupei [14]. O AmpC ir NDM β -laktamazės ir yra išplitusios tarp šių prioritetinių patogenų. Sintetindamos AmpC arba padidinto spektro β -laktamazes, šios bakterijos įgija atsparumą naujausiems trečios kartos cefalosporinams. Todėl, šis procesas kelia grėsmę plačiai paplitusių infekcinių ligų išgydymo galimybei. Manoma, kad ateityje rutininės intervencinės procedūros, pavyzdžiui, įprastos chirurginės operacijos ar vėžio chemoterapija, gali tapti itin rizikingomis paciento gyvybei [5]. Nepaisant kylančio susirūpinimo, Klinikinių laboratorinių standartų institutas iki šiol nėra patvirtinęs AmpC nustatymui skirtų standartizuotų metodų [90], [178]. Tačiau literatūroje aprašyta keletas AmpC nustatymo rekomendacijų. Pavyzdžiui, rekomenduojama naudoti AmpC diskų difuzijos, augimo slopinimo su boro rūgštimi arba antibiotikų gradiento testus [100], [178]. Metalų β -laktamazių, įskaitant NDM šeimą, nustatymas yra standartizuotas ir taikomas klinikinėje diagnostikoje [100].

AmpC nustatymo rekomendacijų ir metodų trūkumas parodo tikslų ir nesudėtingų AMR detekcijos metodų poreikį. Šiame darbe pademonstruotas galimas naujai sukurtų MAK prieš ACT-14, PDC-195, CMY-34 ir NDM-1 β -laktamazes pritaikymas antibiotikams atsparių bakterijų izoliatų nustatymui, MAK išbandant įvairiuose imunologinių detekcinių metodų formatuose: kiekybinėje dviepitopėje IFA, imunochromatografiniame teste ir TPX technologija paremtoje diagnostinėje platformoje. Šiuo darbu parodyta, kad sukurtos sistemos gebėjo nustatyti visus CMY teigiamus izoliatus (iš viso 8), produkduojančius CMY-2, CMY-4, CMY-6, CMY-16, CMY-34 ir vieną

nepatikslintą CMY variantą. NDM-1 specifiški MAK sistemose nustatė visus NDM teigiamus izoliatus (iš viso 9), kuriuose identifikuoti NDM-1 ir NDM-5 variantai. Rekombinantinėmis ACT-14 ir PDC-195 β -laktamazėmis praturtinto *E. coli* lizato testavimas parodė, jog MAK prieš ACT-14 ir PDC-195 dviepitopėje IFA geba nustatyti β -laktamazes baltymų mišinyje, taip imituojuojant antibiotikams atsparių bakterijų mėginius.

Imunologiniai β -laktamazų nustatymu pagrįsti metodai galėtų būti alternatyva šiuo metu naudojamiems β -laktamazių nustatymo metodams. Šiame darbe MAK buvo išbandyti kiekybinės dviepitopės IFA formate. Tai paprastas, greitas, jautrus ir patikimas analizės metodas, kuris jau kelis dešimtmečius išlieka auksiniu farmakologinės ir klinikinės diagnostikos standartu [179]. Šiuo metu komerciškai prieinamas tik NDM-1 nustatymui šlapimo, kraujo serumo ar plazmos mėginiuose skirtas dviepitopės IFA testas (*Cusabio Technology LLC*, Kinija), kurio jautrumas siekia iki 3,12 ng/mL analitės. Komercinių ACT, PDC ar CMY nustatymui skirtų testų rinkoje nėra. Tačiau mokslinėje literatūroje aprašyta keletas antikūnų prieš C klasės β -laktamazes kūrimo ir taikymo šių baltymų nustatymui pavyzdžių. Vienas iš jų – CMY-2 ir ACT-1 C klasės β -laktamazes bakterijų izoliatuose nustatanti dviepitopės IFA sistema, kurioje panaudojami prieš CMY-2 sukurti triušio polikloniniai antikūnai [180]. Nanokūneliai (angl., *nanobodies*) prieš CMY-2 taip pat sėkmingai pritaikyti CMY-2 nustatymui bakterijose, taikant dviepitopės IFA formatą [181]. Šiuo metu komerciškai prieinami triušio polikloniniai antikūnai prieš NDM-1 β -laktamazę (NBP1-77688, Novus Biologicals, JAV) ir PDC β -laktamazę (MBS1493275, MyBioSource, JAV), kurie gali būti panaudoti IFA ir IB metodams.

Greitajai AMR diagnostikai taikomi keli komerciniai pagrindines karbapenemazes ir padidinto spektro β -laktamazes bakterijų izoliatuose nustatantys ir 96–99 % jautrumu bei 100 % specifiškumu pasižymintys imunochromatografijos testai. Šie testai skirti NDM, IMP, VIM, OXA-48, KPC ir CTX-M tipo β -laktamazių nustatymui ir jų diferenciacijai [109], [110], [111], [112]. Nors NDM nustatymui skirti greitieji testai jau yra sukurti, tačiau AmpC, pavyzdžiui, ACT, PDC ar CMY tipo β -laktamazių nustatymo testai iki šiol nėra aprašyti ar komercializuoti.

TPX technologija sėkmingai pritaikyta greitajai kvėpavimo ir virškinamojo trakto infekcijų sukėlėjų diagnostikai, panaudojant *mariPOC*[®], bei bakterijų antimikrobinio atsparumo tyrimams skirtą *mariAST*[®] automatizuotas sistemas (*ArcDia Oy Ltd*, Suomija) [116], [117], [118], [182]. Tačiau, ši technologija β -laktamazių nustatymui bakterijų mėginiuose iki šiol nebuvo išbandyta. Šiame darbe buvo parodytas naujai sukurtų MAK prieš β -laktamazes universalumas ir pritaikomumas skirtinguose analitinių metodų formatuose, įskaitant ir TPX technologija pagrįstą sistemą. Pastarojoje išbandant ACT-14, PDC-195, CMY-34 ir NDM-1 specifiškus MAK, analitinių sistemų jautrumas siekė nuo 0,07 iki 1,9 ng/mL atitinkamai rACT-14, rPDC-195, rCMY-34 ir rNDM-1 baltymams. TPX sistemos su MAK prieš CMY-34 ir NDM-1 gebėjo nustatyti visus testuotus CMY ir NDM teigiamus bakterijų

izoliatas. Svarbu paminėti, jog išbandytos sistemos nebuvo optimizuotos, taigi, jų optimizavimas galimai leistų padidinti jų jautrumą. Taip pat išsamesnei analizei reikalingas papildomas šių sistemų testavimas su didesne β -laktamazės produkujančių izoliatų įvairove.

Diagnostikai taip pat gali būti naudojami genų inžinerijos metodais sukonstruoti rekombinantiniai antikūnai. Šiame darbe nustatytos MAK 9D2 ir 2E11 poros prieš CMY-34 bei MAK 26C9, 5C12 ir 21C12 prieš universalią β -laktamazių seką variabiliosios sritys ne tik eksperimentiškai patvirtina šių antikūnų kloninius skirtumus, tačiau ateityje gali būti panaudotos kuriant įvairių formatų rekombinantinius antikūnus prieš β -laktamazės – pavyzdžiui, konstruojant β -laktamazėms specifiskus viengrandžius variabiliuosius antikūnų fragmentus (angl., *single-chain variable fragment*, scFv) ar ant jų virusus panašių dalelių (angl., *virus-like particles*, VLP) eksponuotus, multimerinius scFv [183]. Tokie antikūnai galėtų būti taikomi naujų atsparumo antibiotikams nustatymo metodų kūrimui.

Multimerinės baltymų struktūros, tokios kaip VLP, savo paviršiuje gali eksponuoti svetimų baltymų fragmentus, todėl gali būti panaudotos imunogenų konstravimui, kuomet siekiama padidinti baltymo imunogeniškumą bei kryptingai sukurti norimo specifiskumo MAK prieš pasirinktus antigeno epitopus [184]. Tikslinių epitopų eksponavimui gali būti pritaikytos ne tik VLP, bet ir kiti multimerinės struktūras formuojantys baltymai. Vienas iš jų – bakteriofago vB_EcoS_NBD2 uodegėlės baltymas gp39 [126]. Ankstesniais mūsų ir kolegų tyrimais parodyta, jog skirtingose raiškos sistemose, pavyzdžiui, mielėse ar *E. coli* bakterijose, susintetintas rekombinantinis baltymas gp39 oligomerizuojasi ir savaime formuoja ilgus (iki 3,95 μ m), lanksčius ir stabilus nanovamzdelius, o šios struktūros gali būti panaudotos, kaip svetimų sekų nešikliai [3], [4]. Šiame darbe nanovamzdeliai sėkmingai pritaikyti plataus reaktyvumo MAK prieš AmpC β -laktamazės kūrimui, baltymą gp39 suliejant su itin konservatyviu, t.y., didele homologija tarp AmpC pasižyminčiu DHA-1 β -laktamazės 17 ar. ilgio fragmentu. Svarbu paminėti, kad didelę AmpC β -laktamazių įvairovę gebantys atpažinti MAK bei šiame darbe pristatyta kryptingo specifiskumo universalių antikūnų kūrimo strategija iki šiol nebuvo aprašyta. Sukurtieji MAK atpažino natūralią CMY-34 β -laktamazę bakterijų izoliatai ir gebėjo nustatyti mažus β -laktamazių kiekius, taikant IB metodą. Panaudojant persidengiančius sintetinius peptidus, apimančius konservatyvų DHA-1 17 ar. regioną, nustatytas dideliu giminingumu tarp AmpC pasižymintis 11 ar. ilgio epitopas, kuris gali būti AmpC nustatymo taikiny. Platus MAK reaktyvumas buvo patvirtintas su skirtingų C klasės β -laktamazių šeimų konservatyvius regionus atitinkančiais sintetiniais peptidais. MAK gebėjimas reaguoti su retesnėmis AmpC šeimomis ir jų aleliniais variantais buvo įvertintas *in silico*, sąveikos modeliavimui panaudojant šį konservatyvų β -laktamazių regioną atitinkančius peptidus ir nustatytas MAK 21C12 variabiliųjų domenų sekas. Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą, jog sukurtieji antikūnai reaguoja su daugeliu eksperimentiškai

testuotų sintetinių ir dar netestuotų peptidų, todėl šie MAK galėtų atpažinti daugelį AmpC β -laktamazių.

Plataus reaktyvumo MAK prieš AmpC β -laktamazes apibūdinimo elipsometrinio metodu rezultatai parodė galimą šių antikūnų pritaikomumą imunojutiklių kūrimui. Ankstesni tyrimai parodė sėkmingą elipsometrijos ir plazmonų rezonanso metodais paremtų imunojutiklių taikymą bakterijų nustatymui. Šie detekcinių žymių nereikalaujantys optiniai biojutikliai anksčiau buvo sėkmingai pritaikyti *E. coli*, *Salmonella* sp. ir *Campylobacter jejuni* nustatymui [185], [186], [187], [188].

Taigi, šiame darbe sukurti universalūs, plataus reaktyvumo MAK, gebantys atpažinti konservatyvų AmpC β -laktamazių epitopą, yra vertingas greito ir tikslaus tiesioginio β -laktamazių aptikimo įrankis. Sukurtieji MAK gali būti pritaikyti diagnostikos metodų tobulinimui bei atsparumo antibiotikams stebėsenai gydymo įstaigose, žemės ūkyje ar aplinkoje. Šie antikūnai turi didelį potencialą β -laktamazių epidemiologiniams tyrimams, kadangi su vienu molekulinio įrankiu būtų galima greitai ir paprastai nustatyti didelę AmpC fermentų įvairovę. Tai itin svarbu dabartiniame kontekste, kuomet klinikinė diagnostika susiduria su AmpC detekcijai skirtų įrankių trūkumu [178]. Atsižvelgiant į stebėsenos rezultatus, gali būti teikiamos antibiotikų vartojimo konkrečiuose geografiniuose regionuose rekomendacijos. Tačiau, norint šiuos MAK taikyti β -laktamazių nustatymui, reikalingas detalesnis jų analitinio ir diagnostinio potencialo įvertinimas.

Be šiame darbe aptartų imunologinių detekcijos metodų, literatūroje aprašyti ir kiti biocheminiai, antikūnais ar nukleorūgščių detekcija paremti AmpC nustatymo metodai. Pavyzdžiui, apibūdinti rekombinazės pagausinimo (angl., *recombinase polymerais reaction*), kiekybinės PGR ar DNR mikrogardelių metodai [189], [190], [191]. Aprašytas sėkmingas MALDI-TOF masių spektrometrijos taikymas [192]. Sukurti rekombinantiniais IgG arba triušio polikloniniais antikūnais pagrįsti kiekybinės IFA metodai, skirti CMY-2 nustatymui bakterijų izoliatuose [180], [193]. Literatūroje pateikiamas CMY β -laktamazių neutralizacijos testas, kuriame naudojami triušio antikūnai prieš CMY-2 [194].

Taigi, šiame darbe aprašyti nauji, išsamiai apibūdinti MAK, kurie gali būti pritaikyti β -laktamazių nustatymui ir jų tyrimams. MAK pagrindu sukurtieji imunologiniai analizės metodai turi potencialią diagnostinę vertę bei gali būti panaudoti β -laktamazių paplitimo ir jų perdavimo mechanizmų tyrimams.

IŠVADOS

1. Imunizacijai panaudojus rekombinantines *E. coli* susintetintas β -laktamazes, sukurta 60 hibridomų linijų, sekretuojančių IgG klasės monokloninius antikūnus prieš β -laktamazes: ACT-14 (12 hibridomų), NDM-1 (11 hibridomų), PDC-195 (20 hibridomų) ir CMY-34 (14 hibridomų).
2. Oligomerines nanovamzdelių struktūras formuojantį bakteriofago vB_EcoS_NBD2 uodegėlės baltymą gp39 panaudojant konservatyvaus AmpC β -laktamazių peptido nešiklio, kryptingai sukurta 13 hibridomų linijų, sekretuojančių universalius monokloninius antikūnus.
3. Apibūdinus sukurtuosius monokloninius antikūnus imunocheminiais, fizikiniais ir bioinformatiniais metodais, patvirtintas šių antikūnų giminingumas ir specifiškumas tirtoms β -laktamazėms, nustatyti jų epitopai.
4. Atrinktieji monokloniniai antikūnai tinka β -laktamazių nustatymui, išbandytais imunologiniais analitiniais metodais, kurių jautrumas siekia nuo 17 pg/mL iki 11 ng/mL tikslinio antigeno.
5. Pritaikius imunologinius analitinius metodus β -laktamazes produkuojančių bakterijų izoliatų ar rekombinantinėmis β -laktamazėmis praturtintų bakterijų lizatų tyrimams, patvirtintas sukurtųjų antikūnų diagnostinis potencialas.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] G. A. Jacoby, 'AmpC β -Lactamases', *Clin Microbiol Rev*, vol. 22, no. 1, pp. 161–182, Jan. 2009, doi: 10.1128/CMR.00036-08.
- [2] T. Naas *et al.*, 'Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function', *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 32, no. 1, pp. 917–919, Jan. 2017, doi: 10.1080/14756366.2017.1344235.
- [3] A. Špakova, I. Dalgėdienė, R. Insodaitė, A. Sasnauskienė, A. Žvirblienė, and R. Petraitytė-Burneikienė, 'vB_EcoS_NBD2 bacteriophage-originated polytubes as a carrier for the presentation of foreign sequences', *Virus Res*, vol. 290, p. 198194, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.virusres.2020.198194.
- [4] A. Špakova, E. Šimoliūnas, R. Batiuškaitė, S. Pajeda, R. Meškys, and R. Petraitytė-Burneikienė, 'Self-Assembly of Tail Tube Protein of Bacteriophage vB_EcoS_NBD2 into Extremely Long Polytubes in *E. coli* and *S. cerevisiae*', *Viruses*, vol. 11, no. 3, p. 208, Mar. 2019, doi: 10.3390/v11030208.
- [5] World Health Organization, 'Antimicrobial resistance', <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- [6] C. J. L. Murray *et al.*, 'Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis', *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655, Feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [7] World Health Organization, 'Antimicrobial resistance global report on surveillance : 2014 summary', 2014.
- [8] E. M. Darby *et al.*, 'Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited', *Nat Rev Microbiol*, vol. 21, no. 5, pp. 280–295, May 2023, doi: 10.1038/s41579-022-00820-y.
- [9] E. Christaki, M. Marcou, and A. Tofarides, 'Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence', Jan. 01, 2020, *Springer*. doi: 10.1007/s00239-019-09914-3.
- [10] European Centre for Disease Prevention and Control, 'Surveillance of antimicrobial resistance in Europe – Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017', *Publications Office*, 2018.
- [11] S. Harbarth *et al.*, 'Antimicrobial resistance: one world, one fight!', *Antimicrob Resist Infect Control*, vol. 4, no. 1, p. 49, Dec. 2015, doi: 10.1186/s13756-015-0091-2.
- [12] K. W. K. Tang, B. C. Millar, and J. E. Moore, 'Antimicrobial Resistance (AMR)', *Br J Biomed Sci*, vol. 80, Jun. 2023, doi: 10.3389/bjbs.2023.11387.
- [13] World Health Organization, 'One health', https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1.

- [14] World Health Organization, 'WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action', 2022.
- [15] World Health Organization, 'Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis', 2017, *World Health Organization, Geneva*.
- [16] M. A. Cook and G. D. Wright, 'The past, present, and future of antibiotics', *Sci Transl Med*, vol. 14, no. 657, Aug. 2022, doi: 10.1126/scitranslmed.abo7793.
- [17] S. Walesch *et al.*, 'Fighting antibiotic resistance—strategies and (pre)clinical developments to find new antibacterials', *EMBO Rep*, vol. 24, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.15252/embr.202256033.
- [18] A. Baran, A. Kwiatkowska, and L. Potocki, 'Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race', *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 6, p. 5777, Mar. 2023, doi: 10.3390/ijms24065777.
- [19] D. F. Pancu *et al.*, 'Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity—A Pharmacotoxicological Screening', *Antibiotics*, vol. 10, no. 4, p. 401, Apr. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10040401.
- [20] H. Ullah and S. Ali, 'Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions', in *Antibacterial Agents*, InTech, 2017. doi: 10.5772/intechopen.68695.
- [21] S. B. Levy and B. Marshall, 'Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses', *Nat Med*, vol. 10, no. S12, pp. S122–S129, Dec. 2004, doi: 10.1038/nm1145.
- [22] K. Bush and P. A. Bradford, 'β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview', *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 6, no. 8, p. a025247, Aug. 2016, doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
- [23] J. Acar, 'Broad- and narrow-spectrum antibiotics: an unhelpful categorization', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 3, no. 4, pp. 395–396, Aug. 1997, doi: 10.1111/j.1469-0691.1997.tb00274.x.
- [24] N. N. Mishra *et al.*, 'Daptomycin Resistance in *Enterococci* Is Associated with Distinct Alterations of Cell Membrane Phospholipid Content', *PLoS One*, vol. 7, no. 8, p. e43958, Aug. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0043958.
- [25] J. L. C. Wong *et al.*, 'OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo', *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 3957, Sep. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-11756-y.
- [26] A. E. Ebbensgaard, A. Løbner-Olesen, and J. Frimodt-Møller, 'The Role of Efflux Pumps in the Transition from Low-Level to Clinical Antibiotic Resistance', *Antibiotics*, vol. 9, no. 12, p. 855, Nov. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9120855.
- [27] C. E. Morgan *et al.*, 'Cryoelectron Microscopy Structures of AdeB Illuminate Mechanisms of Simultaneous Binding and Exporting of

- Substrates', *mBio*, vol. 12, no. 1, Feb. 2021, doi: 10.1128/mBio.03690-20.
- [28] F. Baquero and B. R. Levin, 'Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics', *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, no. 2, pp. 123–132, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-00443-1.
- [29] N. G. Bush, I. Diez-Santos, L. R. Abbott, and A. Maxwell, 'Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance', *Molecules*, vol. 25, no. 23, p. 5662, Dec. 2020, doi: 10.3390/molecules25235662.
- [30] R. Bhujbalrao and R. Anand, 'Deciphering Determinants in Ribosomal Methyltransferases That Confer Antimicrobial Resistance', *J Am Chem Soc*, vol. 141, no. 4, pp. 1425–1429, Jan. 2019, doi: 10.1021/jacs.8b10277.
- [31] A. J. Schaefer and G. D. Wright, 'Antibiotic Resistance by Enzymatic Modification of Antibiotic Targets', *Trends Mol Med*, vol. 26, no. 8, pp. 768–782, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.molmed.2020.05.001.
- [32] C. L. Tooke *et al.*, 'β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century', *J Mol Biol*, vol. 431, no. 18, pp. 3472–3500, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
- [33] M. S. Ramirez and M. E. Tolmasky, 'Aminoglycoside modifying enzymes', *Drug Resistance Updates*, vol. 13, no. 6, pp. 151–171, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
- [34] J. Szychowski *et al.*, 'Inhibition of Aminoglycoside-Deactivating Enzymes APH(3')-IIIa and AAC(6')-II by Amphiphilic Paromomycin O2"-Ether Analogues', *ChemMedChem*, vol. 6, no. 11, pp. 1961–1966, Nov. 2011, doi: 10.1002/cmdc.201100346.
- [35] J. M. Munita and C. A. Arias, 'Mechanisms of Antibiotic Resistance', *Microbiol Spectr*, vol. 4, no. 2, Mar. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- [36] P. D. Stapleton and P. W. Taylor, 'Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: Mechanisms and Modulation', *Sci Prog*, vol. 85, no. 1, pp. 57–72, Feb. 2002, doi: 10.3184/003685002783238870.
- [37] K. Bush and G. A. Jacoby, 'Updated functional classification of β-lactamases', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 54, no. 3, pp. 969–976, Mar. 2010, doi: 10.1128/AAC.01009-09.
- [38] N. Kaderabkova, M. Bharathwaj, R. C. D. Furniss, D. Gonzalez, T. Palmer, and D. A. I. Mavridou, 'The biogenesis of β-lactamase enzymes', *Microbiology (N Y)*, vol. 168, no. 8, Sep. 2022, doi: 10.1099/mic.0.001217.
- [39] W. R. Zückert, 'Secretion of Bacterial Lipoproteins: Through the Cytoplasmic Membrane, the Periplasm and Beyond', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1843, no. 8, pp. 1509–1516, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.022.
- [40] K. Alby and M. B. Miller, 'Mechanisms and Detection of Antimicrobial Resistance', in *Principles and Practice of Pediatric*

- Infectious Diseases*, Elsevier, 2023, pp. 1506-1516.e4. doi: 10.1016/B978-0-323-75608-2.00290-1.
- [41] R. P. Ambler, 'The structure of β -lactamases', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, vol. 289, no. 1036, pp. 321–331, May 1980, doi: 10.1098/rstb.1980.0049.
 - [42] P. Harris, 'Clinical Management of Infections Caused by *Enterobacteriaceae* that Express Extended-Spectrum β -Lactamase and AmpC Enzymes', *Semin Respir Crit Care Med*, vol. 36, no. 01, pp. 056–073, Feb. 2015, doi: 10.1055/s-0034-1398387.
 - [43] K. Bush and P. A. Bradford, 'Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens', *Clin Microbiol Rev*, vol. 33, no. 2, Mar. 2020, doi: 10.1128/CMR.00047-19.
 - [44] K. Bush, 'Past and Present Perspectives on β -Lactamases', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 62, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.1128/AAC.01076-18.
 - [45] V. Knott-Hunziker, S. G. Waley, B. S. Orlek, and P. G. Sammes, 'Penicillinase active sites: Labelling of serine-44 in β -lactamase I by 6 β -bromopenicillanic acid', *FEBS Lett*, vol. 99, no. 1, pp. 59–61, Mar. 1979, doi: 10.1016/0014-5793(79)80248-3.
 - [46] gMin Zhang and Q. Hao, 'Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism', *The FASEB Journal*, vol. 25, no. 8, pp. 2574–2582, Aug. 2011, doi: 10.1096/fj.11-184036.
 - [47] Y. He, J. Lei, X. Pan, X. Huang, and Y. Zhao, 'The hydrolytic water molecule of Class A β -lactamase relies on the acyl-enzyme intermediate ES for proper coordination and catalysis', *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, p. 10205, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-66431-w.
 - [48] A. Esposito *et al.*, 'Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cystic Fibrosis Lung over Chronic Infection: A Genomic and Phenotypic Population Study', *Front Microbiol*, vol. 8, Aug. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01590.
 - [49] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 'EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance v 2.0', Jul. 2017. Accessed: Feb. 20, 2025. [Online]. Available: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanism_s_170711.pdf
 - [50] M. Bounthavong, D. Hsu, and M.-C. Hong, 'Ceftolozane/tazobactam: a novel antipseudomonal cephalosporin and β -lactamase-inhibitor combination', *Infect Drug Resist*, p. 215, Nov. 2013, doi: 10.2147/IDR.S36140.
 - [51] S. Lee, L. Teng, N. DiLorenzo, T. A. Weppelmann, and K. C. Jeong, 'Prevalence and Molecular Characteristics of Extended-Spectrum and AmpC β -Lactamase Producing *Escherichia coli* in Grazing Beef

- Cattle', *Front Microbiol*, vol. 10, Jan. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2019.03076.
- [52] M. de Been *et al.*, 'Dissemination of Cephalosporin Resistance Genes between *Escherichia coli* Strains from Farm Animals and Humans by Specific Plasmid Lineages', *PLoS Genet*, vol. 10, no. 12, p. e1004776, Dec. 2014, doi: 10.1371/journal.pgen.1004776.
- [53] D. R. Ibrahim, C. E. R. Dodd, D. J. Stekel, S. J. Ramsden, and J. L. Hobman, 'Multidrug resistant, extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm', *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 92, no. 4, p. fiw013, Apr. 2016, doi: 10.1093/femsec/fiw013.
- [54] A. Bauernfeind, S. Schweighart, and Y. Chong, 'Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins', *Infection*, vol. 17, no. 5, pp. 316–321, Sep. 1989, doi: 10.1007/BF01650718.
- [55] K. S. Rizi *et al.*, 'High prevalence of blaCMY AmpC beta-lactamase in ESBL co-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates in the northeast of Iran', *J Glob Antimicrob Resist*, vol. 22, pp. 477–482, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.jgar.2020.03.011.
- [56] C. De Champs *et al.*, 'Prospective Survey of β -Lactamases Produced by Ceftazidime- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in a French Hospital in 2000', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 46, no. 9, pp. 3031–3034, Sep. 2002, doi: 10.1128/AAC.46.9.3031-3034.2002.
- [57] C. A. Colque *et al.*, 'Longitudinal Evolution of the *Pseudomonas*-Derived Cephalosporinase (PDC) Structure and Activity in a Cystic Fibrosis Patient Treated with β -Lactams', *mBio*, vol. 13, no. 5, Oct. 2022, doi: 10.1128/mbio.01663-22.
- [58] O. Gaillot, 'Novel transferable beta-lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 39, no. 1, pp. 85–87, Jan. 1997, doi: 10.1093/jac/39.1.85.
- [59] M. Alvarez, J. H. Tran, N. Chow, and G. A. Jacoby, 'Epidemiology of Conjugative Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in the United States', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 48, no. 2, pp. 533–537, Feb. 2004, doi: 10.1128/AAC.48.2.533-537.2004.
- [60] C. Hennequin, V. Ravet, and F. Robin, 'Plasmids carrying DHA-1 β -lactamases', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 37, no. 7, pp. 1197–1209, Jul. 2018, doi: 10.1007/s10096-018-3231-9.
- [61] P. A. Bradford, C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush, 'Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein', *Antimicrob*

- Agents Chemother*, vol. 41, no. 3, pp. 563–569, Mar. 1997, doi: 10.1128/AAC.41.3.563.
- [62] T. Palzkill, ‘Metallo- β -lactamase structure and function’, *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1277, no. 1, pp. 91–104, Jan. 2013, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x.
- [63] K. Bush and P. A. Bradford, ‘Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors’, *Nat Rev Microbiol*, vol. 17, no. 5, pp. 295–306, May 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0159-8.
- [64] D. Yong *et al.*, ‘Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{NDM-1}, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 53, no. 12, pp. 5046–5054, Dec. 2009, doi: 10.1128/AAC.00774-09.
- [65] P. Nordmann and L. Poirel, ‘The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide’, *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 20, no. 9, pp. 821–830, Sep. 2014, doi: 10.1111/1469-0691.12719.
- [66] K. M. Kazmierczak *et al.*, ‘Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 60, no. 2, pp. 1067–1078, Feb. 2016, doi: 10.1128/AAC.02379-15.
- [67] M. Dadashi *et al.*, ‘Frequency distribution, genotypes and prevalent sequence types of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among clinical isolates around the world: A review’, *J Glob Antimicrob Resist*, vol. 19, pp. 284–293, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.jgar.2019.06.008.
- [68] J. Cai *et al.*, ‘Genetic and Functional Characterization of *bla*_{CTX-M-199}, a Novel Tazobactam and Sulbactam Resistance-Encoding Gene Located in a Conjugative *mcr-1* -Bearing IncI2 Plasmid’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 61, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.1128/AAC.00562-17.
- [69] T. Bosch *et al.*, ‘Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Dutch Hospital, with Interspecies Transfer of the Resistance Plasmid and Unexpected Occurrence in Unrelated Health Care Centers’, *J Clin Microbiol*, vol. 55, no. 8, pp. 2380–2390, Aug. 2017, doi: 10.1128/JCM.00535-17.
- [70] P. Bocanegra-Ibarias *et al.*, ‘Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying *Enterobacteriaceae* in Mexico’, *PLoS One*, vol. 12, no. 6, p. e0179651, Jun. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0179651.
- [71] G. Tebano *et al.*, ‘Selective reporting of antibiotic susceptibility testing results: a promising antibiotic stewardship tool’, *Expert Rev Anti Infect Ther*, vol. 18, no. 3, pp. 251–262, Mar. 2020, doi: 10.1080/14787210.2020.1715795.

- [72] Md. A. Salam, Md. Y. Al-Amin, J. S. Pawar, N. Akhter, and I. B. Lucy, 'Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing', *Saudi J Biol Sci*, vol. 30, no. 3, p. 103582, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103582.
- [73] F. P. Maurer, M. Christner, M. Hentschke, and H. Rohde, 'Advances in Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory: Implications for Patient Care and Antimicrobial Stewardship Programs', *Infect Dis Rep*, vol. 9, no. 1, p. 6839, Mar. 2017, doi: 10.4081/idr.2017.6839.
- [74] A. Vasala, V. P. Hytönen, and O. H. Laitinen, 'Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance', *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 10, Jul. 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.00308.
- [75] M. Benkova, O. Soukup, and J. Marek, 'Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice', *J Appl Microbiol*, vol. 129, no. 4, pp. 806–822, Oct. 2020, doi: 10.1111/jam.14704.
- [76] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, 'Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.', *Am J Clin Pathol*, vol. 45, no. 4, pp. 493–6, Apr. 1966.
- [77] I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. W. Hancock, 'Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances', *Nat Protoc*, vol. 3, no. 2, pp. 163–175, Feb. 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.
- [78] H. S. Sader and A. C. C. Pignatari, 'E Test: a novel technique for antimicrobial susceptibility testing', *Sao Paulo Medical Journal*, vol. 112, no. 4, pp. 635–638, Dec. 1994, doi: 10.1590/S1516-31801994000400003.
- [79] Z. A. Khan, M. F. Siddiqui, and S. Park, 'Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing', *Diagnostics*, vol. 9, no. 2, p. 49, May 2019, doi: 10.3390/diagnostics9020049.
- [80] I. Gajic *et al.*, 'Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods', *Antibiotics*, vol. 11, no. 4, p. 427, Mar. 2022, doi: 10.3390/antibiotics11040427.
- [81] P. J. Simner *et al.*, 'Multicenter Evaluation of the Acuitas AMR Gene Panel for Detection of an Extended Panel of Antimicrobial Resistance Genes among Bacterial Isolates', *J Clin Microbiol*, vol. 60, no. 3, Mar. 2022, doi: 10.1128/jcm.02098-21.
- [82] J.-S. Kim, G.-E. Kang, H.-S. Kim, H. S. Kim, W. Song, and K. M. Lee, 'Evaluation of Verigene Blood Culture Test Systems for Rapid Identification of Positive Blood Cultures', *Biomed Res Int*, vol. 2016, pp. 1–6, 2016, doi: 10.1155/2016/1081536.
- [83] A. T. Feßler *et al.*, 'Antimicrobial susceptibility testing in veterinary medicine: performance, interpretation of results, best practices and pitfalls', *One Health Advances*, vol. 1, no. 1, p. 26, Nov. 2023, doi: 10.1186/s44280-023-00024-w.

- [84] R. P. Bhattacharyya *et al.*, ‘Simultaneous detection of genotype and phenotype enables rapid and accurate antibiotic susceptibility determination’, *Nat Med*, vol. 25, no. 12, pp. 1858–1864, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41591-019-0650-9.
- [85] M. J. Ellington *et al.*, ‘The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee’, *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 23, no. 1, pp. 2–22, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.cmi.2016.11.012.
- [86] J. Dai, M. Hamon, and S. Jambovane, ‘Microfluidics for Antibiotic Susceptibility and Toxicity Testing’, *Bioengineering*, vol. 3, no. 4, p. 25, Oct. 2016, doi: 10.3390/bioengineering3040025.
- [87] T.-H. Huang, X. Ning, X. Wang, N. Murthy, Y.-L. Tzeng, and R. M. Dickson, ‘Rapid Cytometric Antibiotic Susceptibility Testing Utilizing Adaptive Multidimensional Statistical Metrics’, *Anal Chem*, vol. 87, no. 3, pp. 1941–1949, Feb. 2015, doi: 10.1021/ac504241x.
- [88] J. Ihssen, N. Jovanovic, T. Sirec, and U. Spitz, ‘Real-time monitoring of extracellular ATP in bacterial cultures using thermostable luciferase’, *PLoS One*, vol. 16, no. 1, p. e0244200, Jan. 2021, doi: 10.1371/journal.pone.0244200.
- [89] M. Oviaño, M. Gómara, M. J. Barba, K. Sparbier, Á. Pascual, and G. Bou, ‘Quantitative and automated MALDI-TOF MS-based detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant AAC(6)-Ib-cr in *Enterobacteriaceae*’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 72, no. 10, pp. 2952–2954, Oct. 2017, doi: 10.1093/jac/dkx218.
- [90] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100*, 34th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024.
- [91] A. Bauernfeind, I. Schneider, R. Jungwirth, H. Sahly, and U. Ullmann, ‘A Novel Type of AmpC β -Lactamase, ACC-1, Produced by a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Nosocomial Pneumonia’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43, no. 8, pp. 1924–1931, Aug. 1999, doi: 10.1128/AAC.43.8.1924.
- [92] T. Y. Tan, L. S. Y. Ng, J. He, T. H. Koh, and L. Y. Hsu, ‘Evaluation of Screening Methods To Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 53, no. 1, pp. 146–149, Jan. 2009, doi: 10.1128/AAC.00862-08.
- [93] F. C. Tenover *et al.*, ‘Identification of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* Species Can Potentially Improve Reporting of Cephalosporin Susceptibility Testing Results’, *J Clin Microbiol*, vol. 47, no. 2, pp. 294–299, Feb. 2009, doi: 10.1128/JCM.01797-08.
- [94] F. D. Halstead, G. L. Vanstone, and I. Balakrishnan, ‘An evaluation of the Mast D69C AmpC Detection Disc Set for the detection of inducible and derepressed AmpC β -lactamases’, *Journal of Antimicrobial*

- Chemotherapy*, vol. 67, no. 9, pp. 2303–2304, Sep. 2012, doi: 10.1093/jac/dks170.
- [95] P. R. Ingram, T. J. J. Inglis, T. R. Vanzetti, B. A. Henderson, G. B. Harnett, and R. J. Murray, ‘Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in *Enterobacteriaceae*’, *J Med Microbiol*, vol. 60, no. 6, pp. 715–721, Jun. 2011, doi: 10.1099/jmm.0.029140-0.
 - [96] S. Peter-Getzlaff *et al.*, ‘Detection of AmpC Beta-Lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of Three Phenotypic Confirmation Assays and Genetic Analysis’, *J Clin Microbiol*, vol. 49, no. 8, pp. 2924–2932, Aug. 2011, doi: 10.1128/JCM.00091-11.
 - [97] F. J. Pérez-Pérez and N. D. Hanson, ‘Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR’, *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 6, pp. 2153–2162, Jun. 2002, doi: 10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002.
 - [98] G. Cuzon, T. Naas, P. Bogaerts, Y. Glupczynski, and P. Nordmann, ‘Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM)’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 8, pp. 1865–1869, Aug. 2012, doi: 10.1093/jac/dks156.
 - [99] D. Doyle, G. Peirano, C. Lascos, T. Lloyd, D. L. Church, and J. D. D. Pitout, ‘Laboratory Detection of *Enterobacteriaceae* That Produce Carbapenemases’, *J Clin Microbiol*, vol. 50, no. 12, pp. 3877–3880, Dec. 2012, doi: 10.1128/JCM.02117-12.
 - [100] N. Perween, ‘Phenotypic Methods of Detection of Beta-Lactamases’, in *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria*, Singapore: Springer Nature Singapore, 2022, pp. 193–204. doi: 10.1007/978-981-16-9097-6_12.
 - [101] A. K. Abbas, Lichtman Andrew H, and Pillai Shiv, *Cellular and molecular immunology*, 8th ed. Elsevier Inc., 2015.
 - [102] R. O’Kennedy, C. Murphy, and T. Devine, ‘Technology advancements in antibody purification’, *Antibody Technology Journal*, vol. Volume 6, pp. 17–32, Aug. 2016, doi: 10.2147/ANTI.S64762.
 - [103] G. Köhler and C. Milstein, ‘Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity’, *Nature*, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497, Aug. 1975, doi: 10.1038/256495a0.
 - [104] D. A. Quinteros, J. M. Bermúdez, S. Ravetti, A. Cid, D. A. Allemandi, and S. D. Palma, ‘Therapeutic use of monoclonal antibodies: general aspects and challenges for drug delivery’, in *Nanostructures for Drug Delivery*, Elsevier, 2017, pp. 807–833. doi: 10.1016/B978-0-323-46143-6.00025-7.
 - [105] G. Kwok, T. C. C. Yau, J. W. Chiu, E. Tse, and Y.-L. Kwong, ‘Pembrolizumab (Keytruda)’, *Hum Vaccin Immunother*, vol. 12, no. 11, pp. 2777–2789, Nov. 2016, doi: 10.1080/21645515.2016.1199310.

- [106] S. V. Onrust, H. M. Lamb, and J. A. Barman Balfour, 'Rituximab', *Drugs*, vol. 58, no. 1, pp. 79–88, 1999, doi: 10.2165/00003495-199958010-00009.
- [107] J. J. Gemmete and S. K. Mukherji, 'Trastuzumab (Herceptin): Fig 1.', *American Journal of Neuroradiology*, vol. 32, no. 8, pp. 1373–1374, Sep. 2011, doi: 10.3174/ajnr.A2619.
- [108] S. Chatterjee and S. Mukhopadhyay, 'Recent advances of lateral flow immunoassay components as “point of need”', *J Immunoassay Immunochem*, vol. 43, no. 6, pp. 579–604, Nov. 2022, doi: 10.1080/15321819.2022.2122063.
- [109] J. Hong, D. Kang, and D. Kim, 'Performance Evaluation of the Newly Developed In Vitro Rapid Diagnostic Test for Detecting OXA-48-Like, KPC-, NDM-, VIM- and IMP-Type Carbapenemases: The RESIST-5 O.K.N.V.I. Multiplex Lateral Flow Assay', *Antibiotics*, vol. 10, no. 4, p. 460, Apr. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10040460.
- [110] K. Saito *et al.*, 'Evaluation of NG-Test CARBA 5 for the detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli', *J Med Microbiol*, vol. 71, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.1099/jmm.0.001557.
- [111] M. Sadek, M. Bouvier, A. Kerbol, L. Poirel, and P. Nordmann, 'Evaluation of novel immunological rapid test (K.N.I.V.O. Detection K-Set) for rapid detection of carbapenemase producers in multidrug-resistant gram negatives', *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 104, no. 4, p. 115761, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115761.
- [112] G. Bianco, M. Boattini, M. Iannaccone, R. Cavallo, and C. Costa, 'Evaluation of the NG-Test CTX-M MULTI immunochromatographic assay for the rapid detection of CTX-M extended-spectrum- β -lactamase producers from positive blood cultures', *Journal of Hospital Infection*, vol. 105, no. 2, pp. 341–343, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.jhin.2020.02.009.
- [113] NG Biotech, 'NG-Test® CARBA-5', <https://www.ngbiotech.com/ng-test-carba-5/>.
- [114] J. T. Soini, J. M. Soukka, E. Soini, and P. E. Hänninen, 'Two-photon excitation microfluorometer for multiplexed single-step bioaffinity assays', *Review of Scientific Instruments*, vol. 73, no. 7, pp. 2680–2685, Jul. 2002, doi: 10.1063/1.1485782.
- [115] M. E. Waris, N. J. Meltola, J. T. Soini, E. Soini, O. J. Peltola, and P. E. Hänninen, 'Two-photon excitation fluorometric measurement of homogeneous microparticle immunoassay for C-reactive protein', *Anal Biochem*, vol. 309, no. 1, pp. 67–74, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0003-2697(02)00256-7.
- [116] J. M. Koskinen, J. M. Soukka, N. J. Meltola, and J. O. Koskinen, 'Microbial identification from faces and urine in one step by two-photon excitation assay technique', *J Immunol Methods*, vol. 460, pp. 113–118, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.jim.2018.06.017.

- [117] J. M. Koskinen *et al.*, ‘Clinical validation of automated and rapid mariPOC SARS-CoV-2 antigen test’, *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, p. 20363, Oct. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-99886-6.
- [118] J. O. Koskinen, T. Stenholm, J. Vaarno, J. Soukka, N. J. Meltola, and A. E. Soini, ‘Development of a rapid assay methodology for antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus*’, *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 62, no. 3, pp. 306–316, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.07.007.
- [119] M. Omidali, A. Mardanshahi, M. Särestöniemi, Z. Zhao, and T. Myllylä, ‘Acousto–Optics: Recent Studies and Medical Applications’, *Biosensors (Basel)*, vol. 13, no. 2, p. 186, Jan. 2023, doi: 10.3390/bios13020186.
- [120] V. Liustrovaite *et al.*, ‘Towards an Electrochemical Immunosensor for the Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Spike Protein’, *J Electrochem Soc*, vol. 169, no. 3, p. 037523, Mar. 2022, doi: 10.1149/1945-7111/ac5d91.
- [121] I. Plikusiene and A. Ramanaviciene, ‘Investigation of Biomolecule Interactions: Optical-, Electrochemical-, and Acoustic-Based Biosensors’, *Biosensors (Basel)*, vol. 13, no. 2, p. 292, Feb. 2023, doi: 10.3390/bios13020292.
- [122] A. Ramanaviciene, N. German, A. Kausaite-Minkstimiene, J. Voronovic, J. Kirlyte, and A. Ramanavicius, ‘Comparative study of surface plasmon resonance, electrochemical and electroassisted chemiluminescence methods based immunosensor for the determination of antibodies against human growth hormone’, *Biosens Bioelectron*, vol. 36, no. 1, pp. 48–55, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.bios.2012.03.036.
- [123] D. Echeverri and J. Orozco, ‘Glycan-Based Electrochemical Biosensors: Promising Tools for the Detection of Infectious Diseases and Cancer Biomarkers’, *Molecules*, vol. 27, no. 23, p. 8533, Dec. 2022, doi: 10.3390/molecules27238533.
- [124] I. Plikusiene *et al.*, ‘Investigation and Comparison of Specific Antibodies’ Affinity Interaction with SARS-CoV-2 Wild-Type, B.1.1.7, and B.1.351 Spike Protein by Total Internal Reflection Ellipsometry’, *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 5, p. 351, May 2022, doi: 10.3390/bios12050351.
- [125] Z. Balevicius, A. Ramanaviciene, I. Baleviciute, A. Makaraviciute, L. Mikoliunaite, and A. Ramanavicius, ‘Evaluation of intact- and fragmented-antibody based immunosensors by total internal reflection ellipsometry’, *Sens Actuators B Chem*, vol. 160, no. 1, pp. 555–562, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.snb.2011.08.029.
- [126] L. Kaliniene *et al.*, ‘Molecular analysis of the low-temperature *Escherichia coli* phage vB_EcoS_NBD2’, *Arch Virol*, vol. 163, no. 1, pp. 105–114, Jan. 2018, doi: 10.1007/s00705-017-3589-5.

- [127] R. Orlandi, D. H. Güssow, P. T. Jones, and G. Winter, 'Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 86, no. 10, pp. 3833–3837, May 1989, doi: 10.1073/pnas.86.10.3833.
- [128] Z. Wang *et al.*, 'Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity', *J Immunol Methods*, vol. 233, no. 1–2, pp. 167–177, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0022-1759(99)00184-2.
- [129] P. Mlynarcik, M. Dolejska, I. Vagnerova, I. Kutilová, and M. Kolar, 'Detection of clinically important β -lactamases by using PCR', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 368, no. 11, Jun. 2021, doi: 10.1093/femsle/fnab068.
- [130] M. Shulman, C. D. Wilde, and Kohler, 'A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies', *Nature*, vol. 276, no. 5685, pp. 269–270, Nov. 1978, doi: 10.1038/276269a0.
- [131] A. M. Hammerum, C. H. Lester, L. Jakobsen, and L. J. Porsbo, 'Faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC β -lactamase-producing bacteria among Danish army recruits', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 17, no. 4, pp. 566–568, 2011, doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03340.x.
- [132] R. J. Sugawara, B. E. Cahoon, and A. E. Karu, 'The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis, and growth rate of hybridomas', *J Immunol Methods*, vol. 79, no. 2, pp. 263–275, May 1985, doi: 10.1016/0022-1759(85)90106-1.
- [133] D. M. Boorsma and J. G. Streefkerk, 'Periodate or glutaraldehyde for preparing peroxidase conjugates?', *J Immunol Methods*, vol. 30, no. 3, pp. 245–255, Nov. 1979, doi: 10.1016/0022-1759(79)90098-X.
- [134] D. A. Armbruster and T. Pry, 'Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation.', *Clin Biochem Rev*, vol. 29 Suppl 1, no. Suppl 1, pp. S49-52, Aug. 2008.
- [135] P. Hänninen, A. Soini, N. Meltola, J. Soini, J. Soukka, and E. Soini, 'A new microvolume technique for bioaffinity assays using two-photon excitation', *Nat Biotechnol*, vol. 18, no. 5, pp. 548–550, May 2000, doi: 10.1038/75421.
- [136] J. O. Koskinen, 'Two-photon Excitation Fluorometry in Detection of Infectious Diseases', Turku University, Turku, 2008.
- [137] K. Bielskè *et al.*, 'Broadly reactive monoclonal antibodies against beta-lactamases for immunodetection of bacterial resistance to antibiotics', *Sci Rep*, vol. 15, no. 1, p. 19094, May 2025, doi: 10.1038/s41598-025-04603-2.

- [138] A. Avižinienė *et al.*, ‘Characterization of a Panel of Cross-Reactive Hantavirus Nucleocapsid Protein-Specific Monoclonal Antibodies’, *Viruses*, vol. 15, no. 2, p. 532, Feb. 2023, doi: 10.3390/v15020532.
- [139] I. Plikusiene *et al.*, ‘Evaluation of affinity sensor response kinetics towards dimeric ligands linked with spacers of different rigidity: Immobilized recombinant granulocyte colony-stimulating factor based synthetic receptor binding with genetically engineered dimeric analyte derivatives’, *Biosens Bioelectron*, vol. 156, p. 112112, May 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112112.
- [140] J. Jumper *et al.*, ‘Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold’, *Nature*, vol. 596, no. 7873, pp. 583–589, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- [141] R. Evans, M. O’Neill, A. Pritzel, N. Antropova, and A. Senior, ‘Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer’, *bioRxiv*, 2022.
- [142] B. Wallner, ‘AFsample: improving multimer prediction with AlphaFold using massive sampling’, *Bioinformatics*, vol. 39, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.1093/bioinformatics/btad573.
- [143] P. Eastman *et al.*, ‘OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics’, *PLoS Comput Biol*, vol. 13, no. 7, p. e1005659, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005659.
- [144] K. Olechnovič and Č. Venclovas, ‘VoroIF-GNN: Voronoi tessellation-derived protein–protein interface assessment using a graph neural network’, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 91, no. 12, pp. 1879–1888, Dec. 2023, doi: 10.1002/prot.26554.
- [145] K. Olechnovič and Č. Venclovas, ‘VoroContacts: a tool for the analysis of interatomic contacts in macromolecular structures’, *Bioinformatics*, vol. 37, no. 24, pp. 4873–4875, Dec. 2021, doi: 10.1093/bioinformatics/btab448.
- [146] F. Madeira *et al.*, ‘The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024’, *Nucleic Acids Res*, vol. 52, no. W1, pp. W521–W525, Jul. 2024, doi: 10.1093/nar/gkae241.
- [147] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, and G. J. Barton, ‘Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench’, *Bioinformatics*, vol. 25, no. 9, pp. 1189–1191, May 2009, doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- [148] E. Gasteiger, ‘ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis’, *Nucleic Acids Res*, vol. 31, no. 13, pp. 3784–3788, Jul. 2003, doi: 10.1093/nar/gkg563.
- [149] J. Ye, N. Ma, T. L. Madden, and J. M. Ostell, ‘IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool’, *Nucleic Acids Res*, vol. 41, no. W1, pp. W34–W40, Jul. 2013, doi: 10.1093/nar/gkt382.
- [150] X. Brochet, M.-P. Lefranc, and V. Giudicelli, ‘IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized

- V-J and V-D-J sequence analysis', *Nucleic Acids Res*, vol. 36, no. Web Server, pp. W503–W508, May 2008, doi: 10.1093/nar/gkn316.
- [151] V. Giudicelli, X. Brochet, and M.-P. Lefranc, 'IMGT/V-QUEST: IMGT Standardized Analysis of the Immunoglobulin (IG) and T Cell Receptor (TR) Nucleotide Sequences', *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2011, no. 6, p. pdb.prot5633, Jun. 2011, doi: 10.1101/pdb.prot5633.
 - [152] Q. Kaas and M.-P. Lefranc, 'IMGT Colliers de Perles: Standardized Sequence-Structure Representations of the IgSF and MhcSF Superfamily Domains', *Curr Bioinform*, vol. 2, no. 1, pp. 21–30, Jan. 2007, doi: 10.2174/157489307779314302.
 - [153] Q. Kaas, F. Ehrenmann, and M.-P. Lefranc, 'IG, TR and IgSF, MHC and MhcSF: what do we learn from the IMGT Colliers de Perles?', *Brief Funct Genomic Proteomic*, vol. 6, no. 4, pp. 253–264, Jan. 2008, doi: 10.1093/bfgp/elm032.
 - [154] W. C. Lima, E. Gasteiger, P. Marcatili, P. Duek, A. Bairoch, and P. Cosson, 'The ABCD database: a repository for chemically defined antibodies', *Nucleic Acids Res*, vol. 48, no. D1, pp. D261–D264, Jan. 2020, doi: 10.1093/nar/gkz714.
 - [155] F. Ehrenmann and M.-P. Lefranc, 'IMGT/DomainGapAlign: IMGT Standardized Analysis of Amino Acid Sequences of Variable, Constant, and Groove Domains (IG, TR, MH, IgSF, MhSF)', *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2011, no. 6, p. pdb.prot5636, Jun. 2011, doi: 10.1101/pdb.prot5636.
 - [156] F. Ehrenmann, Q. Kaas, and M.-P. Lefranc, 'IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF', *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no. suppl_1, pp. D301–D307, Jan. 2010, doi: 10.1093/nar/gkp946.
 - [157] A.-C. Mirica, D. Stan, I.-C. Chelcea, C. M. Mihailescu, A. Ofiteru, and L.-A. Bocancia-Mateescu, 'Latest Trends in Lateral Flow Immunoassay (LFIA) Detection Labels and Conjugation Process', *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, Jun. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.922772.
 - [158] J. M. Koskinen *et al.*, 'Clinical validation of automated and rapid mariPOC SARS-CoV-2 antigen test', *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, p. 20363, Oct. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-99886-6.
 - [159] A. Avižinienė, I. Dalgėdienė, J. Armalytė, and R. Petraitytė-Burneikienė, 'Immunogenicity of novel vB_EcoS_NBD2 bacteriophage-originated nanotubes as a carrier for peptide-based vaccines', *Virus Res*, vol. 345, p. 199370, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.virusres.2024.199370.
 - [160] Z. Balevicius *et al.*, 'Modelling of immunosensor response: the evaluation of binding kinetics between an immobilized receptor and structurally-different genetically engineered ligands', *Sens Actuators*

- B Chem*, vol. 297, p. 126770, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.snb.2019.126770.
- [161] J. D. Palmeira, M. V. Cunha, J. Carvalho, H. Ferreira, C. Fonseca, and R. T. Torres, 'Emergence and Spread of Cephalosporinases in Wildlife: A Review', *Animals*, vol. 11, no. 6, p. 1765, Jun. 2021, doi: 10.3390/ani11061765.
 - [162] D. Ding *et al.*, 'The spread of antibiotic resistance to humans and potential protection strategies', *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 254, p. 114734, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114734.
 - [163] Y. Hu, G. F. Gao, and B. Zhu, 'The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings', *Front Med*, vol. 11, no. 2, pp. 161–168, Jun. 2017, doi: 10.1007/s11684-017-0531-x.
 - [164] 'Antibiotic resistance threats in the United States, 2019', Atlanta, Georgia, Nov. 2019. doi: 10.15620/cdc:82532.
 - [165] D. G. J. Larsson and C.-F. Flach, 'Antibiotic resistance in the environment', *Nat Rev Microbiol*, vol. 20, no. 5, pp. 257–269, May 2022, doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.
 - [166] M. Castanheira, L. M. Deshpande, D. Mathai, J. M. Bell, R. N. Jones, and R. E. Mendes, 'Early Dissemination of NDM-1- and OXA-181-Producing *Enterobacteriaceae* in Indian Hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 55, no. 3, pp. 1274–1278, Mar. 2011, doi: 10.1128/AAC.01497-10.
 - [167] K. K. Kumarasamy *et al.*, 'Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study', *Lancet Infect Dis*, vol. 10, no. 9, pp. 597–602, Sep. 2010, doi: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
 - [168] A. U. Khan and P. Nordmann, 'Spread of carbapenemase NDM-1 producers: The situation in India and what may be proposed', *Scand J Infect Dis*, vol. 44, no. 7, pp. 531–535, Jul. 2012, doi: 10.3109/00365548.2012.669046.
 - [169] R. Cantón *et al.*, 'Antimicrobial surveillance: A 20-year history of the SMART approach to addressing global antimicrobial resistance into the future', *Int J Antimicrob Agents*, vol. 62, no. 6, p. 107014, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2023.107014.
 - [170] K. Thomson, 'Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases', *Emerg Infect Dis*, vol. 7, no. 2, pp. 333–334, Apr. 2001, doi: 10.3201/eid0702.010238.
 - [171] P. D. Tamma *et al.*, 'A Primer on AmpC β -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World', *Clinical Infectious Diseases*, vol. 69, no. 8, pp. 1446–1455, Sep. 2019, doi: 10.1093/cid/ciz173.
 - [172] C. N. Geyer and N. D. Hanson, 'Multiplex High-Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool for Detection of Plasmid-Mediated

- AmpC β -Lactamase Genes', *J Clin Microbiol*, vol. 52, no. 4, pp. 1262–1265, Apr. 2014, doi: 10.1128/JCM.00214-14.
- [173] C. Dallenne, A. Da Costa, D. Decré, C. Favier, and G. Arlet, 'Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, no. 3, pp. 490–495, Mar. 2010, doi: 10.1093/jac/dkp498.
 - [174] Q. Zhou, M. Tang, X. Zhang, J. Lu, X. Tang, and Y. Gao, 'Detection of AmpC β -lactamases in gram-negative bacteria', *Heliyon*, vol. 8, no. 12, p. e12245, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e12245.
 - [175] S. R. Partridge, S. M. Kwong, N. Firth, and S. O. Jensen, 'Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance', *Clin Microbiol Rev*, vol. 31, no. 4, Oct. 2018, doi: 10.1128/CMR.00088-17.
 - [176] I. M. Francino-Urdaniz and T. A. Whitehead, 'An overview of methods for the structural and functional mapping of epitopes recognized by anti-SARS-CoV-2 antibodies', *RSC Chem Biol*, vol. 2, no. 6, pp. 1580–1589, 2021, doi: 10.1039/D1CB00169H.
 - [177] E. K. Silbergeld, J. Graham, and L. B. Price, 'Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health', *Annu Rev Public Health*, vol. 29, no. 1, pp. 151–169, Apr. 2008, doi: 10.1146/annurev.publhealth.29.020907.090904.
 - [178] Clinical and Laboratory Standards Institute, *CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. , 33rd ed., vol. CLSI supplement M100. 2023.
 - [179] A. Thiha and F. Ibrahim, 'A Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection Platform for a Point-of-Care Dengue Detection System on a Lab-on-Compact-Disc', *Sensors*, vol. 15, no. 5, pp. 11431–11441, May 2015, doi: 10.3390/s150511431.
 - [180] A. M. Hujer, M. G. P. Page, M. S. Helfand, B. Yeiser, and R. A. Bonomo, 'Development of a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting and Quantifying CMY-2 and SHV β -Lactamases', *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 6, pp. 1947–1957, Jun. 2002, doi: 10.1128/JCM.40.6.1947-1957.2002.
 - [181] F. Cawez *et al.*, 'Development of Nanobodies as Theranostic Agents against CMY-2-Like Class C β -Lactamases', *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 67, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.1128/aac.01499-22.
 - [182] J. O. Koskinen, R. Vainionpää, N. J. Meltola, J. Soukka, P. E. Hänninen, and A. E. Soini, 'Rapid Method for Detection of Influenza A and B Virus Antigens by Use of a Two-Photon Excitation Assay Technique and Dry-Chemistry Reagents', *J Clin Microbiol*, vol. 45, no. 11, pp. 3581–3588, Nov. 2007, doi: 10.1128/JCM.00128-07.
 - [183] M. Pleckaityte, E. Mistiniene, R. Lasickiene, G. Zvirblis, and A. Zvirbliene, 'Generation of recombinant single-chain antibodies neutralizing the cytolytic activity of vaginolysin, the main virulence

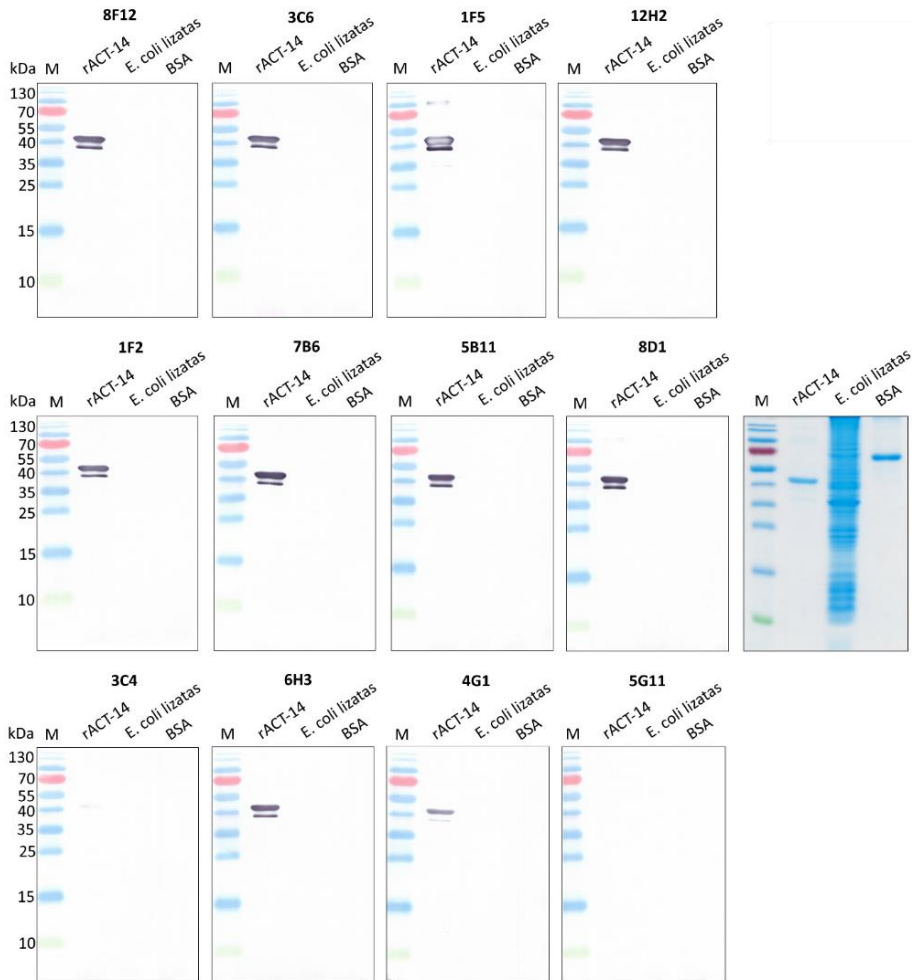
- factor of *Gardnerella vaginalis*', *BMC Biotechnol*, vol. 11, no. 1, p. 100, Dec. 2011, doi: 10.1186/1472-6750-11-100.
- [184] D. Yan, Y.-Q. Wei, H.-C. Guo, and S.-Q. Sun, 'The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 99, no. 24, pp. 10415–10432, Dec. 2015, doi: 10.1007/s00253-015-7000-8.
- [185] S. Zangenehzadeh *et al.*, 'Polarization modulated spectroscopic ellipsometry-based surface plasmon resonance biosensor for *E. coli* K12 detection', *Sci Rep*, vol. 14, no. 1, p. 27046, Nov. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-78535-8.
- [186] Y. Wang, W. Knoll, and J. Dostalek, 'Bacterial Pathogen Surface Plasmon Resonance Biosensor Advanced by Long Range Surface Plasmons and Magnetic Nanoparticle Assays', *Anal Chem*, vol. 84, no. 19, pp. 8345–8350, Oct. 2012, doi: 10.1021/ac301904x.
- [187] G. C. A. M. Bokken, R. J. Corbee, F. Knapen, and A. A. Bergwerff, 'Immunochemical detection of *Salmonella* group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor', *FEMS Microbiol Lett*, vol. 222, no. 1, pp. 75–82, May 2003, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00250-7.
- [188] N. Masdor, Z. Altintas, and I. Tothill, 'Surface Plasmon Resonance Immunosensor for the Detection of *Campylobacter jejuni*', *Chemosensors*, vol. 5, no. 2, p. 16, May 2017, doi: 10.3390/chemosensors5020016.
- [189] T. R. Hoj *et al.*, 'A pentaplex real-time PCR assay for rapid identification of major beta-lactamase genes KPC, NDM, CTX, CMY, and OXA-48 directly from bacteria in blood', *J Med Microbiol*, vol. 70, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.1099/jmm.0.001465.
- [190] G. Cuzon, T. Naas, P. Bogaerts, Y. Glupczynski, and P. Nordmann, 'Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM)', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 8, pp. 1865–1869, Aug. 2012, doi: 10.1093/jac/dks156.
- [191] N. G. Ertl *et al.*, 'Rapid molecular detection of CMY-2, and CTX-M group 1 and 9 variants via recombinase polymerase amplification', *JAC Antimicrob Resist*, vol. 5, no. 2, Mar. 2023, doi: 10.1093/jacamr/dlad023.
- [192] R. F. Espinosa *et al.*, 'Fast and easy detection of CMY-2 in *Escherichia coli* by direct MALDI-TOF mass spectrometry', *J Microbiol Methods*, vol. 148, pp. 22–28, May 2018, doi: 10.1016/j.mimet.2018.04.001.
- [193] C. Frédéric *et al.*, 'Development of nanobodies as theranostic agents against CMY-2-like class C β -lactamases', *bioRxiv*, p. 2022.07.01.498528, Jan. 2022, doi: 10.1101/2022.07.01.498528.

- [194] A. Attia, E. Fatah, and G. El-mowalid, ‘Laboratory Detection and Neutralizing Activity of Exocellular AmpC β -lactamases by Anti bla-CMY’, *Zagazig Vet J*, vol. 45, no. 2, pp. 134–142, Jun. 2017, doi: 10.21608/zvjz.2017.7886.

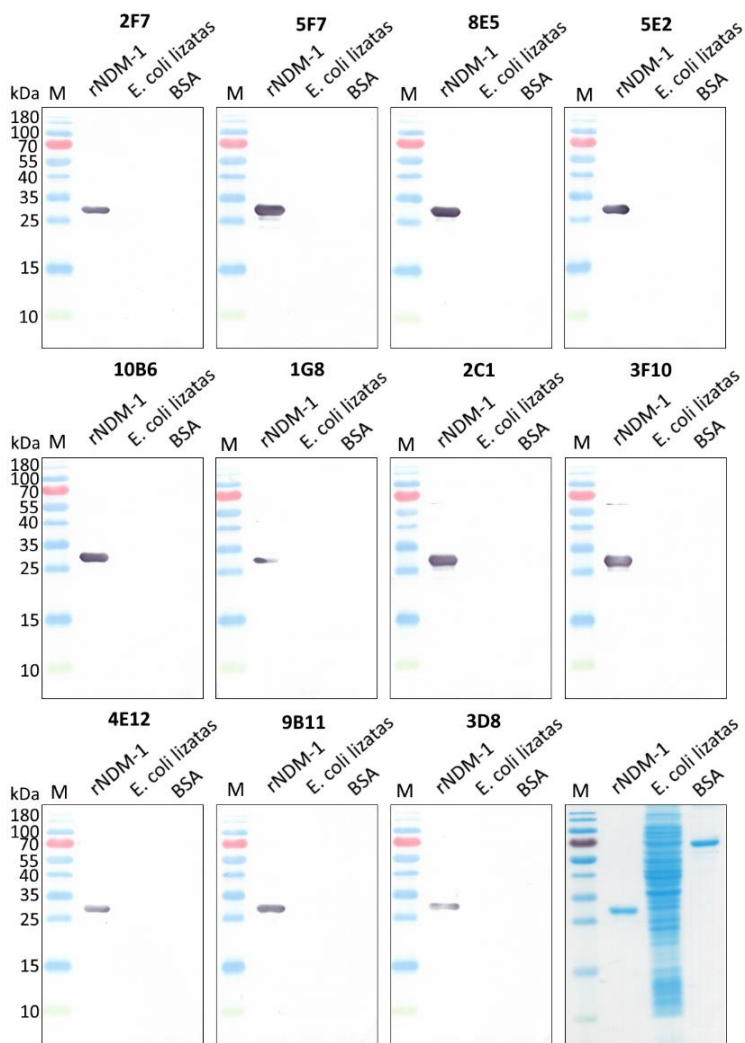
PRIEDAI

1 priedas

1 pav. MAK prieš ACT-14 reaktyvumo su antigenu tyrimo IB metodu rezultatai. *E. coli* lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.



2 pav. MAK prieš NDM-1 reaktyvumo su antigenu tyrimo IB metodu rezultatai. *E. coli* lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.



3 pav. MAk prieš PDC-195 reaktyvumo su antigenu tyrimo IB metodu rezultatai. *E. coli* lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.

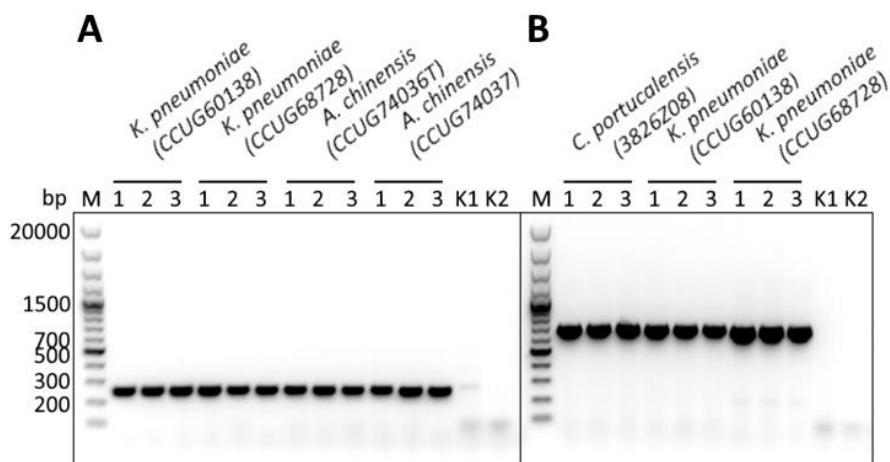


4 pav. Mak prieš CMY-34 reaktyvumo su antigenu tyrimo IB metodu rezultatai. *E. coli* lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.

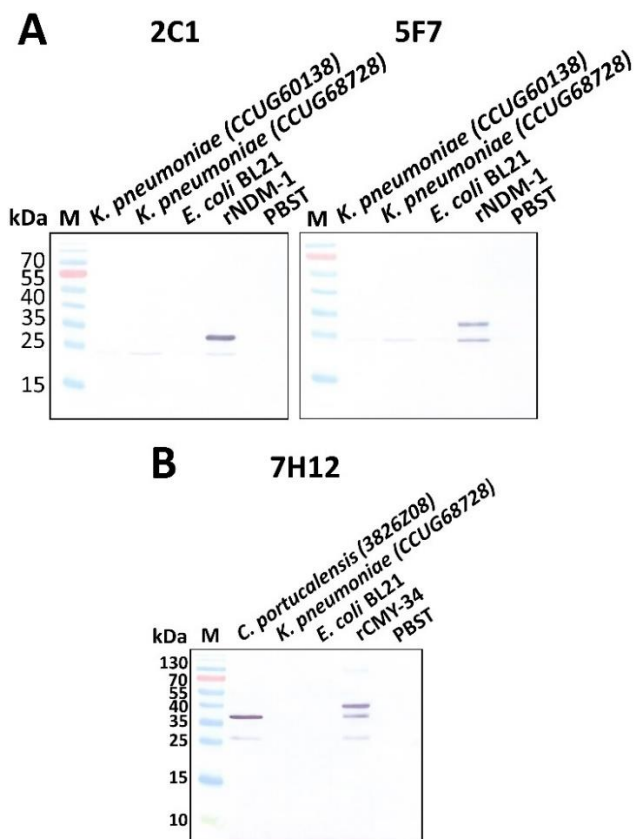


2 priedas

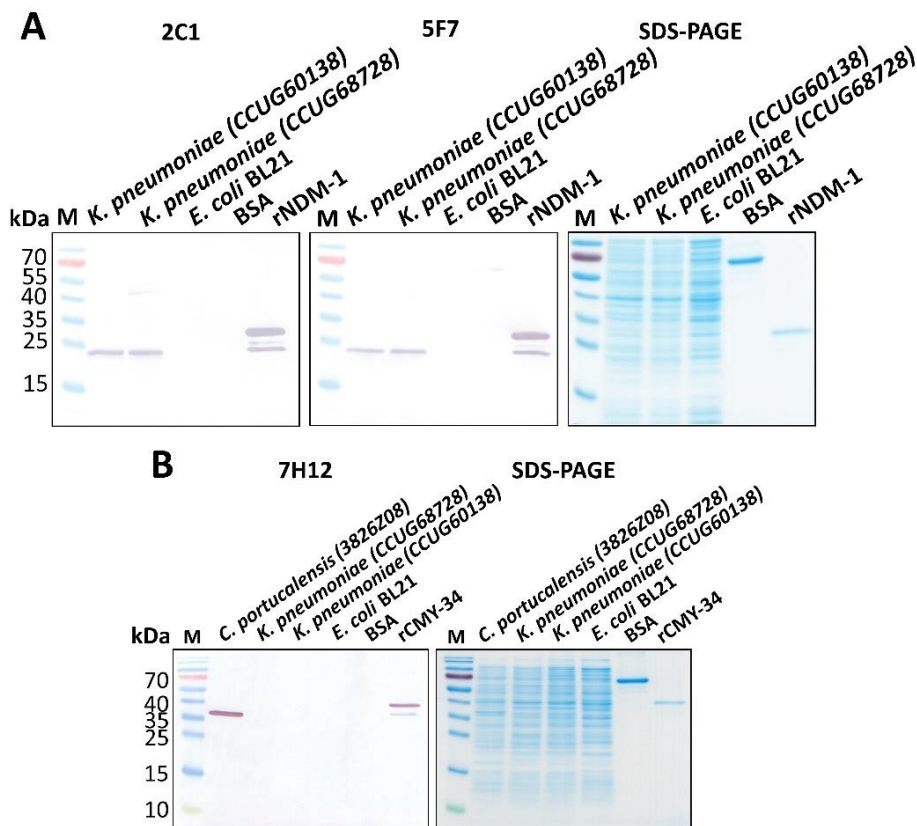
1 pav. CMY ir NDM β -laktamazės koduojančių genų nustatymo bakterijų izoliatuose PGR rezultatai. **(A)** PGR su *bla*_{NDM} specifiniais pradmenimis. **(B)** PGR su *bla*_{CMY} specifiniais pradmenimis. Bakterijų DNR mėginiai testuoti atliekant tris pakartojimus. PGR produktai DNR elektroforezės metodu išfrakcionuoti 1,2 % agarozės gelyje. K1 – neigiama kontrolė su *E. coli* BL21 DNR. K2 – neigiama kontrolė be mėginio. M – DNR fragmentų ilgio standartas.



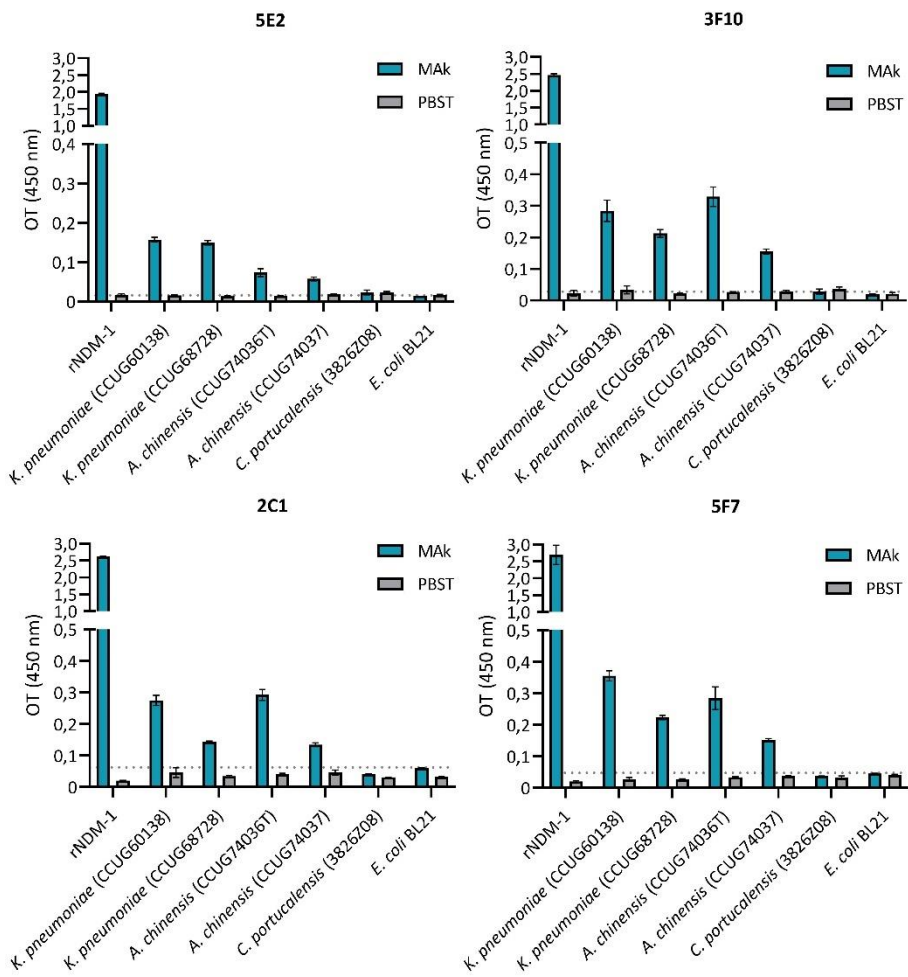
1 pav. Natyvių ir rekombinantinių β -laktamazių IP su MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 rezultatai. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvios CMY-34, *K. pneumoniae* – CMY-4, šaltinis. **(A)** IP su MAK 2C1 ir 5F7 prieš NDM-1. Detekcijai naudotas HRP-konjuguotas MAK 5E2 prieš NDM-1. **(B)** IP su MAK 7H12 prieš CMY-34. Detekcijai naudotas HRP-konjuguotas MAK 9D2 prieš ACT-14. *E. coli* BL21 lizatas ir mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBST) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.



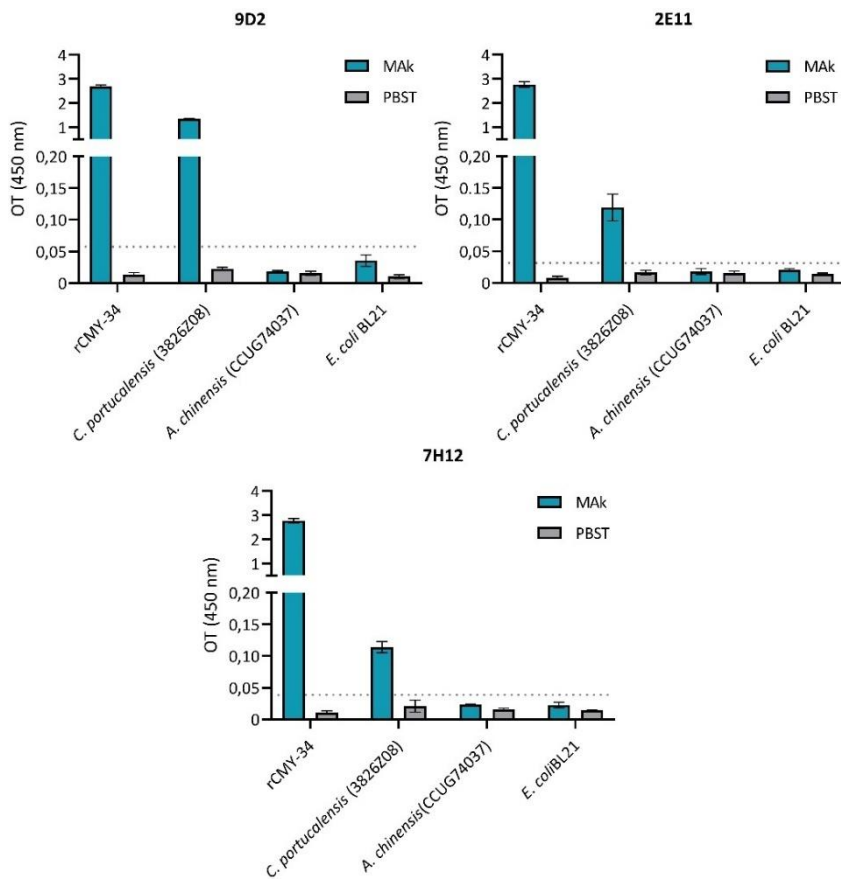
2 pav. MAK prieš NDM-1 ir CMY-34 reaktyvumo su natyviais β -laktamazės produkuojančių bakterijų izoliatais, tirtu IB metodu, rezultatai. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvios CMY-34, *K. pneumoniae* – CMY-4 ir NDM-1, šaltinis. **(A)** MAK 2C7 ir 5F7 prieš NDM-1 tyrimas. **(B)** MAK 7H12 prieš CMY-34 tyrimas. *E. coli* BL21 lizatas ir jaučio serumo albuminas (BSA) naudoti kaip neigiamas kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.



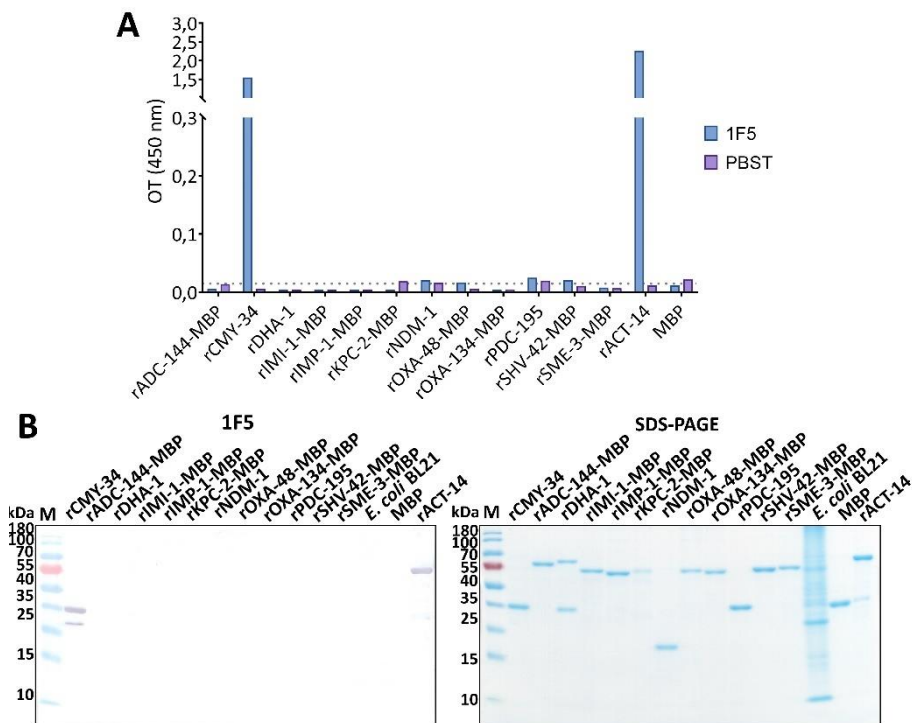
3 pav. MAK 5E2, 3F10, 2C1 ir 5F7 prieš NDM-1 reaktyvumo su natyvią NDM-1 β -laktamazę produkuojančių bakterijų izoliatais tyrimo netiesiogine IFA rezultatai. Tirti NDM-1 produkuojančių *K. pneumoniae* ir *A. chinensis* lizatai. CMY-34 produkuojančio *C. portucalensis* izoliato bei *E. coli* BL21 lizatai naudoti kaip neigiamia kontrolė. Pateikti trijų pakartojimų vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. Punktyrinėmis linijomis žymimos ribinės reikšmės: MAK 5E2 atveju – 0,016, 3F10 – 0,028, 2C1 – 0,063 ir 5F7 – 0,48.



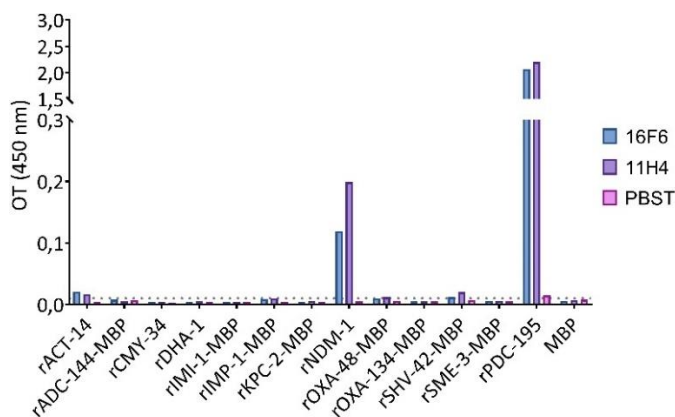
4 pav. MAK prieš CMY-34 reaktyvumo su natyvią CMY-34 β -laktamazę produkuojančiu bakterijų izoliatu tyrimo netiesiogine IFA rezultatai. Tirtas CMY-34 produkuojančio *C. portucalensis* lizatas. Pateikti trijų pakartojimų vidurkiai su standartiniais nuokrypiais. NDM-1 produkuojančio *A. chinensis* izoliato bei *E. coli* BL21 lizatai naudoti kaip neigiama kontrolė. Punktyrinėmis linijomis žymimos ribinės reikšmės: MAK 9D2 atveju – 0,062, 2E11 – 0,027, 7H12 – 0,035.



1 pav. MAK 1F5 prieš ACT-14 kryžinio specifiškumo su rekombinantinėmis β -laktamazėmis tyrimas netiesiogine IFA (**A**) ir IB (**B**). Neigiamai kontrolei naudotas maltozę surišantis baltymas (MBP) ir *E. coli* BL21 lizatas. Punkttyrine linija žymima ribinė reikšmė 0,015. M – baltymų molekulinės masės standartas.



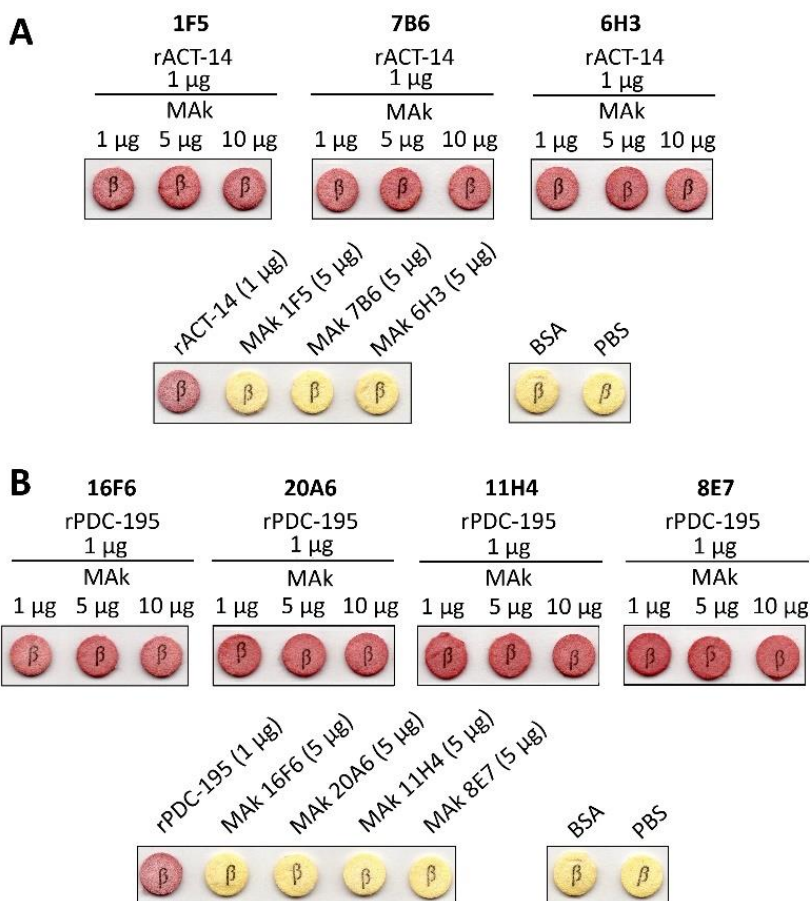
2 pav. MAK 16F6 ir 11H4 prieš PDC-195 kryžinio specifiškumo su rekombinantinėmis β -laktamazėmis tyrimas netiesiogine IFA. Neigiamai kontrolei naudotas maltozę surišantis baltymas (MBP). Punkttyrine linija žymima ribinė reikšmė 0,01, kuri yra vienoda tiek MAK 16F6, tiek MAK 11H4 atveju.



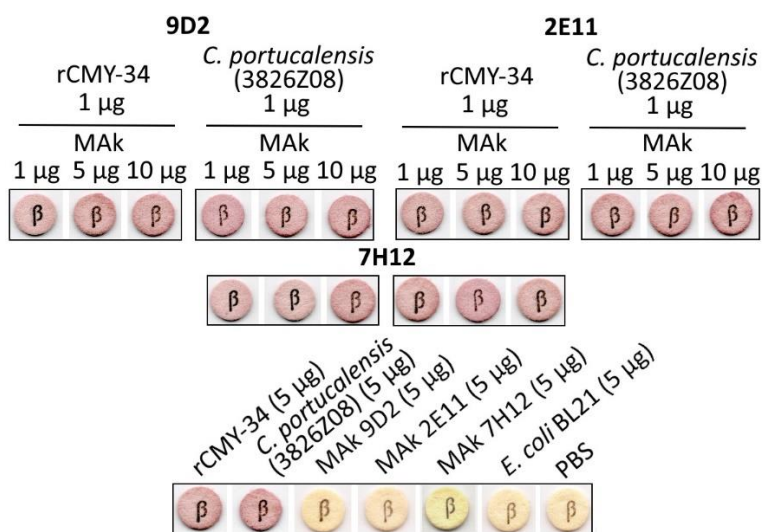
3 pav. PDC-195 ir NDM-1 ar. sekų palyginys. Pagal PDC-195 ar. seką *GenBank* nr. AHH52937.1 ir NDM-1 seką *GenBank* nr. AHM26723.1. Palyginimas atliktas su *Chustal O*.

NDM-1	---MELPNIMHPVAKLSTALAAALMLSGCMPGEIRPTIGQQMETGDQRFGLVFRQLAPN	57
PDC-195	MRDTRFPCLCGIAA-STLLFATTPAIAGEAPA-----DRLKALVDAAVQPV	45
	.:* : .* : :*: :*: *. :*: ** : *	
NDM-1	VWQHTSYLDMPGFG-----AVASNGLIVRDGGRVLVVDTAWTDQTAQ-----ILN	103
PDC-195	----MKANDIPGLAVAISLKGEPHYFSYGLASKEDGRRVTPETLFEIGSVSKTFTATLAG	101
	. *:*:. * ** :*.** :. :* : : *	
NDM-1	WIKQEINLPVALAVVTH---AHQDKMGMDALHAAGIATYA-----	141
PDC-195	YALAQDKMRLLDDRASQHWPALQGSRFDGIS---LLDLATYTAGGLPLQFPDSVQKDQAQI	158
	: : : : . * : :*.** :. :***:	
NDM-1	----NALSQ LAPQEGMVAAQH-----SLTFAANGWVEPATAPNFG-----	178
PDC-195	RDYYRQWQPTYAPGSQRLYSNPISGLFGYLAARSLGQPFERLMEQQVFPALGLEQTHLDV	218
	. . ** . : : : ** : :* . * :*	
NDM-1	---PLKVFPYPGPGHTSDNITVGIDGTIAFGGCLIKDSKAKSLGNL-----	221
PDC-195	PEAALAQAQGYGKDDRPLRVGPGPLD--AEGYGVKTSAADLLRFVDANLHPERLDRPWA	276
	* : * *: . : ** . * * :* * . * :	
NDM-1	--GDAD-TEHYAA-----	231
PDC-195	QALDATHRGYYKVGDMTQGLGWEAYDWPISLKRLQAGNSTPMALQPHRIARLPAPQALEG	336
	** :* .	
NDM-1	-----SARAFGAA---FPKAS--MIVM-SHSAPDSRA-AIT---HTARMADKLR--	270
PDC-195	QRLLNKTGSTNGFGAYVAFVPGRDLGLVVLANRNYPNAERVKIAYAILSGLEQQGKVLK	396
	*:..*** .* . :*: :. :*: . * : . .*:	
NDM-1	- 270	
PDC-195	R 397	

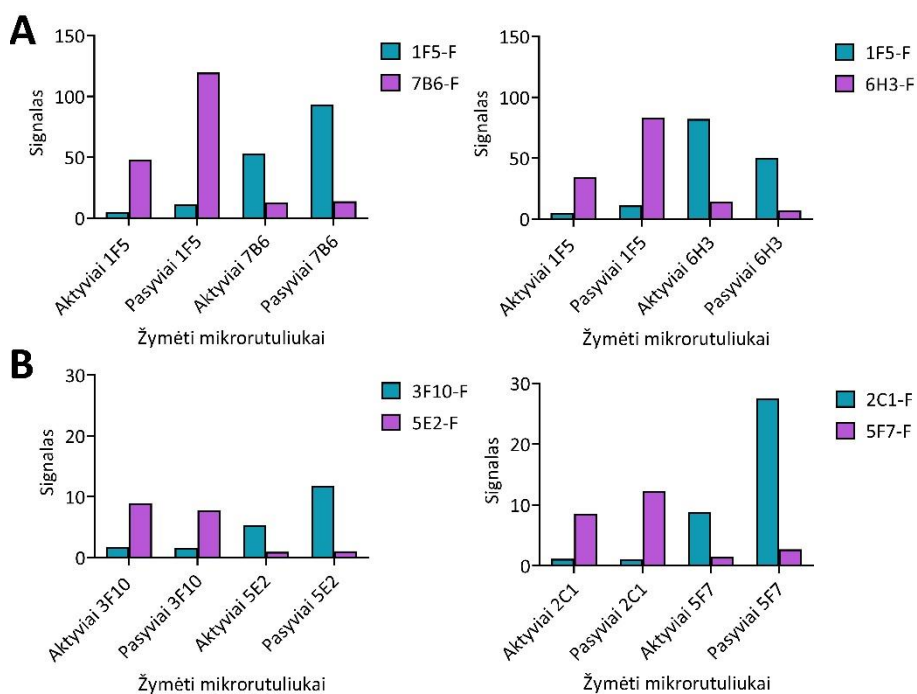
1 pav. MAK prieš ACT-14 ir PDC-195 neutralizuojančių savybių tyrimo *BL Cefinase* testu rezultatai. Testuotas rACT-14 ir rPDC-195 fermentinis aktyvumas po inkubacijos su MAK. **(A)** Testuoti MAK 1F5, 7B6 ir 6H3 prieš ACT-14. **(B)** Testuoti MAK 16F6, 20A6, 11H4 ir 8E7 prieš PDC-195. Teigiamai kontrolei testuoti atitinkamai rACT-14 ir rPDC-195 be MAK. Kaip neigiama kontrolė testuoti MAK be β -laktamazių, jaučio serumo albuminas (BSA) ir mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBS). Raudona spalva nurodo nitrocefino hidrolizę (teigiamas rezultatas), geltona – jog hidrolizė nevyksta (neigiamas rezultatas).



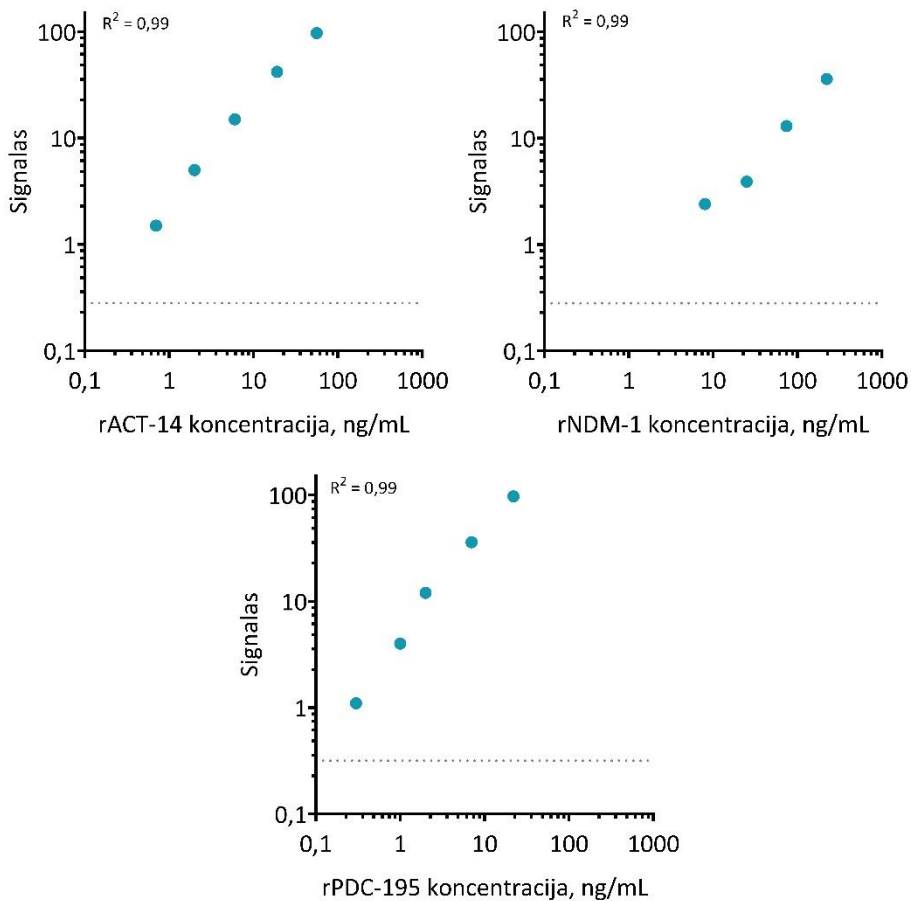
2 pav. MAk 9D2, 2E11 ir 7H12 prieš CMY-34 neutralizuojančių savybių tyrimo *BL Cefinase* testu rezultatai. Testuotas rCMY-34 ir *C. portucalensis* lizato fermentinis aktyvumas po inkubacijos su kiekvienu iš MAk. Teigiamai kontrolei testuoti rCMY-34 ir *C. portucalensis* lizatas be MAk. Kaip neigiama kontrolė testuoti MAk be β -laktamazės, *E. coli* BL21 lizatas ir mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBS). Raudona spalva nurodo nitrocefino hidrolizę (teigiamas rezultatas), geltona – jog hidrolizė nevyksta (neigiamas rezultatas).



1 pav. TPX sistema su rekombinantiniais antigenais tirtos MAK prieš β -laktamazės poros ir jų kombinacijos. MAK porą sudaro aktyviai arba pasyviai su mikrorutuliukais žymėti išgaudantys MAK ir fluoroforu žymėti detektuojantys MAK (MAK-F). **(A)** Testuotos MAK prieš ACT-14 poros: 1F5 ir 7B6, 1FG ir 6H3. **(B)** Testuotos MAK prieš NDM-1 poros: 3F10 ir 5E2, 2C1 ir 5F7.



2 pav. Signalų intensyvumo priklausomybės nuo rekombinantinių β -laktamazių koncentracijos grafikai, skirti TPX sistemos analitinio jautrumo nustatymui. Tirtos MAk poros: 1F5 ir fluoroforu žymėtas 7B6 prieš ACT-14, 5F7 ir fluoroforu žymėtas 2C1 prieš NDM-1, 16F6 ir fluoroforu žymėtas 20A6 prieš PDC-195. Punktyrinės linijos žymi ribines reikšmes: rACT-14 atveju – 0,27, rNDM-1 – 0,26, rPDC-195 – 0,35.



1 pav. Pilno ilgio DHA-1 ir chimerinio gp39m-J-DHA ar. sekos. DHA-1⁷⁷⁻⁹³ seka pažymėta žaliai, jungtuko seka – geltonai, gp39m – pilkai.

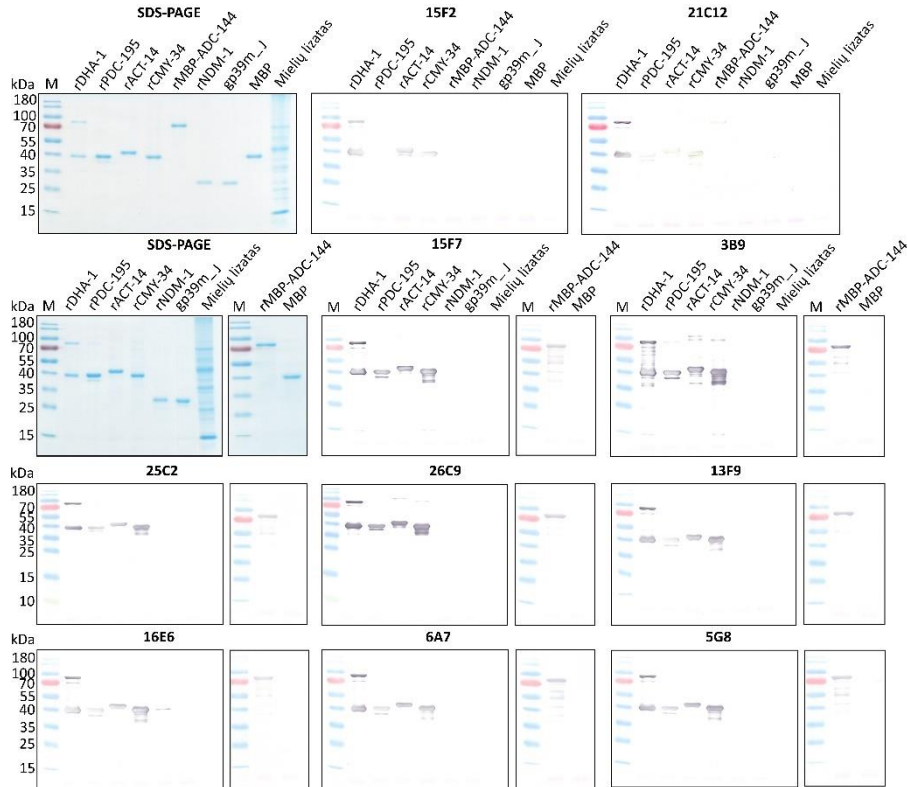
DHA-1 (*GenBank* nr. AEP68014.1)

MKKSLSATLISALLAFSAPGFSAADNVAAVVDSTIKPLMAQQDIPGMAVAVSVKGK
 PYYFNYGFADIQAKQPV TEN **TLFELGSVSKTFTGVLG** AVSVAKKEMALNDPAAKYQ
 PELALPQWKGITLLDLATYTAGGLPLQVPDAVKSRADLLNFYQQWQPSRKPGDMRL
 YANSSIGLFGALTANAAGMPYEQLLTARILAPLGLSHTFITVPESAQSQYAYGYKN
 KKPVRVSPGQLDAESYGVKSASKDMLRWAEMNMEPSRAGNADLEMAMYLAQTRYK
 TAAINQGLGWEMYDWPQQKDMIINGVTNEVALQPHPVTDNQVQPYNRASWVHKTGA
 TTGF GAYVAFIPEKQVAIVILANKNYPNTERVKAAQAILSALE

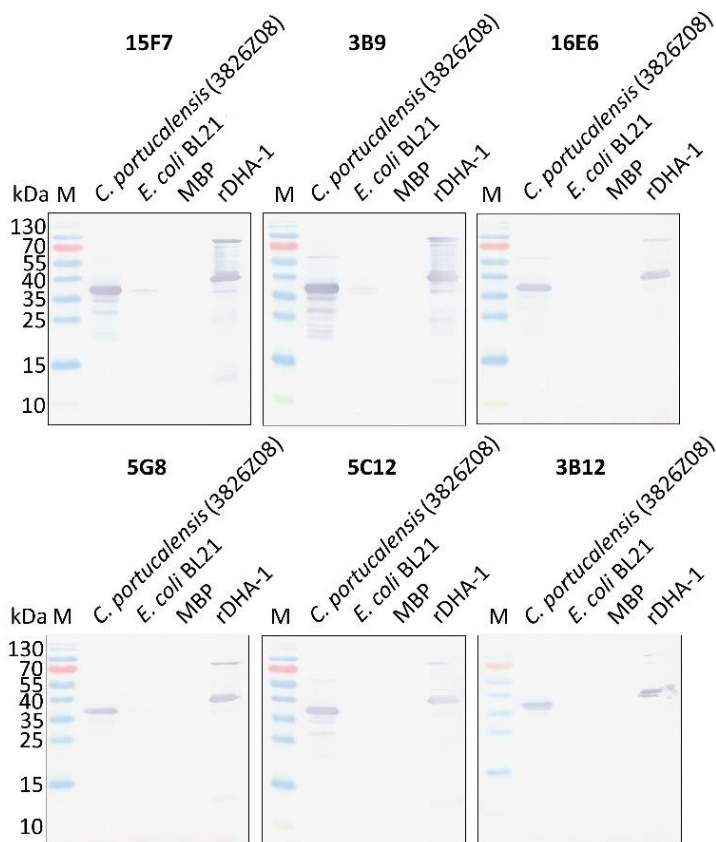
gp39m-J-DHA

MSLPNGSKVFIERTRAAQEITASAISNAENPVATVNSTTGLAVGDFVLVTESVWAG
 LKNRVLRIKTVTADTSITLEGDKSTSTVNLNKYPAGGASTLVKITSWIEIPCVDI
 AKSGGEQQYYTKQCLSDDRERQIPTFKSATSIAYTFDFDYANPVTDLLIGYDEDGK
 TRALYMFVPKASFPIRAFSGVPSFDDVPNTVMNEDETTILTISLDGKYVHMQGEVD
 PWGGGGSGGGSGGGGSPG **TLFELGSVSKTFTGVLG**

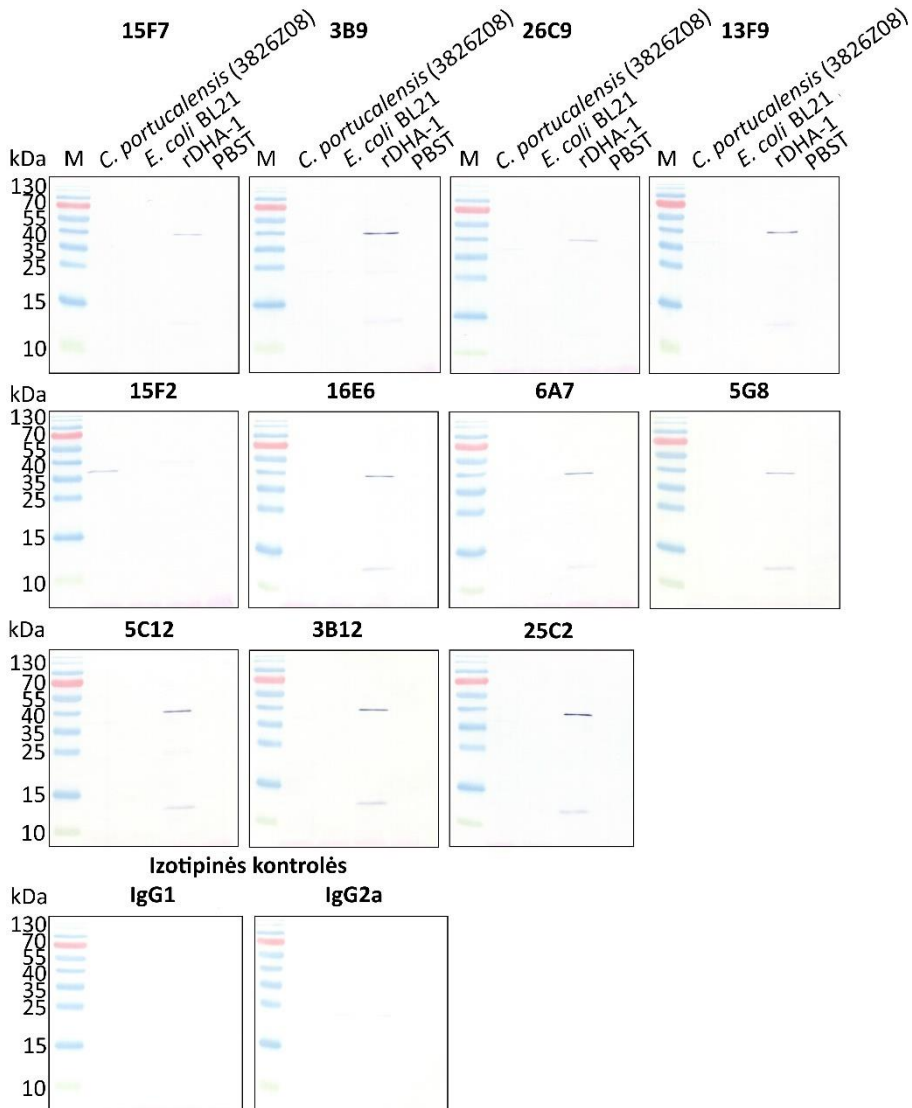
1 pav. MAk prieš DHA-1₇₇₋₉₃ reaktyvumo su rekombinantinėmis β -laktamazėmis IB rezultatai. Neigiamai kontrolei naudota B klasei priklausanti rNDM-1 β -laktamazė, gp39m-J, maltozės surišantis baltymas (MBP) ir mielių lizatas. M – baltymų molekulinės masės standartas.



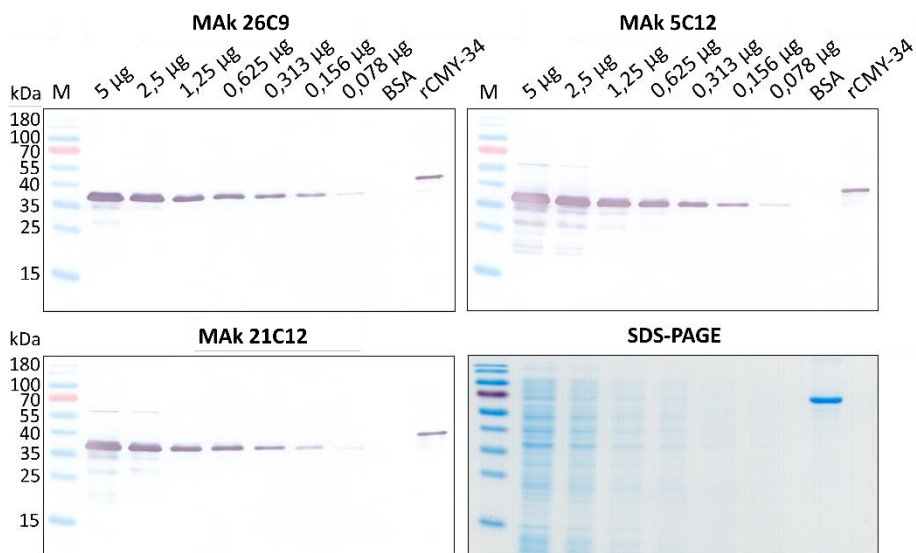
1 pav. MAK prieš DHA-1₇₇₋₉₃ reaktyvumo su natyvia CMY-34 β-laktamaze IB rezultatai. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvio CMY-34 šaltinis. *E. coli* BL21 lizatas ir matozę surišantis baltymas (MBP) testuoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.



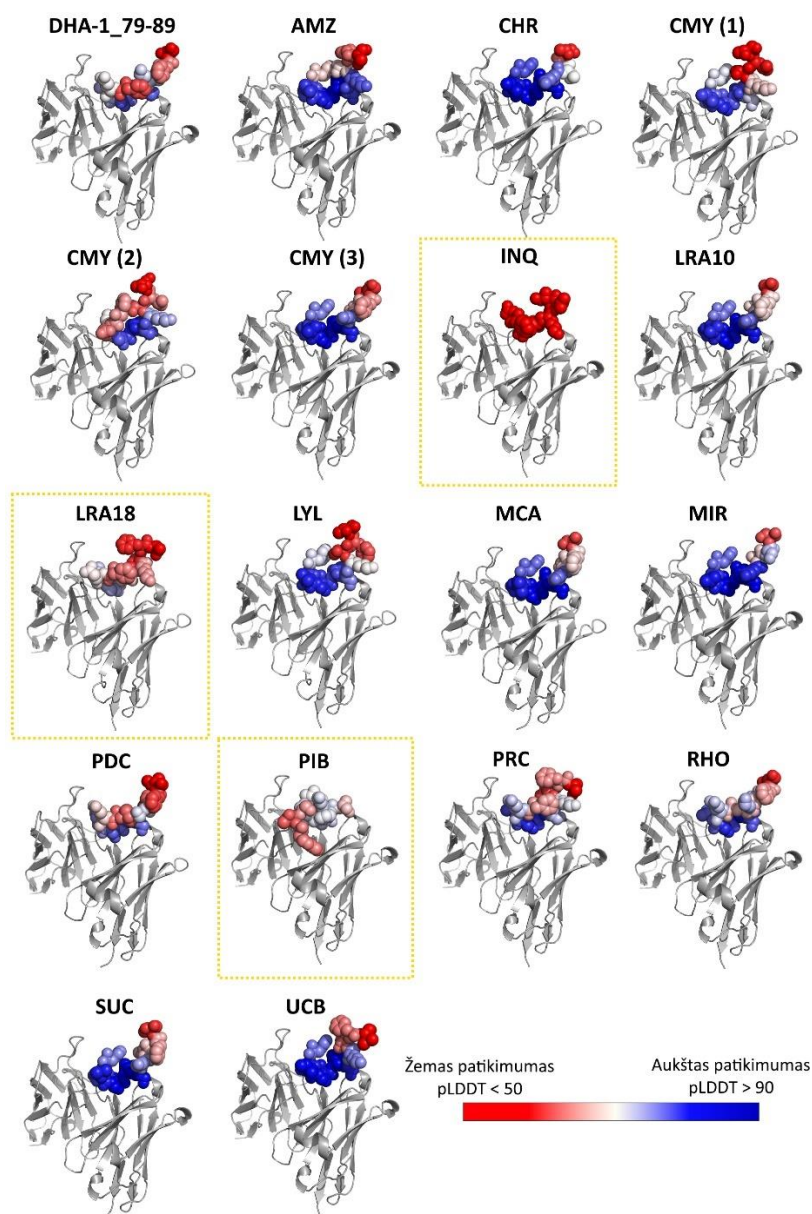
1 pav. Natyvio CMY-34 ir rDHA-1 β -laktamazių IP su MAk prieš DHA-1₇₇₋₉₃ rezultatai. *C. portucalensis* lizatas naudotas kaip natyvio CMY-34 šaltinis. Detekcijai naudotas HRP-konjuguotas MAk 26C9 prieš DHA-1₇₇₋₉₃. Izotipinėms kontrolėms naudoti: IgG1 MAk 3D7 ir IgG2a MAk 20G11 prieš SARS-CoV-2 spyglio baltymą. *E. coli* BL21 lizatas ir mėginių skiedimo buf. tirpalas (PBST) naudoti kaip neigiama kontrolė. M – baltymų molekulinės masės standartas.



1 pav. MAk 26C9, 5C12 ir 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ reaktyvumo su skirtingais natūralią CMY-34 produkujančio *C. portucalensis* lizato kiekiais tyrimas IB metodu. Į takelį įnešta nuo 5 iki 0,078 µg lizato baltymų. rCMY-34 baltymas (0,1 µg/takelyje) naudotas kaip teigiama kontrolė. Jaučio serumo albuminas (BSA) naudotas kaip neigama kontrolė. M – molekulinės masės standartas.



1 pav. MAk 21C12 prieš DHA-1₇₇₋₉₃ sąveikos su eksperimentiškai netestuotais ir C klasės β -laktamazių šeimas ar jų alelinius variantus atitinkančiais peptidais, modeliai. MAk VH ir VL domenai nuspalvinti pilkai, peptidai nuspalvinti pagal *AlphaFold2* spėjamas ar. padėties patikimumo (pLDDT) vertes: ryškiai raudona, kai pLDDT < 50 (nepatikimas modelis), ryškiai mėlyna, kai pLDDT > 90 (patikimas modelis), šviesios spalvos ir balta atitinka pLDDT vertes tarp šių reikšmių. Nepatikimi modeliai apibraukti geltonai.



1 lentelė. *AlphaFold2* sugeneruotų MAK 21C12 variabilijų domenų ir eksperimentiškai netestuotų peptidų sąveikos modelių parametrai ir jų vertės. Sugeneruoti nepatikimi modeliai ir jų parametrai pažymėti geltonai. PAE – spėjama sugretinimo klaida

Peptidas	MAK	<i>AlphaFold-Multimer</i> patikimumas	PAE	MAK pLDDT	MAK- peptido pLDDT	Peptido pLDDT
DHA	21C12	0,891	10,4	91,3	87,2	70,6
AZM	21C12	0,896	8,5	93,9	91,9	76,6
CHR	21C12	0,902	8	93,8	91,5	80,3
CMY (1)	21C12	0,891	10	93,3	90,1	69,7
CMY (2)	21C12	0,891	11,3	92,4	88	70,2
CMY (3)	21C12	0,893	8,9	93,2	90,7	78,7
LRA10	21C12	0,896	8,4	93,4	87,9	79,9
LRA18	21C12	0,885	13,4	91,1	85,4	62
LYL	21C12	0,889	9,7	92,8	89,6	71,1
MCA	21C12	0,9	8,3	94,5	92,8	80,5
MIR	21C12	0,9	7,6	94	92,4	82,1
PDC	21C12	0,888	11	91,9	88	68,9
PRC	21C12	0,893	10,8	93,4	90,3	71,9
RHO	21C12	0,894	10,2	93,1	89,8	74,1
SUC	21C12	0,901	8,7	94,5	92,5	79
UCB	21C12	0,894	9,2	94,3	92,5	77,9
INQ	21C12	0,889	14	87,9	78,1	44,4
PIB	21C12	0,88	13,3	91	82,8	68,3

SUMMARY

Introduction

Bacterial resistance to antibiotics is a growing global threat to human health. β -lactams are considered first-line therapeutic agents for the treatment of infections caused by *Enterobacterales*. However, the effectiveness of these antibiotics has been challenged by the production of bacterial β -lactamases, enzymes that hydrolyze the β -lactam ring, thereby inactivating the antibiotic. These enzymes are categorized into classes A, B, C and D according to Ambler's classification scheme. Recently, the prevalence of class B β -lactamases, also known as metallo- β -lactamases, and class C enzymes, also termed as AmpC β -lactamases, has been increasing globally. Consequently, the development of accurate and easy-to-perform immunoassays for detection of β -lactamases in antibiotic-resistant bacteria is clinically and epidemiologically relevant. These assays contribute to more effective treatment of infectious diseases and provide a better understanding of β -lactamase prevalence, transmission routes, and associated resistance mechanisms. Monoclonal antibodies (MAbs) specific to β -lactamases can be applied for detection of β -lactamases in bacterial isolates and serve as a promising diagnostic tool for epidemiological studies and profiling of resistance mechanisms.

This study aimed to generate MAbs against bacterial β -lactamases, key enzymes in antibiotic resistance, for potential diagnostic applications. It describes MAbs raised against recombinant ACT-14, NDM-1, CMY-34 and PDC-195 β -lactamases, corresponding to AmpC and metallo- β -lactamases, and their application in various immunoassays. Moreover, this study details the comprehensive characterization of novel, broadly reactive MAbs raised against a conserved sequence of AmpC β -lactamases. To facilitate the production of immunogen, a novel approach utilizing bacteriophage-derived nanotubes displaying a conserved AmpC β -lactamase sequence was employed.

The dissertation aims to develop antibodies and immunological analytical methods for the detection of β -lactamases – factors determining bacterial resistance to antibiotics – and to evaluate these methods using biological samples.

Tasks of the dissertation:

1. To develop MAbs against *Escherichia coli* synthesized recombinant β -lactamases ACT-14, NDM-1, PDC-195, and CMY-34.
2. To generate broadly reactive MAbs against AmpC β -lactamases, using bacteriophage-derived nanotubes displaying a highly conserved sequence of AmpC β -lactamases as immunogen.

3. To comprehensively characterize the developed MABs by investigating their specificity, affinity, and epitope localization using immunochemical, physical, and bioinformatical methods.
4. To select MABs with suitable properties and apply them in the development of immunological assays for the detection of β -lactamases.
5. To evaluate the diagnostic potential of the MABs by applying the developed immunological methods to the analysis of β -lactamase-producing bacterial isolates.

Scientific novelty

Due to the inappropriate and excessive use of antibiotics in both medicine and animal farming, bacteria are rapidly acquiring new mechanisms of antibiotic resistance. Therefore, the detection of antibiotic resistance determinants – specifically β -lactamases – in bacterial isolates is essential for clinical diagnostics, epidemiological studies, and investigation of resistance mechanisms. AmpC β -lactamases are increasingly detected in healthcare settings, livestock farms, and bacteria isolated from wild animals. Nevertheless, the Clinical Laboratory Standards Institute has not yet approved methodological guidelines for the detection of AmpC enzymes. Thus, AmpC specific MABs and their application in the detection of these proteins have significant diagnostic potential.

Considering this issue, this study developed and comprehensively characterized four collections of MABs specific to the AmpC β -lactamases ACT-14, PDC-195, and CMY-34. Additionally, the widespread metallo- β -lactamase NDM-1 was selected as a diagnostic target for MAB development. Notably, MABs against ACT-14, PDC-195, and CMY-34 had not been previously described.

In this study, novel, broadly reactive and comprehensively characterized MABs raised against a conserved sequence of AmpC β -lactamases were described. For MAB generation, an efficient chimeric immunogen, based on bacteriophage-derived nanotubes displaying a selected conserved sequence of AmpC β -lactamases, was utilized. This sequence is highly conserved among AmpC enzymes, making these broadly reactive MABs valuable and universal tools with significant diagnostic potential. To date, more than 63 AmpC β -lactamase families have been identified, comprising over 6,780 allelic variants of these enzymes. The application of broadly reactive MABs for β -lactamase detection would enable the identification of a wide range of AmpC proteins using a single molecular tool. In this study, the bacteriophage vB_EcoS_NBD2 tail tube protein gp39-derived nanotubes, as a scaffold displaying conserved peptide of AmpC β -lactamases, were produced in yeast and used as an immunogen for generation of MABs. Previous studies have demonstrated that in yeast produced protein gp39 forms stable nanotube structures which elicit strong immune response in

laboratory mice. Due to these properties, such nanotubes can serve as immunogenicity enhancing carriers for the presentation of target protein fragments, such as β -lactamases.

Defended propositions

1. *E. coli* synthesized recombinant β -lactamases and in yeast synthesized chimeric bacteriophage-derived protein gp39 carrying a conserved β -lactamase sequence elicit strong immune response in laboratory mice and are suitable antigens for MAb development using hybridoma technology.
2. The developed MAbs against β -lactamases exhibit high affinity and specificity to the target antigens and recognize native β -lactamases in bacterial isolates.
3. MAbs targeting ACT, NDM, PDC, and CMY β -lactamases can be applied in the development of immunological analytical methods for the qualitative or quantitative detection of β -lactamases in bacterial isolates.
4. Broadly reactive MAbs against AmpC β -lactamases can be applied for the development of immunosensors designed for the detection of these enzymes.

Background

Increasing levels of resistance to antibiotics in bacteria are among the greatest threats to human health in this century. Among various antimicrobial resistance mechanisms, the action of β -lactamases is the most prevalent. These enzymes enable bacteria to neutralize β -lactam antibiotics, which are crucial in the treatment of bacterial infections. By breaking the β -lactam ring structure, β -lactamases render these antibiotics ineffective. Based on their structure and mechanism of action, β -lactamases are classified into four groups: A, B, C, and D. Class C β -lactamases, also termed AmpC β -lactamases, are among the most common and clinically significant resistance determinants. Therefore, accurate and easy-to-perform assays for the detection of antibiotic-resistant bacterial isolates producing β -lactamases are epidemiologically relevant, leading to more effective use of antibiotics and a comprehensive understanding of β -lactamase prevalence.

Methods

Recombinant ACT-14, NDM-1, PDC-195 and CMY-34 β -lactamases were expressed in *E. coli*, chimeric bacteriophage vB_EcoS_NBD2 tail tube protein gp39 displaying a conserved peptide of AmpC β -lactamases was synthesized in yeast. Purified recombinant proteins were used as immunogens for MAb generation by hybridoma technology. Selected target-specific MAbs

were comprehensively characterized by various immunoassays, computational analysis, and sequencing of their variable domains. To prove MAb reactivity with β -lactamases, the antibodies were tested with targeted β -lactamases-producing bacterial isolates. For this purpose, the MAbs were applied in sandwich-type assays, such as sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), lateral flow immunoassay (LFIA), and two-photon excitation (TPX) assay.

Results

This study aimed to develop MAbs against bacterial β -lactamases, which are key enzymes in antibiotic resistance, for potential diagnostic use.

Four MAb collections targeting ACT-14, NDM-1, PDC-195, and CMY-34 β -lactamases were developed. Generated MAbs were characterized in detail using various immunochemical methods, such as ELISA, Western blot, immunoprecipitation, computational modelling and others. The analysis of MAb epitopes revealed their sequence homology among the members of the targeted β -lactamase families, suggesting their potential broad reactivity. MAbs were successfully applied in sandwich ELISA and two rapid immunoassay formats that were tested with bacterial isolates. MAb-based immunoassays detected all analyzed β -lactamase-positive isolates. Therefore, these novel antibodies can be applied for immunodetection of β -lactamases.

To generate MAbs capable of recognizing a broad range of β -lactamases in bacterial isolates, the bacteriophage vB_EcoS_NBD2 tail tube protein gp39-derived nanotubes, as a scaffold displaying a highly conserved 17-amino acid peptide of AmpC β -lactamases, were used as an immunogen for generation of MAbs. Thirteen hybridoma clones producing peptide-specific MAbs were developed. To assess MAb reactivity with AmpC enzymes, recombinant DHA-1, PDC-195, ACT-14, CMY-34, and ADC-144 β -lactamases were generated. Eleven of thirteen MAbs demonstrated cross-reactivity with all tested β -lactamases in ELISA and Western blot. Immunoprecipitation and Western blot analyses confirmed MAb reactivity with natural CMY-34 in the bacterial isolate. Epitope analysis revealed that most MAbs recognize a highly conserved epitope of 11 amino acids. The MAbs were comprehensively characterized using different immunoassays, total internal reflection ellipsometry and computational modelling. These novel MAbs, which recognize a wide range of AmpC enzymes, represent a promising tool for immunodetection of antibiotic resistance determinants.

Conclusions

1. Following immunization with *E. coli* synthesized recombinant β -lactamases, in total 60 hybridoma cell lines secreting IgG class MAbs were generated: ACT-14 (12 hybridomas), NDM-1 (11 hybridomas), PDC-195 (20 hybridomas), and CMY-34 (14 hybridomas).

2. Using bacteriophage vB_EcoS_NBD2 tail protein gp39 – which forms oligomeric nanotube structures – as a carrier for a conserved AmpC β -lactamase peptide, 13 hybridoma lines secreting broadly reactive MAbs were developed.
3. Characterization of the developed MAbs using immunochemical, physical, and bioinformatical methods confirmed their affinity and specificity to the target β -lactamases.
4. Selected MAbs successfully detected β -lactamases when tested in immunological analytical assays, demonstrating detection sensitivity ranging from 17 pg/mL to 11 ng/mL of the target antigen.
5. Application of the developed immunological analytical methods to β -lactamase-producing bacterial isolates or bacterial lysates enriched with recombinant β -lactamases confirmed the diagnostic potential of the generated MAbs.

PADĖKA

Dėkoju darbo vadovei prof. dr. Aurelijai Žvirblienei už suteiktą galimybę atlikti šį baigiamąjį darbą, už patarimus, pagalbą ir pasitikėjimą.

Dėkoju visiems Imunologijos skyriaus kolegoms už patarimus, idėjas ir palaikymą. Esu dėkinga dr. Indrei Kučinskaitei-Kodzei ir dr. Martynui Simanavičiui už pagalbą rengiant publikacijas bei kuriant diagnostinius testus. Išreiškiu padėką Agnei Rimkutei, Vytautui Rudokui ir dr. Dovilei Stravinskienei už pasidalinimą tyrimams reikalingais reagentais ir patarimais.

Už bendradarbiavimą esu dėkinga dr. Julijai Armalytei, dr. Rasai Petraitytei-Burneikienei, dr. Alionai Avižinienei, dokt. Laimai Čepulytei, dr. Justui Dapkūnui, dokt. Lukui Valančauskui, dr. Ievai Plikusienei, dokt. Silvijai Juciutei, dokt. Miglei Stančiauskaitei. Taip pat dėkoju dr. Janne O. Koskinen ir Julie Nuttens už bendradarbiavimą ir suteiktą galimybę stažuotis įmonėje *ArcDia International Ltd*.

Nuoširdžiai dėkoju savo vyrui Jurui už visokeriopą palaikymą, padrąšinimą ir patarimus, planuojant eksperimentus ir ruošiant disertaciją. Už palaikymą nuo mažų dienų esu dėkinga savo tėvams ir sesei.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Bielskė, Karolina**; Petraitytė-Burneikienė, Rasa; Avižinienė, Aliona; Dapkūnas, Justas; Plikusienė, Ieva; Juciūtė, Silvija; Stančiauskaitė, Miglė; Žvirblienė, Aurelija; Kučinskaitė-Kodzė, Indrė. *Broadly reactive monoclonal antibodies against beta-lactamases for immunodetection of bacterial resistance to antibiotics* // Scientific reports. Berlin : Springer Nature. ISSN 2045-2322. eISSN 2045-2322. 2025, vol. 15, iss. 1, art. no. 19094, p. [1-16]. DOI: 10.1038/s41598-025-04603-2 (Atlikau eksperimentinę dalį, parengiau rankraštį).
2. **Bielskė, Karolina**; Simanavičius, Martynas; Nuttens, Julie; Armalytė, Julija; Dapkūnas, Justas; Valančauskas, Lukas; Žvirblienė, Aurelija. *Novel monoclonal antibodies for immunodetection of AmpC β -lactamases*. PeerJ. 2025, 13:e20036. DOI: 10.7717/peerj.20036 (Atlikau eksperimentinę dalį, parengiau rankraštį).
3. Khatmi, Gazy; Filipas, Illia; **Bielskė, Karolina**; Šmits, Krišjānis; Peckus, Domantas; Klinavičius, Tomas; Siddig, Abubakr A.; Fitl, Přemysl; Novotný, Michal; More-Chevalier, Joris; Tamulevičienė, Asta; Simanavičius, Martynas; Tamulevičius, Tomas. *Laser-made nanoparticle alternatives and machine learning-based image analysis for enhancing lateral flow immunoassay detection of bacterial β -lactamases* // Sensors and Actuators B: Chemical. Lausanne : Elsevier. ISSN 0925-4005. 2026, vol. 446, art. no. 138713, p. 1-16. DOI: 10.1016/j.snb.2025.138713 (Atlikau dalį eksperimentų, prisidėjau prie rankraščio parengimo).

PRANEŠIMŲ KONFERENCIJOSE SĄRAŠAS

- **Karolina Juškaitė**, Rasa Petraitytė-Burneikienė, Aurelija Žvirblienė. *Development and Characterization of Monoclonal Antibodies Against β -lactamases Causing Antimicrobial Resistance*. Lietuvos biochemijos draugijos konferencija 2022 Mini-conference: Biochemistry in the Big Data Age, Vilnius, Lietuva, 2022 m. (stendinis pranešimas).
- **Karolina Juškaitė**, Rasa Petraitytė-Burneikienė, Aurelija Žvirblienė. *Development and Characterization of Monoclonal Antibodies Against β -lactamases Causing Antimicrobial Resistance*. EuroMAbNet 6th Antibody Validation Workshop and 12th Meeting, Hamburgas, Vokietija, 2022 m. (stendinis pranešimas).
- **Karolina Juškaitė**, Rasa Petraitytė-Burneikienė, Aurelija Žvirblienė. *Imunologiniai įrankiai, skirti bakterijų atsparumui antibiotikams nustatyti*. 15-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos, Vilnius, Lietuva, 2022 m. (žodinis pranešimas). Gautas apdovanojimas už geriausią pranešimą.

- **Karolina Juškaitė**, Julie Nuttens, Janne Koskinen, Aurelija Žvirblienė. *Application of Monoclonal Antibodies for the Detection of β -lactamases Using Two Photon Excitation Microfluorometric Technology (TPX). International Conference of Life Sciences The COINS 2023*, Vilnius, Lietuva, 2023 m. (stendinis pranešimas).
- **Karolina Juškaitė**, Martynas Simanavičius, Rasa Petraitytė-Burneikienė, Aurelija Žvirblienė. *The Use of Monoclonal Antibodies for the Immunodetection of Bacterial β -lactamases Conferring to Antimicrobial Resistance. 4th Announcement: Jędrzej Sniadecki Memorial Conference Frontiers in Molecular Life Sciences*, Vilnius, Lietuva, 2023 (stendinis pranešimas).
- **Karolina Bielskė**, Martynas Simanavičius, Julie Nuttens, Julija Armalytė, Aurelija Žvirblienė. *Application of Monoclonal Antibodies for the Detection of AmpC β -lactamases. International Conference of Life Sciences The COINS 2024*, Vilnius, Lietuva, 2024 m. (stendinis pranešimas).
- **Karolina Bielskė**, Rasa Petraitytė-Burneikienė, Aliona Avižinienė, Justas Dapkūnas, Ieva Plikusienė, Silvija Juciūtė, Miglė Stančiauskaitė, Aurelija Žvirblienė, Indrė Kučinskaitė-Kodžė. *Broadly Reactive Monoclonal Antibodies for Immunodetection of Class C β -lactamase. Baltic-Polish School of Immunology 2025*, Vilnius, Lietuva, 2025 m. (stendinis pranešimas). Gautas apdovanojimas *Award for the Best Wet Lab Research*.

GYVENIMO APRAŠYMAS

IŠSILAVINIMAS

- Gyvybės mokslų magistro laipsnis, *magna cum laude* diplomas, Vilniaus universitetas (2017–2019 m.). Darbo tema: *Namų dulkių erkių ir šuns rekombinantinių alergenų, sulietų su maltozę surišančiu baltymu (MBP), biosintezė bei antigeninių savybių tyrimai*, darbo vadovė dr. Indrė Kučinskaitė-Kodžė.
- Molekulinės biologijos bakalauro laipsnis, *cum laude* diplomas, Vilniaus universitetas (2013–2017 m.). Darbo tema: *Atvirkštinės transkripcijos kiekybinės PGR taikymas žiurkių hepatito E viruso paplitimo tyrimams*, darbo vadovė dr. Indrė Kučinskaitė-Kodžė.
- FELASA pažymėjimas darbui su laboratoriniais (bandomaisiais) gyvūnais (2018.01.25 Nr. 387), Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras.

DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE (2020–2025 m.)

1. EUREKA projektas *Novel affinity binders for immunodetection of antimicrobial resistance*, Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra (01.2.2-MITA-K-702-05-0003), vadovė prof. dr. Aurelija Žvirblienė. Buvau pagrindine projekto vykdytoja. Veikla: rekombinantinių baltymų sintezė, monokloninių antikūnų kūrimas, apibūdinimas ir taikymas (Nuo 2021.11.01 iki 2023.02.28).

STAŽUOTĖS (2020–2025 m.)

1. *Erasmus+* stažuotė Suomijos įmonėje *ArcDia International Ltd* (Nuo 2023.02.20 iki 2023.03.03).

DĖTYMAS

1. Molekulinės diagnostikos studijų dalyko seminarų ir laboratorinių darbų vedimas Molekulinės biotechnologijos III k. studentams (Nuo 2023 m. pavasario semestro).

VADOVAVIMAS STUDENTŲ BAIGIAMIESIEMS DARBAMS (2020–2025 m.)

1. Adrijos Buturlakinės (Molekulinė biotechnologija, bakalauras) baigiamasis darbas tema: *β -laktamazę atpažįstančio monokloninio antikūno kaičiųjų sričių nustatymas ir rekombinantinių antikūnų kūrimas*, darbas įvertintas 10 balų (2024 m.).

KITOS PUBLIKACIJOS (2020–2025 m.)

1. Sližienė, Aistė; Plečkaitytė, Milda; Zaveckas, Mindaugas; **Juškaitė, Karolina**; Rudokas, Vytautas; Žvirblis, Gintautas; Žvirblienė, Aurelija. *Monoclonal antibodies against the newly identified allergen β -enolase from common carp (*Cyprinus carpio*)* // Food and agricultural immunology. Abingdon : Taylor and Francis Ltd. ISSN 0954-0105. eISSN 1465-3443. 2022, vol. 33, iss. 1, p. 129-149. DOI: 10.1080/09540105.2022.2028741. (Atlikti alergišių pacientų serumo mėginių tyrimai su rekombinantiniais alergenais).
2. Sližienė, Aistė; Plečkaitytė, Milda; Rudokas, Vytautas; **Juškaitė, Karolina**; Žvirblis, Gintautas; Žvirblienė, Aurelija. *Cross-reactive monoclonal antibodies against fish parvalbumins as a tool for studying antigenic similarity of different parvalbumins and analysis of fish extracts* // *Mol Immunol*. 2023; 154:80-95. DOI: 10.1016/j.molimm.2023.01.001 (Atlikta rekombinantinių alergenų sintezė ir alergišių pacientų serumo mėginių tyrimai su šiais baltymais).
3. Silimavičius, Laimis; Tchegotarev, Lieve; Zaveckas, Mindaugas; Ražanskas, Raimundas; Čepulytė, Laima; **Bielskė, Karolina**; Kučinskaitė-Kodžė, Indrė; Griguola, Linas; Linauskienė, Kotryna;

Petraitytė-Burneikienė, Rasa. *Microarray-based evaluation of selected recombinant timothy grass allergens expressed in E. Coli and N. Benthamiana* // *BMC biotechnology*. London : BMC. eISSN 1472-6750. 2024, vol. 24, iss. 1, art. no. 72, p. [1-11]. DOI: 10.1186/s12896-024-00902-0. (Atliktas rekombinantinių alergenų sintezei skirtų *E. coli* producentų konstravimas).

KITA VEIKLA (2020–2025 m.)

1. Laimėta *Linea Libera* vardinė stipendija, skirta III studijų pakopos studentams už technologinio pobūdžio mokslinio projekto, turinčio sąsajų su poreikiu rinkoje, vykdymą. Pristatyto projekto tema: *Bakterijų atsparumo antibiotikams nustatymas imunologiniais metodais* (2022 m.).
2. Vedžiau ekskursijas moksleiviams iš Alytaus Jotvingių gimnazijos, Utenos raj. Užpalių gimnazijos, Vilniaus rajono Avižienių gimnazijos ir Klaipėdos Pamario krašto Skautų kuopos po VU GMC Biotechnologijos instituto Imunologijos skyrių. Ekskursijų organizatotė dr. Irena Nedveckytė (2022–2023 m.).
3. Komisijos narė Vilniaus Gabijos progimnazijoje rengtoje respublikinėje integruotoje gamtos mokslų ir anglų kalbos konferencijoje *Akademine popietė 2024* (2024.05.16).
4. Savanoriavimas rengiant *Baltic-Polish School of Immunology 2025* konferenciją (Vilnius, 2025 gegužės 12–13 d.).
5. Bakalauro baigiamojo darbo *Klinikinių Acinetobacter baumannii izoliatų klonalumas ir atsparumo genų identifikavimas* (Morta Endriukaitytė, molekulinės biologijos studijų programa) recenzavimas (2025 m. gegužė).
6. Vesta pamoka 5–10 klasių moksleiviams Utenos raj. Užpalių gimnazijoje. Pamokos tema: *Plačiau apie molekulinę biologiją: kaip mokslininkai laboratorijoje kuria antikūnus* (2025-06-02).

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.