

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**KARBAPENEMAMS ATSPARIŲ ENTEROBAKTERIJŲ FERMENTŲ GENUŲ TYRIMAS
TIKRALAIKĖS PGR METODU**

Magistrantė: JUSTINA ČERKASOVIENĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas: dr. M. Bratčikov _____
(parašas)

Darbo konsultantė: dr. S. Kiverytė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir

laboratorinės medicinos katedros vedėja

doc. dr. Dovilė Karčiauskaitė

leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

2018 m., Vilnius

	Turinys	
Santrumpos		4
ĮVADAS		5
1. LITERATŪROS APŽVALGA		6
1.1 Karbapenemai		6
1.2 <i>Enterobacteriaceae</i> ir jų atsparumas karbapenemams		7
1.3 Atsparumo karbapenemams mechanizmai		7
1.4 β-laktamazės		10
1.4.1 A klasės karbapenemazės (AKK)		10
1.4.1.1 <i>KPC</i> karbapenemazė		10
1.4.1.2 <i>GES</i> karbapenemazė		11
1.4.2 B klasės karbapenemazės (BKK)		12
1.4.2.1 <i>IMP</i> karbapenemazė		12
1.4.2.2 <i>NDM</i> karbapenemazė		13
1.4.2.3 <i>VIM</i> karbapenemazė		14
1.4.2.4 <i>GIM</i> karbapenemazė		15
1.4.3 C klasės β-laktamazės (CKBL)		15
1.4.4 D klasės karbapenemazės (DKK)		16
1.4.4.1 <i>OXA-48</i> karbapenemazė		17
1.5 Karbapenemazių ir C klasės β-laktamazių nustatymas		17
1.5.1 Fenotipiniai metodai		18
1.5.2 Molekuliniai metodai		18
1.5.2.1 Polimerazės grandininė reakcija		19
2. TYRIME NAUDOTI METODAI		20
2.1 <i>Enterobacteriaceae</i> izoliatų atranka ir rinkimas		20
2.2 Kultūros atšviežinimas		21
2.3 Kultūros šaldymas		21
2.4 Tiriamosios medžiagos paruošimas TL-PGR analizei		22
2.4.1 Šviežios kultūros užauginimas iš užšaldytų izoliatų		22

2.4.2	Bakterijų ardymas	22
2.5	TL-PGR	22
2.5.1	Naudoti pradmenys ir zondai, kontrolės	22
2.5.2	TL-PGR reakcijos mišinio paruošimas	25
2.6	Statistinė analizė	27
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	28
3.1	Tiriamosios medžiagos duomenų analizė	28
3.2	Karbapenemazių genų tyrimas TL-PGR metodu	32
3.3	AmpC β -laktamazių genų tyrimas TL-PGR metodu	35
	IŠVADOS	39
	Santrauka	40
	Summary	41
	Padėka	42
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	43

Santrumpos

AKK – A klasės karbapenemazė

BKK – B klasės karbapenemazė

CKBL – C klasės β -laktamazė

ISBL – išplėsto spektro β -laktamazė

ESV – epidemiologinė slenkstinė vertė

GES – Gvianos ISBL

Gr(-) – gramneigiamos bakterijos

Gr(+) – gramteigiamos bakterijos

IMI – imipenemas

IMP – imipenemazė

KAE – karbapenemams atspari Enterobakterija

KGE – karbapenemazes gaminančios Enterobakterijos

KPC – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė

MBL – metalo β -laktamazė

MEM – meropenemas

MSK – minimali slopinanti koncentracija

NDM – Naujojo Delio MBL

OXA – oksacilinazė

PPB – peniciliną prijungiantis baltymas

TL-PGR – tikralaikė polimerazės grandininė reakcija

VIM – Verona integrone užkoduota MBL

VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos

ĮVADAS

Kova su infekcijomis, tikriausiai, yra viena iš dažniausių sveikatos problemų visuomenėje. Šią kovą dažnai apsunkina infekciją sukėlusios bakterijos atsparumas naudojamiems antibiotikams. Karbapenemai yra plataus veikimo β -laktaminiai antibiotikai, vaidinantys labai svarbų vaidmenį gydant Enterobakterijų sukeltas infekcijas. Iš visų β -laktaminių antibiotikų, karbapenemai pasižymi geriausiu pajėgumu kovojant su Gramteigiamomis (Gr(+)) ir Gramneigiamomis (Gr(-)) bakterijomis (Turner, 2008). Tačiau kuo toliau, tuo daugiau karbapenemams atsparių Enterobakterijų yra nustatoma, o žinant karbapenemų svarbą kovojant su bakterinėmis infekcijomis, atsparumo plitimas yra tapęs didele problema (Li *et al.*, 2018). Siekiant sustabdyti karbapenemams atsparių Enterobakterijų plitimą ir pagerinti visuomenės sveikatą, yra svarbu nustatyti atsparumą sukeliančius mechanizmus. Dažniausia Enterobakterijų atsparumo karbapenemams priežastis yra karbapenemazių gamyba (Park *et al.*, 2016). Yra manoma, kad prie atsparumo gali prisidėti ir kitos, karbapenemazėms nepriskiriamos, β -laktamazės: išplėsto spektro β -laktamazės (ISBL) (angl. *ESBL*) ir *AmpC* (Dupont *et al.*, 2016). Yra žinoma, kad Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų (VUL SK) Mikrobiologijos laboratorijoje išskirtos karbapenemams atsparios Enterobakterijos (KAE) dažniausiai gamina ISBL. Iš praeitų metų tyrimo duomenų buvo įtariama, kad VUL SK karbapenemazės nėra išplitusios (Vitkutė, 2017), tačiau tikslesnei išvadai reikia ištirti daugiau Enterobakterijų izoliatų. Tuo tarpu, tyrimų nustatant *AmpC* genus iki šiol nebuvo atlikta.

Darbo tikslas: Nustatyti ar VUL Santaros klinikų Mikrobiologijos laboratorijoje išskirtos karbapenemams atsparios arba mažiau jautrios Enterobakterijos koduoja kai kuriuos už atsparumą karbapenemams atsakingus genus.

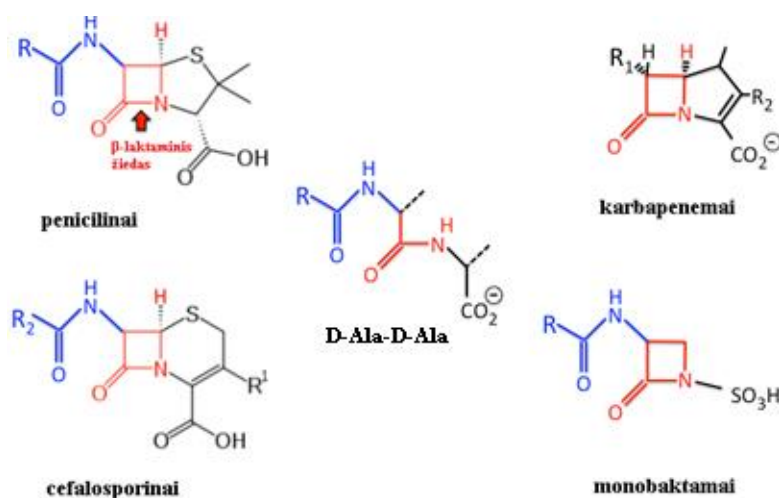
Darbo uždaviniai:

1. Remiantis EUCAST nurodytomis epidemiologinėmis slenkstinėmis vertėmis, VUL Santaros klinikų Mikrobiologijos laboratorijoje rinkti tyrimui tinkančius Enterobakterijų izoliatus.
2. Tikralaikės PGR metodu ištirti, ar surinkti bakterijų izoliatai koduoja *KPC*, *NDM*, *VIM*, *OXA-48*, *IMP* ir *GES* karbapenemazes.
3. Tikralaikės PGR metodu ištirti, ar surinkti bakterijų izoliatai koduoja *ACT*, *CMY-2* ir *DHA AmpC* β -laktamazes.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Karbapenemai

Karbapenemai yra β -laktaminiai antibiotikai, labai svarbūs kovai su infekcijomis. Klinikinėje praktikoje jie pradėti naudoti dvidešimto amžiaus pabaigoje (Hawkey, 2008). β -laktaminiam antibiotikams taip pat priklauso penicilinai, cefalosporinai ir monobaktamai. Jie visi pavadinti bendru pavadinimu, nes dalinasi panašia struktūra ir veikia panašiu mechanizmu. Savo struktūroje antibiotikai turi β -laktaminį žiedą (1 pav. pažymėtas raudona spalva), kuris apsprendžia šių antibiotikų veikimo mechanizmą. β -laktaminiai antibiotikai veikia prisijungdami prie bakterijos peniciliną prijungiančių baltymų (PPB) (angl. penicillin-binding proteins), būtinų membranos peptidoglikano sintezei (Hashizume *et al.*, 1984). Skirtingi β -laktaminiai antibiotikai jungiasi prie atitinkamo PPB. Prisijungti prie PPB įgalina β -laktaminis žiedas, nes jo struktūra yra labai panaši į natūralaus PPB substrato seką (D-Ala-D-Ala), kuri prisijungia fermento aktyviajame centre. Prisijungus β -laktaminiam antibiotikui, PPB nebegali atlikti savo funkcijos, bakterijos apvalkalo sintezė sutrikdoma ir bakterija miršta (Williamson *et al.*, 1986).



1 Pav. β -laktaminių antibiotikų (penicilinų, karbapenemų, cefalosporinų ir monobaktamų) ir PPB substrato sekos (D-Ala-D-Ala) struktūros. β -laktaminis žiedas pažymėtas raudona rodykle (koreguota pagal Tmedweb.tulane.edu).

Pasaulio sveikatos organizacija yra paskelbusi, kad bakterijų atsparumas antibiotikams yra visuotinė grėsmė sveikatos apsaugai ir valdžia bei visa visuomenė turi imtis veiksmų šiai problemai spręsti. Praktiškai kiekvienam antibiotikui atsparumas atsiranda praėjus kiek laiko po jų atradimo ir pradėjimo naudoti (Meletis, 2016). Ne išimtis yra ir atsparumas karbapenemų antibiotikams. Atsparumo atsiradimas yra visiškai natūraliai vykstantis reiškinys, tačiau per didelis antibiotikų vartojimas šį natūraliai vykstantį reiškinį paspartina.

1.2 *Enterobacteriaceae* ir jų atsparumas karbapenemams

Enterobacteriaceae šeimą sudaro Gr(-) lazdelės, kurios yra dažna tiek gydymo įstaigose, tiek visuomenėje įgytų infekcijų priežastis. *Enterobacteriaceae* šeimoje yra daugiau kaip šimtas rūšių bakterijų, kurios kolonizuoja žmogaus žarnyną. Patogeninės rūšys gali sukelti pneumoniją (plaučių uždegimas), cistitą (šlapimo pūslės uždegimas), peritonitą (pilvaplėvės uždegimas), pielonefritą (viršutinių šlapimo takų uždegimas), meningitą (smegenų dangalo uždegimas) ir įvairias infekcijas, atsirandančias dėl medicininių prietaisų naudojimo (pvz., kateteriai, dantų implantai, širdies stimulatoriai ir kt.) (Nordmann *et al.*, 2011). *Enterobacteriaceae* nariai geba sparčiai plisti tarp žmonių per nešvarias rankas, užterštą maistą ar vandenį. Jos gali įgyti naujos genetinės medžiagos, pvz. atsparumo antibiotikams genų, horizontalios genų pernašos būdu dalyvaujant transpozonomams ar plazmidėms (Dahiya *et al.*, 2015).

Infekcijos, kurias sukelia KAE, yra svarbi sergamumo ir mirštamumo priežastis visame pasaulyje (Duin ir Doi, 2017). Mirštamumas nuo KAE sukeltų infekcijų siekia net 40 % (Tangden ir Giske, 2015). Mirštamumas yra toks didelis, nes Enterobakterijų sukeltos infekcijos pagrindinis gydymas yra β -laktaminiai antibiotikai (Mairi *et al.*, 2017), kuriems priklauso ir karbapenemai. Gydant infekcijas karbapenemų vaidmuo yra labai svarbus, tačiau bėgant laikui yra nustatoma vis daugiau karbapenemams atsparių Enterobakterijų (Li *et al.*, 2018).

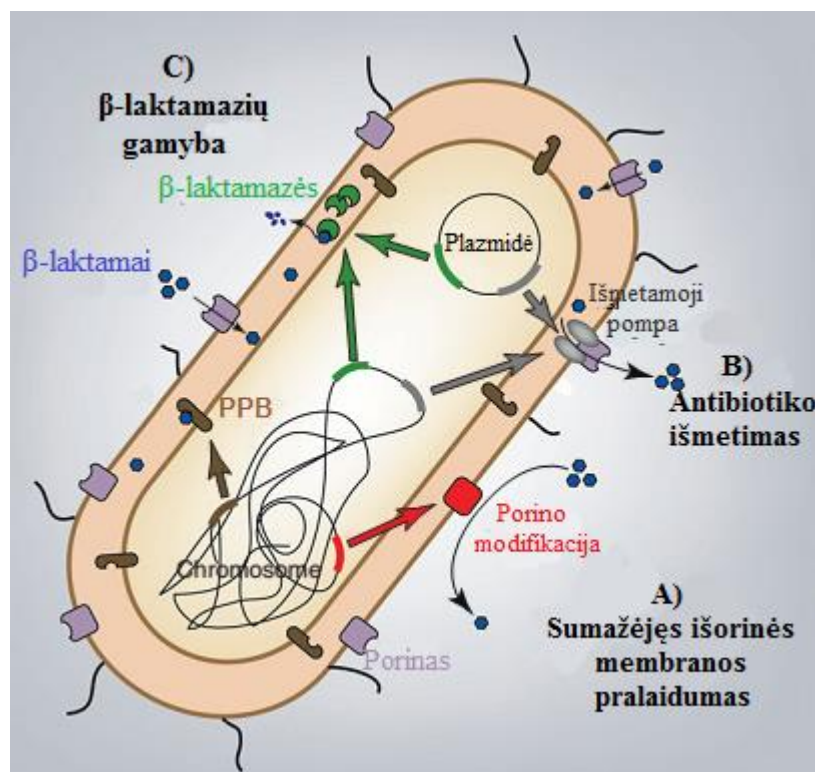
1.3 Atsparumo karbapenemams mechanizmai

Bakterijos atsparios karbapenemams gali tapti dėl daugelio priežasčių. Gr(+) bakterijose dažniausiai atsparumą nulemia mutacijos *PPB* sekoje (Sanbongi *et al.*, 2004), o Gr(-) bakterijose – sumažėjęs bakterijos membranos pralaidumas (Bonomo ir Szabo, 2006), gebėjimas antibiotiką pašalinti iš periplazminės ertmės dalyvaujant išmetamosioms pompoms (angl. *efflux pump*) (Meletis *et al.*, 2012) arba karbapenemus ardančių fermentų karbapenemazių gamyba (Walsh, 2010). Bakterija gali turėti vieną iš šių mechanizmų ar net kelis. Esant kelių mechanizmų kombinacijai, bakterija gali būti atspari daugeliui antibiotikų – dažniausiai tokios bakterijos sukelia epidemijas ligoninėse (Deplano *et al.*, 2005). Kadangi šio tyrimo objektas yra *Enterobacteriaceae* šeima – Gr(-) bakterijos, todėl toliau bus plačiau aptarti Gr(-) bakterijų atsparumo karbapenemams mechanizmai.

Kai kurios Gr(-) bakterijos sutrukdo karbapenemams prisijungti prie *PPB* dėka sumažėjusio išorinės membranos pralaidumo. Karbapenemų taikinytis – *PPB* yra lokalizuotas vidinėje bakterijos membranoje (2 pav.). Kadangi Gr(-) bakterijos turi išorinę membraną, karbapenemų patekimui yra reikalingi išorinės membranos baltymai porinai, kurie sukuria hidrofilinį kanalą maisto

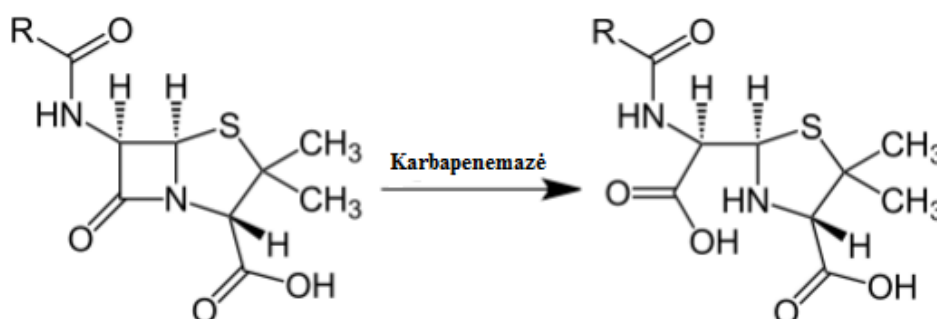
medžiagų ir kitų junginių, tarp jų ir antibiotikų, patekimui į bakteriją. Sumažėjus arba visai nevykstant šių porinų raiškai, pasikeitus porino struktūrai, karbapenemai nebeatpenka į bakteriją ir nepasiekia PPB, todėl bakterijos tampa atsparios arba mažiau jautrios antibiotikui, dažniausiai imipenemui (2 pav. A) (Pages *et al.*, 2008). Pastebėta, kad dažnai su porinų pokyčiais yra nustatomi ir kiti atsparumą nulemiantys faktoriai: AmpC β-laktamazės ir/ar ISBL gamyba. Pirmosios nustatytos KAE turėjo pakitusius OmpC ir OmpF porinus ir padidėjusią chromosominės AmpC β-laktamazės raišką. O tos bakterijos, kurios chromosomoje nekodavo *AmpC* geno, turėjo plazmidinę *AmpC* kartu su porinų pokyčiais (Nordmann *et al.*, 2012).

Jei karbapenemui pavyksta patekti į bakterijos periplazminę ertmę, dar nereiškia, kad jam pasiseks prisijungti prie PPB. Antibiotiką gali iš ląstelės pašalinti taip vadinamos išmetamosios pompos (2 pav. B). Šiomis pompomis bakterijos iš ląstelės pašalina įvairius dažus, detergentus, inhibitorius, antibiotikus ir kitas toksiškas medžiagas. Atsparumas karbapenemams, o ypač meropenemui, gali atsirasti padidėjus karbapenemams išmetančių pompų ekspresijai (Meletis, 2016). Kaip ir porinų atveju, kartu su išmetančių pompų padidėjusia ekspresija gali būti stebima padidėjusi AmpC raiška (Quale *et al.*, 2006).



2 pav. Pagrindiniai mechanizmai, sukiantys Enterobakterijoms atsparumą karbapenemams. **A)** Sumažėjęs išorinės membranos pralaidumas dėl pasikeitusios porino struktūros, sumažėjusios ar visai nevykstančios porinų raiškos; **B)** Antibiotiko išmetimas iš ląstelės dalyvaujant išmetamosioms pompoms; **C)** Antibiotikus ardančių β-laktamazių gamyba. PPB – penicilinus prijungiantys baltymai. Redaguota straipsnio (Nordmann *et al.*, 2012) iliustracija.

Dažniausia priežastis, kodėl *Enterobacteriaceae* tampa atspari karbapenemams, yra karbapenemazių gamyba (2 pav. C) (Park *et al.*, 2016). Karbapenemazės yra pati universaliausia β -laktamazių šeima, nes geba hidrolizuoti ne tik karbapenemus, bet ir penicilinus, cefalosporinus, monobaktamus. Taigi bakterija su karbapenemazės fermentu yra atspari beveik visiems β -laktaminiams antibiotikams (Queenan ir Bush, 2007). Karbapenemazės veikia suardydamos antibiotiko β -laktaminį žiedą (3 pav.), antibiotikas lieka neaktyvus, nes nebegali prisijungti prie bakterijos vidinėje membranoje esančio substrato – PPB (Sahare *et al.*, 2013). Tokiu atveju PPB lieka aktyvus, toliau normaliai funkcionuoja ir suformuoja peptidoglikano polimerus, būtinus bakterijos apvalkalo formavimuisi.



3 pav. Karbapenemazės hidrolizuoja β -laktaminio žiedo amidinę jungtį ir padaro antibiotiką neaktyvų (Sahare *et al.*, 2013).

Dažnu atveju karbapenemazės genai yra koduojami plazmidėse arba transpozono viduje. Tai labai palengvina horizontalią genų pernašą tarp bakterijų ir paaiškina faktą, kodėl karbapenemazės genai taip greitai plinta (Bennett, 2008). 1993 metais buvo identifikuotas pirmasis karbapenemazės genas *Enterobacteriaceae* šeimoje. Tai buvo *NmcA* karbapenemazė rasta *Enterobacter cloacae* izoliato (Naas ir Nordmann, 1994). Nuo to laiko iki dabar yra identifikuota daug karbapenemazių, jos aptinkamos visame pasaulyje: randamos ne tik ligoninėse, bet ir už jos ribų visuomenėje. Karbapenemazes gaminančios Enterobakterijos aptinkamos net užterštame maiste, naminiuose ir laukiniuose gyvūnuose (Mairi *et al.*, 2017).

Karbapenemazės dažniausiai klasifikuojamos naudojant Ambler klasifikaciją į A, B ir D β -laktamazes. C klasės β -laktamazės (kitai vadinamos AmpC β -laktamazės) dažniausiai nėra priskiriamos karbapenemazėms, tačiau, kaip jau buvo minėta, AmpC gali būti susijusios su atsparumu karbapenemams. Ambler klasifikacija remiasi molekulinės struktūros skirtumais (Ambler, 1980). Kartais yra naudojama Bush, Jacoby, Medeiros klasifikacija, kuri remiasi funkcinėmis charakteristikomis (Bush *et al.*, 1995), tačiau straipsniuose minima rečiau.

Tolesniame skyriuje bus pristatyta β -laktamazių Ambler klasifikacija ir labiau akcentuota darbe tirtos, su atsparumu karpapenemams susijusias β -laktamazės: *KPC*, *GES*, *IMP*, *NDM*, *VIM*, *GIM* ir *OXA-48* karbapenemazės, kurios yra svarbiausios ir pagrindinės A, B ir D klasių karbapenemazės; *AKT*, *CMY-2* ir *DHA AmpC* β -laktamazės, kurios nėra priskirtos prie karbapenemazių, tačiau pagal literatūros duomenis gali būti atsakingos už atsparumą karbapenemams.

1.4 β -laktamazės

1.4.1 A klasės karbapenemazės (AKK)

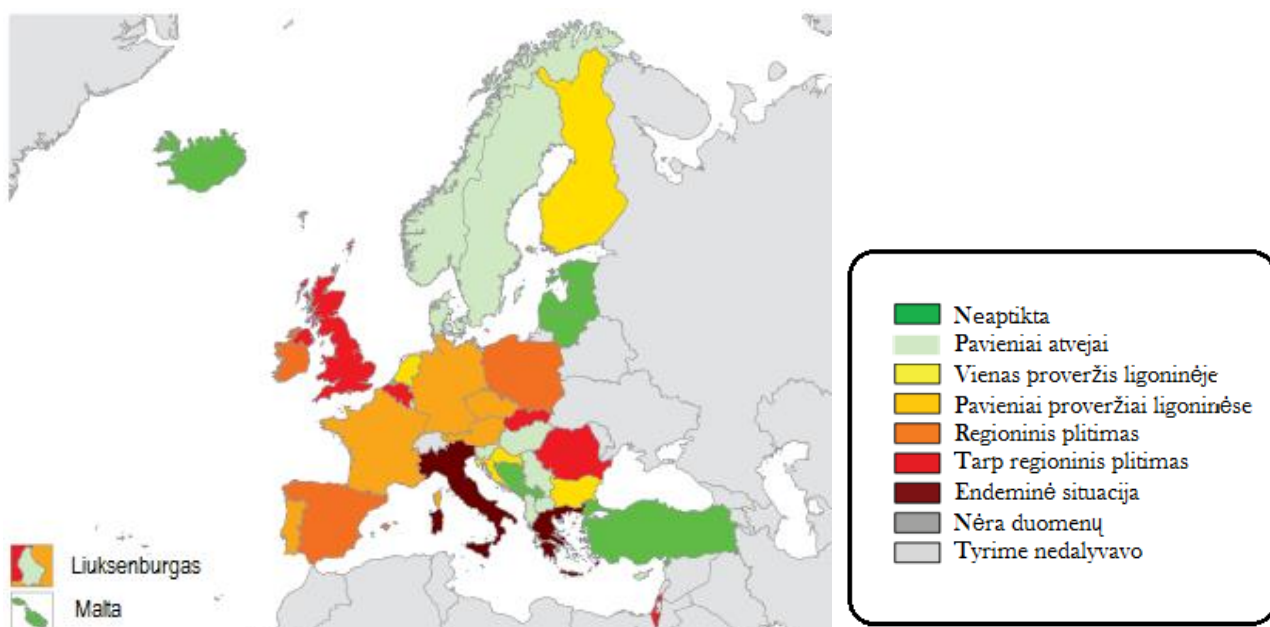
A klasei (taip pat ir C, D klasei) priklausančios karbapenemazės yra serino β -laktamazės, jų kataliziniam aktyvumui skaldant β -laktamus yra būtinas aktyviojo centro 70-oje pozicijoje esantis serinas. AKK skaldo visus β -laktaminius antibiotikus, išskyrus cefamiciną (Hammoudi *et al.*, 2014). Šios klasės karbapenemazės gali būti išskiriamos į keturias pagrindines šeimas: *NMC/IMI*, *SME*, *KPC*, *GES*, iš kurių *SME*, *NMC/IMI* yra užkoduoti chromosomoje, o *KPC* ir *GES* – dažniausiai plazmidėje. AKK yra labai plačiai paplitusios, aptinkamos net keliuose bakterijų tipuose: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. Tačiau dažniausiai randama *Enterobacteriaceae* šeimoje ir *P. aeruginosa* (Salabi *et al.*, 2013). *GES* ir *KPC* yra laikomos epidemiologiškai svarbiausiomis karbapenemazėmis AKK grupėje (Osteo *et al.*, 2014).

1.4.1.1 *KPC* karbapenemazė

KPC genas yra išsidėstęs transpozono Tn4401 viduje (Cheruvanky *et al.*, 2017). Šis transpozonas gali įsiterpti į įvairias Gr(-) bakterijų plazmidės, todėl *KPC* gali efektyviai plisti tarp skirtingų bakterijų. *KPC* pirmą kartą aptikta prieš 24 metus Šiaurės Karolinos ligoninėje (JAV). Kaip ir šios karbapenemazės pavadinimas sako, *KPC* pirmą kartą nustatyta *K.pneumoniae* izoliata. Nuo to laiko *KPC* pasklido tarp Gr(-) bakterijų ir dabar gali būti randama ne tik *K.pneumoniae*, bet visoje *Enterobacteriaceae* šeimoje ir net *P.aeruginosa*, *P.putida* ar *Acinetobacter spp* bakterijose. *KPC* lokalizacija taip pat išplito, dabar aptinkama ne tik Amerikoje, bet ir kituose žemynuose, įskaitant Europą (Munoz-Price *et al.*, 2013). Mūsų kaimynėje Lenkijoje *KPC* pirmą kartą aptikta 2008 metais (Baraniak *et al.*, 2009) ir jau po kelių metų buvo įvardijama kaip bene dažniausiai aptinkama karbapenemazė *Enterobacteriaceae* šeimoje (Munoz-Price *et al.*, 2013). Amerikoje šiuo metu situacija irgi panaši, *KPC* gamyba yra pati dažniausia priežastis, kodėl *Enterobacteriaceae* yra atspari karbapenemams (Pitout *et al.*, 2016).

Pagal 2015 metų EuSCAPE (European survey of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*) projekto duomenis, Italijoje ir Graikijoje *KPC* gaminančių bakterijų kiekis yra

ypatingai didelis ir šios šalys priskiriamos prie endeminių (4 pav.) (už Europos ribų, endeminės šalys taip pat yra JAV, Izraelis, Kinija, Brazilija, Kolumbija ir Argentina (Mathers *et al.*, 2015)). Iš EuSCAPE rezultatų taip pat matyti, kad ne tik Italijoje ir Graikijoje situacija yra sudėtinga, didžiojoje dalyje kitų valstybių *KPC* yra taip pat paplitęs. Tik 6 iš 38 valstybių (tame tarpe ir Lietuvoje) *KPC* genas nebuvo aptiktas (Albiger *et al.*, 2015). *KPC* gaminantys organizmai gali būti atsparūs beveik visiems antibiotikams, mirštamumas dėl tokios infekcijos siekia net 50 % (Lee ir Burgess, 2012). *KPC* gaminantys organizmai yra opi problema visuomenėje, ypač endeminėse šalyse. Todėl svarbu nustatyti tokius izoliatus ir sustabdyti jų plitimą.



4 pav. *KPC* koduojančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų paplitimas 38 Europos šalyse. 2015 m. EuSCAPE tyrimo duomenys. Koreguota straipsnio (Albiger *et al.*, 2015) iliustracija.

1.4.1.2 GES karbapenemazė

GES (Gvianos išplėsto spektro BL) pirmą kartą buvo aptikta 1998 metais Prancūzijos Gvianoje. Pirmosios aptiktos GES buvo priskirtos ISBL, tačiau vėliau nustatyta, kad dėl pokyčio fermento aktyviajame centre, GES gebėjimas hidrolizuoti karbapenemus labai išaugo (Ribeiro *et al.*, 2014). Taigi šiuo metu GES fermentai gali būti suskirstyti į dvi grupes: turintys ISBL aktyvumą ir turintys karbapenemazinį aktyvumą. GES-5 pasižymi stipriu karbapenemaziniu aktyvumu ir yra dažniausiai aptinkama GES karbapenemazė Enterobakterijose (Boyd *et al.*, 2015). Enterobakterijos, turinčios GES su karbapenemaziniu aktyvumu, dažniausiai nustatomos Europoje, Šiaurės Afrikoje ir Tolimuosiuose Rytuose. Duomenų apie GES paplitimą Lietuvoje kol kas nėra.

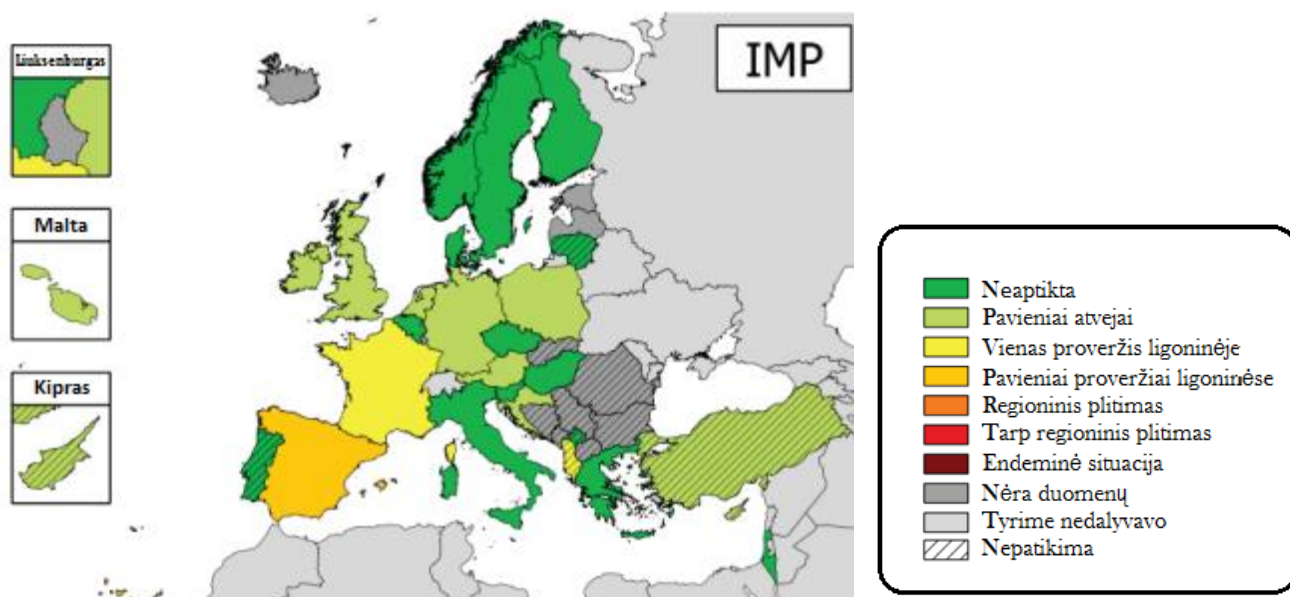
1.4.2 B klasės karbapenemazės (BKK)

B klasei priklausančios karbapenemazės yra dar vadinamos metalo β -laktamazėmis (MBL), nes jų fermentiniam aktyvumui yra reikalingi vienas arba du divalenti katijonai, dažniausiai cinkas. Pirmoji aptikta BKK buvo *IMP-1*, ji rasta *P. aeruginosa* izoliata 1990 metais Japonijoje, tačiau po kiek laiko aptikta ir *Enterobacteriaceae* šeimoje (Osano *et al.*, 1994). Dažniausiai aptinkamos BKK yra *IMP*, *NDM*, *VIM* ir *GIM* (Nordmann ir Poirel, 2014; Amudhan *et al.*, 2012). Bakterijos, gaminančios BKK yra atsparios karbapenemams ir visiems β -laktaminiams antibiotikams, išskyrus aztreonamą, tačiau dažnai pasitaiko, kad kartu su BKK bakterijos gamina ISBL, todėl tampa atsparios ir aztreonamui (Walsh *et al.*, 2005).

Genai, koduojantys daugelį BKK, yra randami kaip genų kasetės, kurios lokalizuotos pirmos ir trečios klasės integronuose (Walsh *et al.*, 2005). Genų kasetė yra maža žiedinė DNR, koduojanti vieną geną ir 59 bazių elementą (59-be) – rekombinacijos vietą, reikalingą genų kasetei rekombinuotis į integroną. Toks integronas, turintis vieną ar kelias genų kasetes su atsparumą antibiotikams lemiančiais genais, dažniausiai randamas transpozone ar plazmidėje, todėl integronas laisvai gali būti pernešamas iš vienos bakterijos į kitą. Integronas dažniausiai turi kelias genų kasetes, pavyzdžiui integrone, kuriame koduojama *GIM-1* karbapenemazė, taip pat yra koduojamos *OXA-2* β -laktamazės genas ir antibiotiko aminoglikozido atsparumo genai *aacA4* ir *aadA1* (Castanheira *et al.*, 2004). Tokiu atveju vykstant genų pernašai yra pernešami ne vienas atsparumo genas, o visi trys.

1.4.2.1 *IMP* karbapenemazė

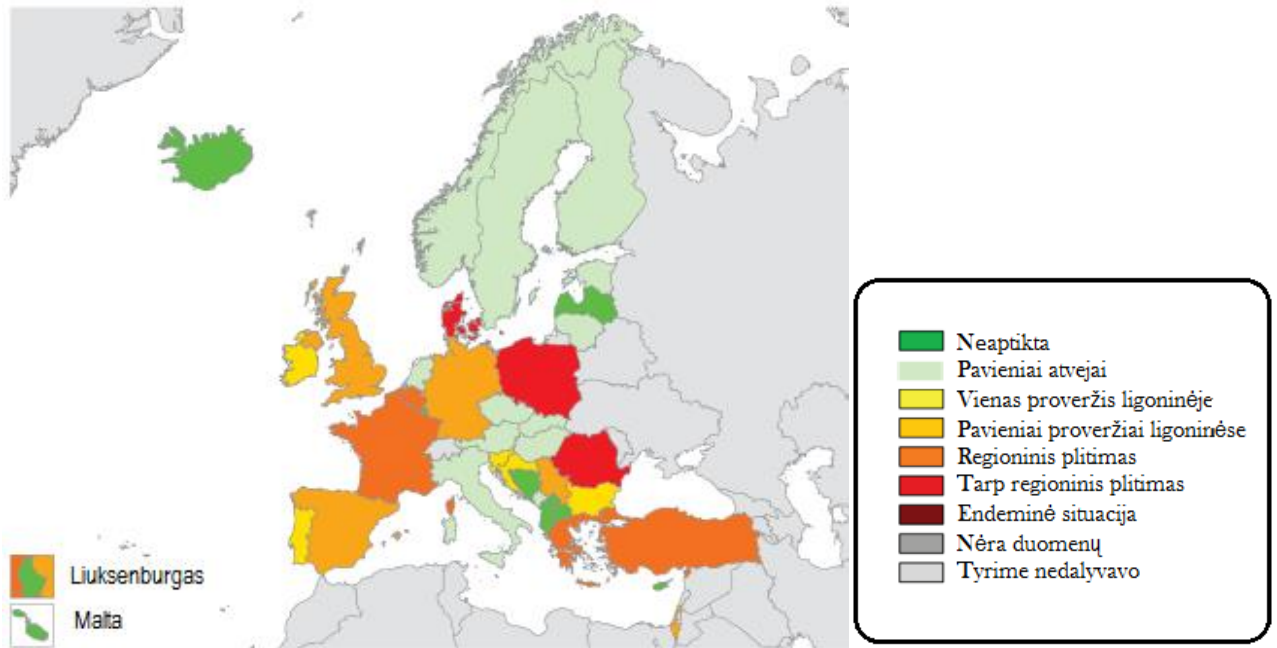
Kaip jau buvo minėta, pirmoji aptikta BKK buvo *IMP-1*. Nors pirmą kartą buvo registruota Japonijoje, po kurio laiko *IMP* išplito po visą pasaulį. Šiuo metu *IMP* dažniausiai yra randama *P. aeruginosa*, nors *Enterobacteriaceae* šeimoje ši karbapenemazė taip pat aptinkama (dažniausiai *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ir *Enterobacter* spp). *IMP* gaminančios Enterobakterijos labiausiai sutinkamos Japonijoje, Kinijoje, Taivane ir Australijoje (Matsumura *et al.*, 2017). Pagal 2013 EuSCAPE tyrimo duomenis, kai kuriose Europos šalyse *IMP* koduojančių bakterijų taip pat sutinkama (5 pav.), nors lyginant su kitomis karbapenemazėmis, paplitimas nėra didelis. Vienas hospitalinis proveržis registruotas Ispanijoje, o pavieniai *IMP* gaminančių bakterijų atvejai nustatyti Didžiojoje Britanijoje, Airijoje, Olandijoje, Vokietijoje, Lenkijoje, Austrijoje, Kroatijoje, Turkijoje, Maltoje ir Kipre. Tuo tarpu Lietuvoje, kaip ir nemažai kitų šalių, *IMP* neaptikta (Glasner *et al.*, 2013). Taigi *IMP* nėra plačiai paplitęs Europoje, tačiau aptinkama kai kuriose šalyse ir paplitimas gali palaipsniui didėti.



5 pav. IMP koduojančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų paplitimas 38 Europos šalyse. 2013 m. EuSCAPE tyrimo duomenys. Koreguota straipsnio (Glasner *et al.*, 2013) iliustracija.

1.4.2.2 NDM karbapenemazė

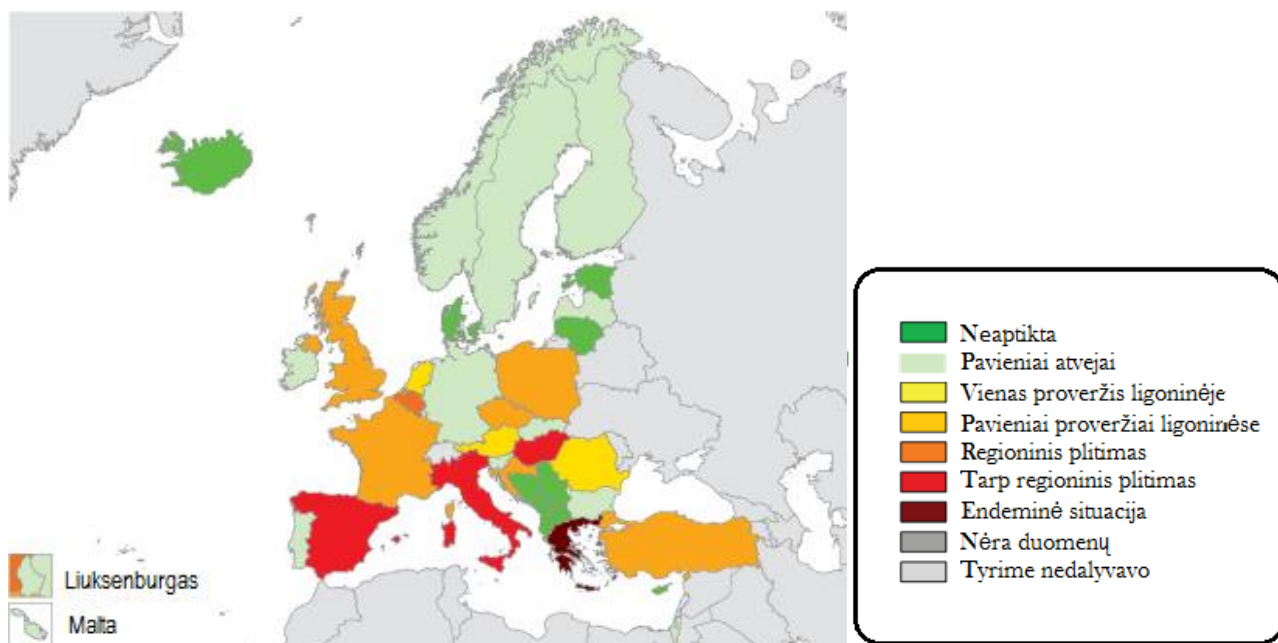
NDM (Naujojo Delio MBL) yra dar viena dažnai pasitaikanti B klasės karbapenemazė. Pirmą kartą ji aptikta visai neseniai, 2008 metais buvo identifikuota NDM koduojanti *K.pneumoniae*, sukėlusį Švedijos pacientui, hospitalizuotam Indijoje, Naujajame Delyje, šlapimo takų infekciją (Yong *et al.*, 2009). Naujajame Delyje NDM aptikta ir vandens šaltiniuose (Walsh *et al.*, 2011), tai paaiškino faktą, kodėl ši karbapenemazė pradėjo taip greitai plisti. Manoma, kad be Indijos, kitas NDM rezervuaras galėjo būti Balkanai (Dortet *et al.*, 2014). Iš šių dviejų rezervuarų NDM paplito po visą pasaulį. NDM randama ne tik *K.pneumoniae*, bet ir kitose bakterijose: *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.*, tačiau dažniausiai identifikuojama liko *Enterobacteriaceae* šeimoje (Cuzon *et al.*, 2013). NDM-1 yra dažniausiai pasitaikantis NDM variantas ir labiausiai paplitęs Azijos kontinente. Iš visų NDM-1 gaminančių bakterijų, 58.15 % jų randama Kinijoje ir Indijoje, Europoje – 16.8 % (Khan *et al.*, 2017). Iš 2015 m. EuSCAPE tyrime dalyvaujančių šalių, Lenkijoje, Danijoje ir Rumunijoje NDM paplitimas yra didžiausias, po jų seka Ispanija, Graikija ir Turkija. Lietuvoje ir 10 kitų šalių stebėti pavieniai NDM atvejai (6 pav.) (Albiger *et al.*, 2015).



6 pav. NDM koduojančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų paplitimas 38 Europos šalyse. 2015 m. EuSCAPE tyrimo duomenys. Koreguota straipsnio (Albiger *et al.*, 2015) iliustracija.

1.4.2.3 *VIM* karbapenemazė

VIM (Verona integrone užkoduota MBL) yra 1997 metais Italijos mieste Veronoje aptikta nauja BKK (Lauretti *et al.*, 1999). Tada ji buvo identifikuota *P.aeruginosa* izoliata, 1 klasės integrone. Šiuo metu yra priskaičiuojama 41 *VIM* variantai, kurie labiausiai paplitę tarp *P.aeruginosa*, bet dažnai randami ir *Enterobacteriaceae* šeimoje. *VIM-2* yra laikoma pačia dažniausia BKK pasaulyje (Nordmann ir Poirel, 2014). Iš 2015 m. EuSCAPE tyrimo matyti, kad Europoje *VIM* labiausiai paplitęs Graikijoje, kur situacija laikoma endeminė. Po Graikijos, daugiausia *VIM* koduojančių Enterobakterijų nustatyta Ispanijoje, Italijoje ir Vengrijoje. Kitose šalyse stebimas mažesnis *VIM* paplitimas, o 5 šalyse, tarp jų ir Lietuvoje, *VIM* visai neaptikta (7 pav.) (Albiger *et al.*, 2015). Už Europos ribų, *VIM* plačiai paplitęs pietryčių Azijoje (Šiaurės Korėja, Taivanas) ir kai kuriuose Afrikos regionuose (Nordmann ir Poirel, 2014).



7 pav. VIM koduojančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų paplitimas 38 Europos šalyse. 2015 m. EuSCAPE tyrimo duomenys. Koreguota straipsnio (Albiger *et al.*, 2015) iliustracija.

1.4.2.4 GIM karbapenemazė

GIM (Vokietijos imipenemazė) pirmą kartą identifikuota 2002 m. Vokietijoje *P. aeruginosa* izoliata 1 klasės integrone (Castanheira *et al.*, 2004). Įdomu, kad iki šiol GIM nebuvo identifikuota už Vokietijos ribų, tačiau stebimas GIM išplitimas tarp bakterijų. Po kurio laiko GIM buvo identifikuota *Enterobacteriaceae* šeimoje (Wendel *et al.*, 2013) ir netrukus, Vokietijoje, GIM-1 buvo paskelbta antra labiausiai paplitusia karbapenemaze tarp *Enterobacterijų* (Kaase, 2013). Nepraėjus daug laiko nuo to, buvo atrastas dar vienas geno variantas – GIM-2 (Wendel ir MacKenzie, 2015). Visa tai rodo, kad GIM karbapenemazė plinta ir po kurio laiko gali būti sutinkama ir kitose šalyse ar kitų rūšių bakterijose. Iki šiol GIM karbapenemazė Lietuvoje nebuvo tirta, tačiau žinant šios karbapenemazės paplitimą Vokietijoje ir nuolat vykstančią migraciją, būtų įdomi ištirti Lietuvos pacientams išskiriamas *Enterobakterijas*.

1.4.3 C klasės β-laktamazės (CKBL)

Ambler C klasės β-laktamazės (AmpC cefalosporinazės) geba hidrolizuoti cefalosporinus, penicilinus, monobaktamus, o aktyvumas prieš karbapenemus yra labai mažas ir jos nėra priskiriamos prie karbapenemazių (Jacoby, 2009). 1940 m. AmpC buvo pirmasis identifikuotas penicilinus ardantis fermentas (Abraham ir Chain, 1988). AmpC gamina *Enterobacteriaceae* ir kai kurios kitos bakterijų šeimos. Tarp *Enterobacterijų*, chromosominį AmpC geną koduoja *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*. *E. coli* pastoviai ekspresuoja nedidelį AmpC β-laktamazės kiekį, kuris nesukelia atsparumo β-laktamams. Geno amplifikacijos

atveju arba įvykus mutacijai promoriaus srityje, pagaminamo baltymo kiekis gali išaugti ir sukelti atsparumą. Kitaip vyksta likusiose trijose rūšyse, ten *AmpC* genas yra indukuojamas kai kurių β-laktamų. *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis* ir *Salmonella spp.* chromosoje nekoduoja *AmpC* geno, tačiau gali jį koduoti plazmidėje (Hanson, 2003). Egzistuoja 6 pagrindinės *AmpC* grupės: CMY, ACT/MIR, DHA, FOX, ACC ir ADC/PDC. Yra žinoma, kad tarp Enterobakterijų plazmidėmis plinta CMY, ACT/MIR ir DHA grupės. ACT/MIR variantas dažniausiai randamas *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* ir *Enterobacter asburiae*, CMY – *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, DHA – *K. pneumoniae*, *E. coli* ir *Morganella morganii* bakterijose (Brandt *et al.*, 2017).

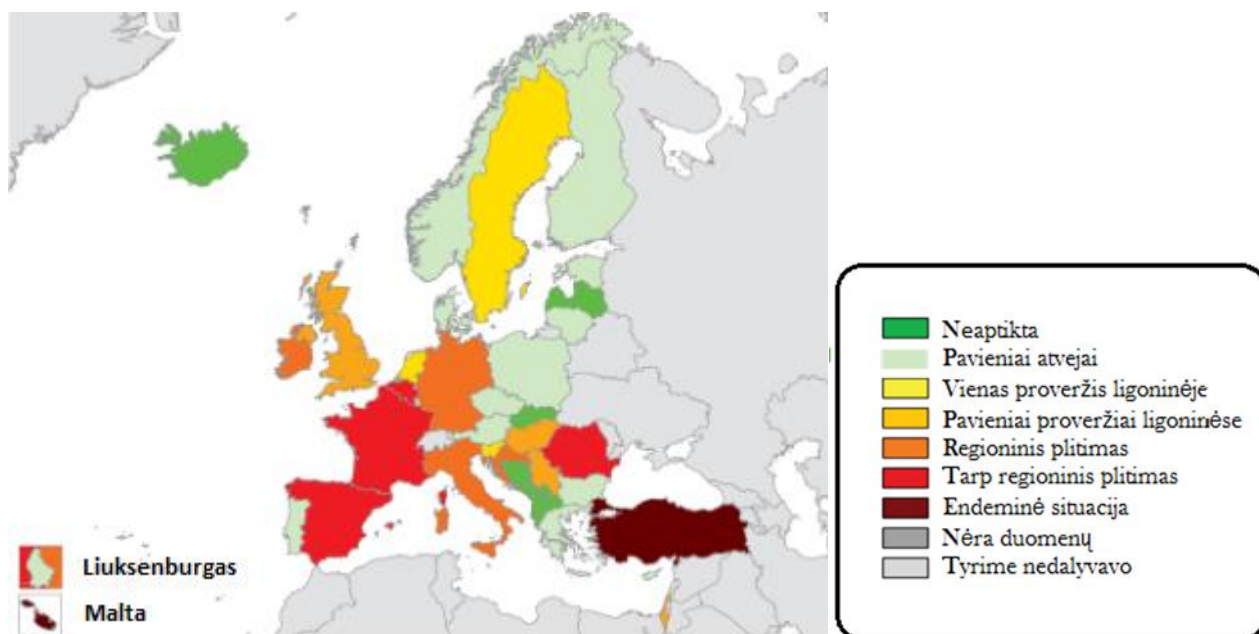
Yra žinoma, kad karbapenemų minimali slopinanti koncentracija (MSK) gali būti padidėjusi dėl C klasės β-laktamazių gamybos. Yra duomenų, kad *AmpC* kartu su porinų mutacija (Lutgring ir Limbago, 2016) ir/arba padidėjusia išmetamųjų pumpų ekspresija (Quale *et al.*, 2006), prisideda prie atsparumo karbapenemams. Taigi bakterijos, kurios chromosomoje koduoja *AmpC*, prie atsparumo karbapenemams gali prisidėti esant padidėjusiai *AmpC* raiškai, o kitos, tokios kaip *K. pneumoniae* – koduojant *AmpC* plazmidėje. Daugelyje informacijos šaltinių teigiama, kad CKBL nepasižymi karbapenemaziniu aktyvumu ir nesuardo β-laktaminio žiedo, tačiau neseniai buvo nustatyta ADC-68 CKBL struktūra, kuri atskleidė, kad dėl pokyčio R2 ir C kilpose, ADC-68 veikia kaip karbapenemazė (Jeon *et al.*, 2014). Todėl gali būti, kad vienas iš *AmpC* veikimo būdų prieš karbapenemus yra karbapenemazinis. Be to, yra žinoma, kad *AmpC* β-laktamazės gali kovalentiškai prisijungti prie karbapenemų ir taip sutrukdyti pasiekti savo taikinį. Jeigu *AmpC* raiška yra padidėjusi, poveikis karbapenemams tampa ryškesnis ir tai atsispindi padidėjusia karbapenemų MSK (Boxtel *et al.*, 2017).

1.4.4 D klasės karbapenemazės (DKK)

D klasės karbapenemazės dar yra vadinamos oksacilinazės (OXA) tipo fermentai. DKK kaip A ir C klasės, aktyviajame centre turi seriną, būtiną fermentiniam aktyvumui. D klasėje yra daugiau kaip 350 genetiškai skirtingų fermentų, lyginant su A ir B klasėmis, DKK pasižymi silpniausiu aktyvumu prieš karbapenemus. Be to, DKK neturi poveikio plataus spektro cefalosporinams ir aztreonamui (Hammoudi *et al.*, 2014). Kaip ir kitų klasių β-laktamazės, kai kurios bakterijų rūšys DKBL turi chromosomose, o kitos – tik plazmidėse. Plazmidėje DKBL dažniausiai yra randamos 1 klasės integronuose (Poirel *et al.*, 2010). DKBL dažniausiai yra randamos *Acinetobacter spp.*, tačiau pastaruoju metu *OXA-48* tampa vyraujanti karbapenemazė *Enterobacteriaceae* šeimoje (Glupczynski *et al.*, 2016).

1.4.4.1 OXA-48 karbapenemazė

Pastaruoju metu stebima daug tyrimų, kurių metu aptinkama OXA-48 karbapenemazę gaminančios bakterijos, išskirtos tiek iš žmonių, tiek laukinių ir naminių gyvūnų, užteršto maisto (Mairi *et al.*, 2017). Pirmą kartą OXA-48 buvo identifikuota 2001 metais *K.pneumoniae* izoliata Turkijoje (Poirel *et al.*, 2004). Šiuo metu OXA-48 taip ir liko dažniausiai identifikuojama *K.pneumoniae*, tačiau yra randama ir kitose *Enterobacteriaceae* rūšyse, tokiose kaip *E.coli*, *E.cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* ir kt. Bakterijų, gaminančių OXA-48, sukeltos infekcijos nustatomos daugelyje pasaulio vietų, ypač Europos šalyse ir Viduržemio jūros regione (Mairi *et al.*, 2017). Iš 2015 m. EuSCAPE tyrimo duomenų matyti, kad Europoje OXA-48 labiausiai yra paplitusi Turkijoje ir Maltoje, kur situacija laikoma endeminė. Toliau seka Ispanija, Prancūzija, Belgija ir Rumunija, čia stebimas tarpregioninis paplitimas. Lietuvoje ir kitose 11 šalių užregistruoti pavieniai atvejai (8 pav.) (Albiger *et al.*, 2015).



8 pav. OXA-48 koduojančių *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijų paplitimas 38 Europos šalyse. 2015 m. EuSCAPE tyrimo duomenys. Koreguota straipsnio (Albiger *et al.*, 2015) iliustracija.

1.5 Karbapenemazių ir C klasės β -laktamazių nustatymas

Pagal EUCAST (Europos antimikrobinių jautrumo tyrimų komitetas) rekomendacijas, siekiant pagerinti infekcijų kontrolę ir visuomenės sveikatą, yra svarbu identifikuoti atsparumo karbapenemams mechanizmus (EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versija 2.0, 2017). Iš β -laktamazinių fermentų, karbapenemazės ir AmpC cefalosporinazės gali būti atsparumo

karbapenemams priešastis (Lutgring ir Limbago, 2016). Yra žinoma, kad tiek AmpC, tiek karbapenemazes gaminančios Enterobakterijos (KGE) yra siejamos su nepalankia prognoze, sunkiu gydymu ir mirtingumo padidėjimu, todėl yra svarbus tokių izoliatų aptikimas norint suvaldyti sukeliamų infekcijų plitimą ir žinoti epidemiologinę situaciją (Helmy ir Wasfi, 2014). Tais atvejais, jei nustatoma, kad pacientas yra kolonizuotas/infekuotas KGE, gali būti imtasi vykdyti tam tikras rekomendacijas siekiant išvengti KGE plitimo. Dažniausiai naudojamos rekomendacijos: kolonizuoto/infekuoto KGE paciento izoliavimas, rankų ir aplinkos higienos sustiprinimas, atsargumo priemonių laikymasis kontaktuojant lankytojams ir ligoninės personalui su sergančiuoju, kolonizuoto paciento stebėjimas (Albiger *et al.*, 2015).

Egzistuoja įvairūs metodai, galintys patvirtinti, kad bakterija gamina AmpC ar karbapenemazes. Dažniausiai jie yra suskirstomi į dvi pagrindines grupes (Hammoudi *et al.*, 2014; Asthana *et al.*, 2014; Lutgring ir Limbago, 2016):

1. **Fenotipiniai metodai:** modifikuotas Hodge testas (MHT), karbapenemazių ar AmpC inhibitoriais paremti testai, chromogeniniai testai;
2. **Molekuliniai metodai:** polimerazės grandininė reakcija (PGR), nukleorūgščių hibridizacija ir sekvenavimas.

1.5.1 Fenotipiniai metodai

Fenotipiniai metodai yra lengvai atliekami, nereikalauja specialios ir brangios įrangos. Tačiau tyrimo atlikimas trunka ilgai, 18-24 val., nes ant mitybinių terpių užsėta bakterijų kultūra yra auginama per naktį. Nė vienas šiuo metu esamas fenotipinis metodas nepasižymi reikiamu jautrumu ir specifiškumu. MHT pasižymi gana aukštu specifiškumu ir yra vienintelis CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) rekomenduojamas fenotipinis metodas karbapenemazių aptikimui bakterijose (AlTamimi *et al.*, 2017). Tačiau MHT nepasižymi dideliu jautrumu ir specifiškumas B klasės karbapenemazėms yra žemas (Girlich *et al.*, 2012). Tuo tarpu CLSI neturi jokių rekomendacijų AmpC aptikimui fenotipiniais metodais (Helmy ir Wasfi, 2014). Be to, fenotipiniai metodai nėra tinkami epidemiologinei analizei, nes nenustato, kuris tiksliai fermentas yra gaminamas.

1.5.2 Molekuliniai metodai

Karbapenemazių ir AmpC cefalosporinazių aptikimas molekuliniais metodais yra jautrus ir specifiškas, iš užaugintos bakterijų kolonijos atliekamas pakankamai greitai, per 4-6 val. (AlTamimi *et al.*, 2017; Helmy ir Wasfi, 2014). Molekulinių metodų pagalba galima ne tik nustatyti, kad bakterija gamina karbapenemazes ar AmpC, bet identifikuoti tikslų fermentą. PGR ir nukleorūgščių hibridizacija naudojama jau žinomų fermentų identifikavimui, o naujų fermentų

aptikimui pasitelkiamas sekvenavimas (Lutgring ir Limbago, 2016). PGR pagrįsti metodai yra laikomi auksiniu standartu žinomų karbapenemazių ir *AmpC* genų aptikimui (Smiljanic *et al.*, 2017; Helmy ir Wasfi, 2014).

1.5.2.1 Polimerazės grandininė reakcija

PGR yra Kary Mullis 1980 metais išrastas metodas, sukėlęs revoliuciją biologijos moksle (Mullis, 1990). 1994 m. už PGR atradimą Kary Mullis gavo Nobelio premiją. Po šio metodo atsiradimo labai prasiplėtė mokslinių, vėliau ir klinikinių, tyrimų galimybės, PGR panaudojimo sritys dar ir dabar nenustoja plėstis (Valones *et al.*, 2009). Viena iš PGR naudojamų sričių – žinomos sekos geno paieška tiriamojame DNR.

Straipsnių autoriai, ieškodami atsparumo genų, naudojami tiek įprasta PGR technologija, kai PGR produktai vizualizuojami elektroforezės pagalba (Sayed *et al.*, 2017), tiek tiksliai PGR (TL-PGR), čia reakcijos produktų vizualizacija vyksta iškart PGR metu ir yra galimybė gauti kiekybinius rezultatus. Didžioji dalis tyrimų autorių renkasi greitesnį ir tikslesnį TL-PGR metodą, vykdamas viename mėgintuvėlyje vieno geno arba iškart kelių genų (daugybė TL-PGR) paiešką (Smiljanic *et al.*, 2017; Weib *et al.*, 2017). Naudojant TL-PGR galima gauti kiekybinius rezultatus, tai reikalinga norint nustatyti chromosominio *AmpC* padidėjusią ekspresiją (El-Hady ir Adel, 2015; Mohd Khari *et al.*, 2016). Šiuo metu yra sukurti pradmenys daugeliui žinomų karbapenemazių ir *AmpC* cefalosporinazių, taip pat kuriami komerciniai rinkiniai, skirti dažniausiai pasitaikančių karbapenemazių aptikimui (Hoffnung *et al.*, 2017). Panaudojus TL-PGR, karbapenemazių genai yra aptikti tiek iš pacientų išskirtuose bakterijų izoliatuose, tiek ir upių, vandens nuotekų, nuosėdų ėminiuose (Subirats *et al.*, 2017).

PGR atitinka tris svarbius kriterijus, reikalingus atsparumo genams aptikti: didelis jautrumas ir specifiskumas, greitas atlikimas. Tačiau metodas turi ir vieną pagrindinį trūkumą, tai yra aukšta jo kaina. Todėl kartais PGR naudojimas bakterijų atsparumo tyrimams būna apribotas (Nordmann ir Poirel, 2017).

2. TYRIME NAUDOTI METODAI

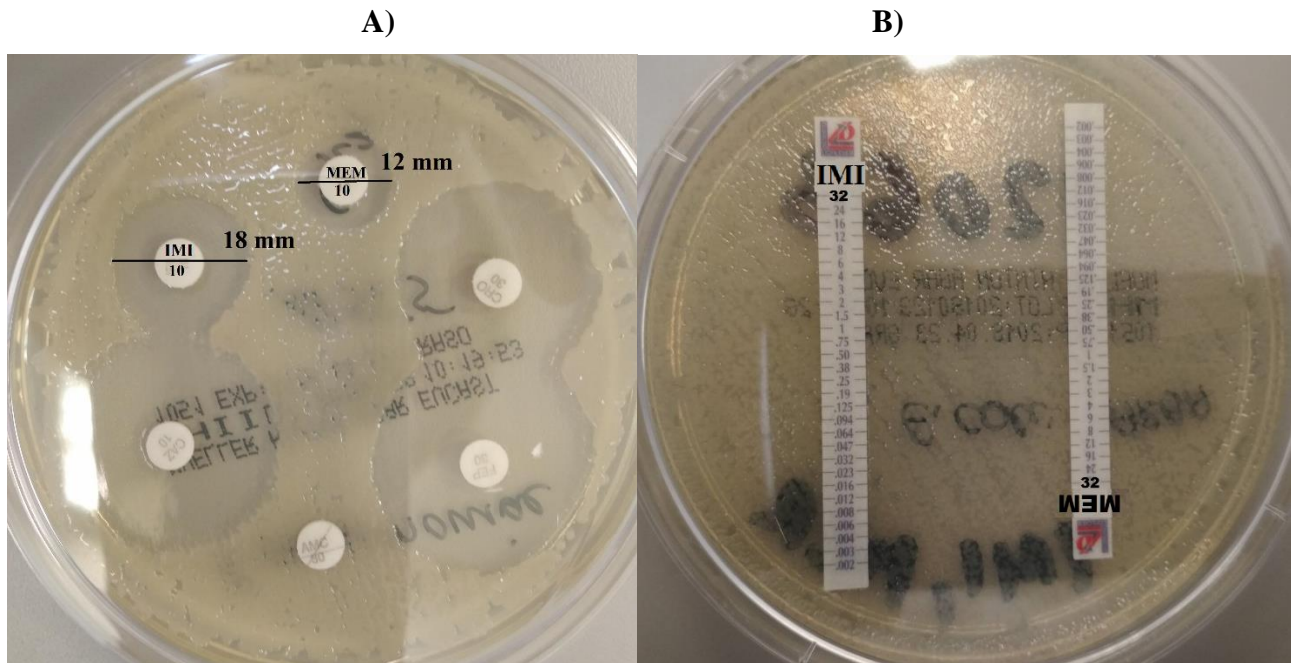
2.1 *Enterobacteriaceae* izoliatų atranka ir rinkimas

Bakterijų izoliatai β -laktamazijų genų tyrimui buvo atrenkami vadovaujantis EUCAST nurodytomis epidemiologinėmis slenkstinėmis vertėmis (ESV). Į tyrimą buvo įtrauktos karbapenemams atsparios arba mažiau jautrios Enterobakterijos, kurios išskirtos iš įvairių mėginių VUL Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje. EUCAST nurodo, kad nepaisant to, jeigu iš MSK ir diskų difuzijos metodų slopinimo zonos gauta, kad bakterija yra jautri (J) ar mažai jautri (MJ) karbapenemams, ji vis tiek gali būti potenciali karbapenemazės nešioja. Todėl pagal ESV, izoliatai, kurių MSK reikšmė meropenemui yra didesnė už 0,12 mg/l ir diskų difuzijos augimo slopinimo zonos skersmuo mažesnis už 25 mm (1 lentelė), buvo atrenkami tiriamųjų genų paieškai.

1 lentelė EUCAST nurodytos kritinės vertės karbapenemazes gaminančių *Enterobacteriaceae* atrankai (EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versija 2.0, 2017).

Karbapenemas	MSK (mg/l)		Diskų difuzijos zonos skersmuo (mm) su 10 μ g disku	
	J/MJ	ESV	J/MJ	ESV
Meropenemas	≤ 2	> 0.12	≥ 22	< 25
Imipenemas	≤ 2	> 1	≥ 22	< 23
Ertapenemas	≤ 0.5	> 0.12	≥ 25	< 25

Enterobacteriaceae šeimos bakterijų izoliatai buvo renkami nuo 2017 m. balandžio mėnesio iki 2018 m. gegužės mėnesio. Enterobakterijų izoliatai buvo gaunami iš VUL SK Mikrobiologijos laboratorijos, izoliatams laboratorijos personalas jau buvo nustatęs jautrumą karbapenemams. Jeigu pagal ESV matyti, kad izoliatas tinkamas tyrimui (9 pav.), tada jis buvo užšaldomas prieš tai atšviežinus kultūrą. Į tyrimą pateko tik po vieną skirtingą Enterobakterijų rūšių kultūrą iš kiekvieno paciento, todėl tyrime dublikatų nebuvo.



9 pav. Du Enterobakterijų izoliatų pavyzdžiai, kurie buvo įtraukti į tyrimą. A) *Klebsiella pneumoniae* izoliatas, meropenemo (MEM) ir imipenemo (IMI) diskų difuzijos zonos skersmuo yra mažesnis už 25 mm. B) *Escherichia coli* izoliatas yra atsparus visom MSK juostelėje pateiktoms IMI ir MEM koncentracijoms, MEM ir IMI MSK reikšmė yra didesnė už 0,12mg/l (MEM) ir 1mg/l (IMI).

2.2 Kultūros atšviežinimas

Iš bakterijų kultūros, kuri laboratorijos personalo buvo užauginta su MSK juostelėmis ar antibiotikų diskais, steriliu vatos tamponu (Copan Diagnostic Inc., Kanada) paimtas nedidelis kiekis kultūros ir užsėtas ant kraujo agarą be priedų. Lėkštelėje užsėta kultūra auginta termostate (Memmert Ine 600, Vokietija) apie 18-24 val. prie 35 ± 1 °C.

2.3 Kultūros šaldymas

Atšviežinta kultūra buvo užšaldyta -80 °C šaldiklyje. Su 1 µl bakteriologine kilpele (Biosigma, Italija) paimta atšviežintos kultūros kolonija ir perkelta į Viabank® (Medical Wire & Equipment, Jungtinė Karalystė) šaldymo mėgintuvėlį. Svarbu, kad kolonija terpėje pasklistų, todėl užsuktas mėgintuvėlis buvo vartomas delne. Perteklinė konservanto dalis, esanti virš rutuliukų, nusiurbta 3 ml vienkartinė pipete (Biosigma, Italija). Mėgintuveliai perkelti į -80 °C šaldiklį (Thermo Scientific, Jungtinė Karalystė) ir ten saugoti tol, kol bus surinktas pakankamas kiekis izoliatų TL-PGR analizei.

2.4 Tiriamosios medžiagos paruošimas TL-PGR analizei

PGR tyrimui atlikti yra būtina turėti tiriamosios medžiagos DNR. Tam tikslui iš užšaldytų kultūrų buvo užauginta šviežia bakterijų kultūra ir bakterijos suardytos karščiu.

2.4.1 Šviežios kultūros užauginimas iš užšaldytų izoliatų

Užšaldyta bakterijų kultūra buvo atšildyta kambario temperatūroje ir lengvai suvartyta delne. Sterilų vatos tamponą įmerkus į mėgintuvėlį su atšildyta kultūra, su tamponu bakterijos užsėtos ant MacConkey agaru. Lėkštelė su užsėta kultūra inkubuota 18-24 val. termostate prie 35 ± 1 °C.

2.4.2 Bakterijų ardymas

Su 1 μ l bakteriologine kilpele buvo pakabinta šviežia kultūra ir perkelta į 1,5 ml mėgintuvėlį prieš tai į jį įpylus 200 μ l distiliuoto vandens. Gautas mišinys purtykle (Biosan FV-2400, Latvija) supurtytas, kad bakterijos homogeniškai pasklistų vandenyje. Tada mėgintuvėlis 10 min kaitintas prie 99 °C termo purtyklėje (Biosan TS-100, Latvija), esant 300 aps/min. Kaitinant bakterijos sienelė ir membrana yra suardomos, ląstelės turinys išsilieja ir nukleorūgštys yra prieinamos PGR fermentams (Dashti *et al.*, 2009). Suardytų bakterijų mišinys iškart naudotas TL-PGR analizei arba laikytas -20 °C šaldiklyje iki PGR tyrimo.

2.5 TL-PGR

TL- PGR reakcija buvo atliekama Rotor-GeneTM 3000 aparatu (Corbett research, Australija), naudojant trijų žingsnių PGR programą: vienas ciklas - 10 min 95 °C, 40 ciklų – 20 s 95 °C, 1 min 60 °C (55 °C išskirtinai *GES*, *ACT*, *CMY-2* ir *DHA* genų taikiniams), 10 s 72 °C. Gauti TL-PGR rezultatai analizuojami naudojant Rotor-GeneTM 3000 1.7 programinę įrangą.

2.5.1 Naudoti pradmenys ir zondai, kontrolės

Reakcijai reikalingi *KPC*, *GES*, *GIM*, *NDM*, *IMP*, *VIM*, *OXA-48* karbapenemazių ir *ACT*, *DHA* ir *CMY-2 AmpC* cefalosporinazių pradmenys (2 lentelė) ir zondai (3 lentelė) buvo parinkti dr. Maksim Bratčikov. Zondai reikalingi PGR produktų aptikimui. Kadangi viename TL-PGR mėgintuvėlyje buvo gausinami trys taikiniai, naudoti trys skirtingi prie zondo prijungti fluorochromai: FAM, HEX ir ROX.

2 lentelė Tiriamųjų genų pradmenų nukleotidų sekos. Pradmens sekoje raidė R atitinka A arba G nukleotidą (nt), W – A arba T nt, M – A arba C nt, Y – C arba T nt, K – G arba T nt, B – C arba G arba T nt, N – bet kurį nt. (T) ir (A) atitinkamai žymi tiesioginį ir atvirkštinį pradmenis.

β-laktamazės	Geno pavadinimas	Pradmens seka (5' – 3')
A klasės karbapenemazės	<i>KPC</i>	CGATACCACGTTCCGTCTGGAC (T) TGTAAGCTTTCCGTCACGGC (A)
	<i>GES</i>	CGCAGCGTTTTGCAATGTGCT (T1) CCAGCGCTTCGCCATGTGCA (T2) CCGCTCGGTGCCTGAGTCAA (A1) GCTCGGTGCCGCTGTTCGAT (A2)
B klasės karbapenemazės	<i>GIM</i>	CTATCCAGGTGCTGGGCATACAG (T) CTACGTAACCTAAGCCTTCCCAC (A)
	<i>NDM</i>	GAAGCTGAGCACCGCATTAGC (T) GTGTGCTGCCAGACATTCGG (A)
	<i>IMP</i>	TGGTTTGTAGGGCGCGGCT (T1) TGGTTTGTGGARCGTGGCT (T2) TCAGATGCATACGTGGGRATWGATYGAGA (A)
	<i>VIM</i>	GTGCGCTTCGGTCCMGTAGA (T) GCCATTCAGCCARRTYGGCATC (A)
D klasės karbapenemazės	<i>OXA-48</i>	GCGTGTATTAGCCTTATCGGCTGTG (T) CTCATTCCAGAGCACAACACTACGCC (A)
C klasės AmpC β-laktamazės	<i>ACT</i>	CTGGCRCAGTCNCGCTACTGG (T) GTNGAGCCBGTTTTTRTGBACCCAKGA (A)
	<i>DHA</i>	CGGGCGATATGCGTCTGTATGCA (T1) CGGGAAAGATGCGTCTGTATGCG (T2) RGTCAGCAACTGCTCATAMGGCA (A)
	<i>CMY-2</i>	AGTATTKCGTGACCGGRTCGYTGA (T) TGATGCAGGAGCDGGCWATTCCG (A)

3 lentelė TL-PGR produktų aptikimui naudotų zondų sekos. 5` gale prijungtas fluoroforas FAM arba HEX, 3` gale – fluorescensiją gesinantis dažas BHQ1. Zondo sekoje raidė R atitinka A arba G nt, W – A arba T nt, Y – C arba T nt, H – A arba C arba T nt, S – C arba G nt, K – G arba T nt, B – C arba G arba T nt, N – bet kurį nt.

β-laktamazės	Geno pavadinimas	Zondo seka (5' – 3')
A klasės karbapenemazės	<i>KPC</i>	FAM-TGAACTCCGCCATCCCAGGCG-BHQ1
	<i>GES</i>	FAM-TTCAAGTTTCCGCTRGCCGCSCTG-BHQ1

B klasės karbapenemazės	<i>GIM</i>	FAM-TGACTCCTCACGAGGCAGCCACC-BHQ1
	<i>NDM</i>	HEX-TCGCCAAACCGTTGGTCGCCAG-BHQ1
	<i>IMP</i>	HEX-TAGCGACAGYACRGGHGAATAGAGTG- BHQ1
	<i>VIM</i>	HEX-TCTATCCTGGTGCTGCGCATTCGRSC-BHQ1
D klasės karbapenemazės	<i>OXA-48</i>	FAM-TGCCWGCGGTAGCAAAGGAATGGC-BHQ1
C klasės AmpC β-laktamazės	<i>ACT</i>	HEX-TGGGARATGCTBAACTGGCCNGTNGA- BHQ1
	<i>DHA</i>	HEX-TCGGCCTGTTTGGTGCKCTGACCG-BHQ1
	<i>CMY-2</i>	FAM-TCGCSGCCCARCACRCCGTTA-BHQ1

Tyrimo metu, kaip teigiama kontrolė buvo naudojami Enterobakterijų izoliatai, turintys tiriamus karbapenemazių genus. Enterobakterijų izoliatai su žinomais karbapenemazių genais buvo gauti iš Švedijos, Baltijos regiono šalių antimikrobinio atsparumo tinklo (angl. *Baltic Antibiotic Resistance collaborative Network*). AmpC cefalosporinazių tyrimui, teigiama kontrolė buvo gauta sumaišius 186 Enterobakterijų izoliatų genetinę medžiagą. Atlikus tokio mišinio TL-PGR, jame rasti visų trijų tiriamųjų genų (*ACT*, *DHA*, *CMY-2*) taikiniai, todėl toliau šis mišinys naudotas kaip teigiama kontrolė. Neigiamai kontrolei vietoj tiriamosios DNR buvo naudojamas distiliuotas vanduo. Darbo metu taip pat buvo naudojama vidinė kontrolė, reikalinga tiriamosios DNR izoliavimo procedūros kontroliavimui ir galimo PGR slopinimo patikrinimui. Vidinei kontrolei buvo naudojama dr. Maksim Bratčikov sukurta plazmidė su dirbtiniu fragmentu, kuris yra gausinamas naudojant 4 lentelėje pateiktus pradmenis.

4 lentelė Vidinės kontrolės pradmenų sekos ir gausinamo produkto aptikimui naudojamo zondo seka. Zondo 5` gale prikabinatas fluorochromas ROX, 3` gale – fluorescensiją gesinantis dažas BHQ2. (T) – tiesioginis, (A) – atvirštinis pradmuo.

Pradmenys ir zondas	Nukleotidų seka (5' – 3')
Pradmuo (T)	CCGAGGACGAAATGGAAGTG
Pradmuo (A)	GGTGATGTTCTGAGTACATAGCGG
Zondas	ROX-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-BHQ2

2.5.2 TL-PGR reakcijos mišinio paruošimas

PGR reakcijos mišinys buvo ruošiamas ir išpilstomas į PGR mėgintuvėlius AirClean® 600 laminare (Starlab, Vokietija). Viename PGR mėgintuvėlyje buvo gausinami dviejų tiriamųjų genų taikiniai ir vidinės kontrolės taikins. Taigi išviso buvo gausinami trys taikiniai, todėl pirmiausia buvo pasiruošiami pradmenų ir zondų mišiniai, kuriuos sudaro dviejų tiriamųjų genų ir vidinės kontrolės pradmenys ir zondai (5 lentelė). Pradmenų ir zondų mišiniai vėliau naudojami TL-PGR reakcijos mišiniui gaminti.

5 lentelė Pradmenų ir zondų mišiniai. **A)** GIM, VIM ir vidinės kontrolės pradmenų ir zondų mišinys; **B)** KPC, NDM ir vidinės kontrolės pradmenų ir zondų mišinys; **C)** DHA, CMY-2 ir vidinės kontrolės pradmenų ir zondų mišinys; **D)** GES, ACT ir vidinės kontrolės pradmenų ir zondų mišinys; **E)** OXA-48, IMP ir vidinės kontrolės pradmenų ir zondų mišinys. T – tiesioginis, A – atvirkštinis pradmuo.

A)		B)	
Reagentai	Medžiagų kiekiai (μl)	Reagentai	Medžiagų kiekiai (μl)
ddH2O	25	ddH2O	25
GIM pradmuo T1 (100 μM)	10	KPC pradmuo T (100 μM)	10
GIM pradmuo A (100 μM)	10	KPC pradmuo A (100 μM)	10
GIM zondas (100 μM)	5	KPC zondas (100 μM)	5
VIM pradmuo T (100 μM)	10	NDM pradmuo T (100 μM)	10
VIM pradmuo A (100 μM)	10	NDM pradmuo A (100 μM)	10
VIM zondas (100 μM)	5	NDM zondas (100 μM)	5
Vidinės kontrolės pradmuo T (100 μM)	10	Vidinės kontrolės pradmuo T (100 μM)	10
Vidinės kontrolės pradmuo A (100 μM)	10	Vidinės kontrolės pradmuo A (100 μM)	10
Vidinės kontrolės zondas (100 μM)	5	Vidinės kontrolės zondas (100 μM)	5
Bendras kiekis	100	Bendras kiekis	100

C)		D)	
Reagentai	Medžiagų kiekiai (μl)	Reagentai	Medžiagų kiekiai (μl)
ddH2O	15	ddH2O	15
DHA pradmuo T1 (100 μM)	10	GES pradmuo T1 (100 μM)	10
DHA pradmuo T2 (100 μM)	10	GES pradmuo T2 (100 μM)	10
DHA pradmuo A (100 μM)	10	GES pradmuo A (100 μM)	10
DHA zondas (100 μM)	5	GES zondas (100 μM)	5
CMY-2 pradmuo T (100 μM)	10	ACT pradmuo T (100 μM)	10
CMY-2 pradmuo A (100 μM)	10	ACT pradmuo A (100 μM)	10
CMY-2 zondas (100 μM)	5	ACT zondas (100 μM)	5

Vidinės kontrolės pradmuo T (100 µM)	10	Vidinės kontrolės pradmuo T (100 µM)	10
Vidinės kontrolės pradmuo A (100 µM)	10	Vidinės kontrolės pradmuo A (100 µM)	10
Vidinės kontrolės zondas (100 µM)	5	Vidinės kontrolės zondas (100 µM)	5
Bendras kiekis	100	Bendras kiekis	100

E)

Reagentai	Medžiagų kiekiai (µl)
ddH ₂ O	15
OXA-48 pradmuo T (100 µM)	10
OXA-48 pradmuo A (100 µM)	10
OXA-48 zondas (100 µM)	5
IMP pradmuo T(1) (100 µM)	10
IMP pradmuo T(2) (100 µM)	10
IMP pradmuo A (100 µM)	10
IMP zondas (100 µM)	5
Vidinės kontrolės pradmuo T (100 µM)	10
Vidinės kontrolės pradmuo A (100 µM)	10
Vidinės kontrolės zondas (100 µM)	5
Bendras kiekis	100

Galutinis TL-PGR mišinys buvo paruošiamas sumaišius atitinkamais kiekiais ddH₂O, SensiMix™ II Probe mišinį (Bioline, Jungtinė Karalystė), pradmenų ir zondų mišinį, vidinės kontrolės plazmidę ir tiriamąją DNR (6 Lentelė). Tiriamoji DNR į reakcijos mišinį buvo dedama po to, kai kiti TL-PGR mišinio komponentai buvo sumaišyti ir supilti į 0,1 ml PGR mėgintuvėlius (Qiagen, Vokietija).

6 lentelė RL-PGR mišinio komponentai, reikalingi vienai reakcijai atlikti.

Reagentai	Medžiagų kiekiai (µl)
ddH ₂ O	6,186
SensiMix II Probe (2X)	7,5
Pradmenų ir zondų mišinys	0,3
Vidinės kontrolės plazmidė	0,014
DNR	1
Bendras kiekis	15

2.6 Statistinė analizė

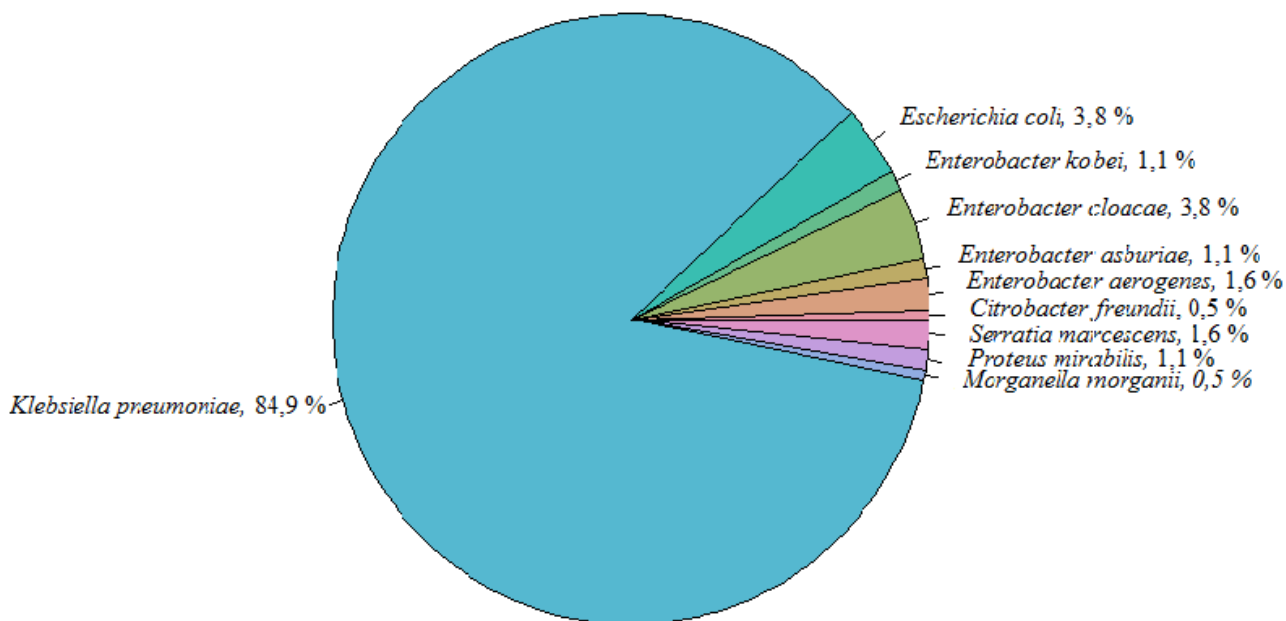
Grafikai sudaryti ir statistinė analizė atlikta naudojantis R 3.3.2 programinę įrangą (Viena, Austrija). Rezultatams apibūdinti naudotos šios charakteristikos: absoliutus skaičius (n), procentas (%), vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm SN$) (normaliai pasiskirsčiusiems duomenims). Šapiro-Vilko testu nustatyta, ar duomenys yra pasiskirstę pagal normalųjį dėsnį. Pagal normalųjį dėsnį pasiskirsčių duomenų vidurkių palyginimui buvo naudotas Stjudento t testas. Kokybinių kintamųjų dažnių palyginimui tarp dviejų grupių naudotas X^2 kriterijus (kai tikėtini dažniai didesni už 5) ir Fišerio tikslusis kriterijus (kai tikėtini dažniai mažesni už 5). Skirtumai vertinami kaip statistiškai reikšmingi tada, kai p reikšmė $< 0,05$.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Per 14 mėnesių laikotarpį (2017-03 – 2018-05), remiantis EUCAST nurodytomis ESV, tyrimui atlikti buvo surinkta 84 *Enterobacteriaceae* šeimos izoliatai, kuriems nustatytas atsparumas arba sumažėjęs jautrumas karbapenemų grupės antibiotikams. TL-PGR metodu nustatyta, ar šie 84 izoliatai turi *GES*, *KPC*, *NDM*, *VIM*, *OXA-48*, *IMP*, *GIM* karbapenemazes koduojančius genus ir *ACT*, *CMY-2*, *DHA* AmpC β-laktamazes koduojančius genus. *GES*, *ACT*, *CMY-2* ir *DHA* genai papildomai buvo ištirti dar 102 Enterobakterijų izoliatuose, surinktuose ankstesnių metų studentų. Šiuose 102 izoliatuose *NDM*, *VIM*, *OXA-48*, *IMP* ir *GIM* genų mūsų darbo metu netyrėme, nes 2017 metais jie buvo ištirti Šarūnės Vitkutės (Vitkutė, 2017). Toliau aptariant tiriamąją medžiagą laikoma, kad tyrimo imtį sudarė 186 Enterobakterijų izoliatai.

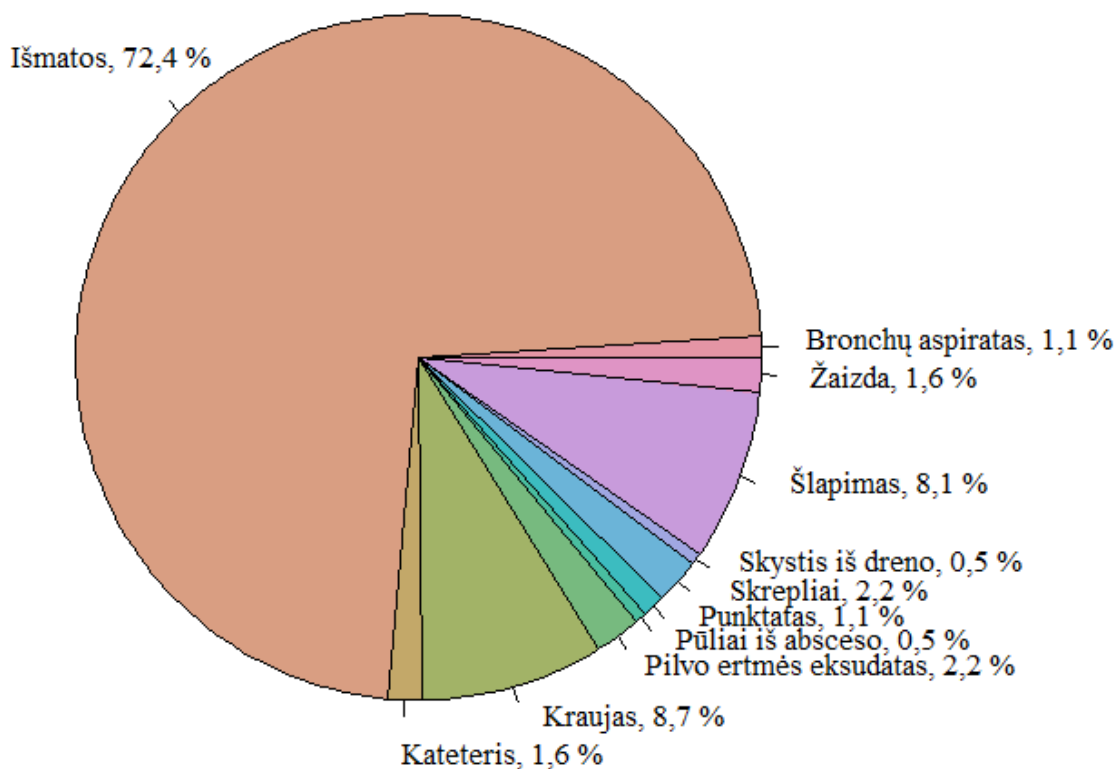
3.1 Tiriamosios medžiagos duomenų analizė

Atrinkus tyrimui tinkamus Enterobakterijų izoliatus, nustatyta, kad į tyrimą pateko dešimt skirtingų Enterobakterijų rūšių: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter kobei*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* ir *Morganella morganii*. Pati dažniausia bakterija buvo *Klebsiella pneumoniae* (n=158), po jos sekė *Escherichia coli* (n=7) ir *Enterobacter cloacae* (n=7), tuo tarpu likusių septynių Enterobakterijų rūšių į tyrimą pateko daug mažesnis kiekis – po vieną, du arba tris bakterijų izoliatus (10 pav.). Suskirsčius tiriamus izoliatus į dvi grupes (1 – nustatytas atsparumas ir 2 – nustatytas sumažėjęs jautrumas karbapenemams), abiejose grupėse *Klebsiella pneumoniae* buvo pati dažniausia bakterija. Tai patvirtina kitų tyrėjų duomenis, kad tarp Enterobakterijų, atsparios karbapenemams dažniausiai būna *Klebsiella pneumoniae*, tuo tarpu kitų rūšių bakterijoms atsparumas nustatomas retai (Siever *et al.*, 2013).



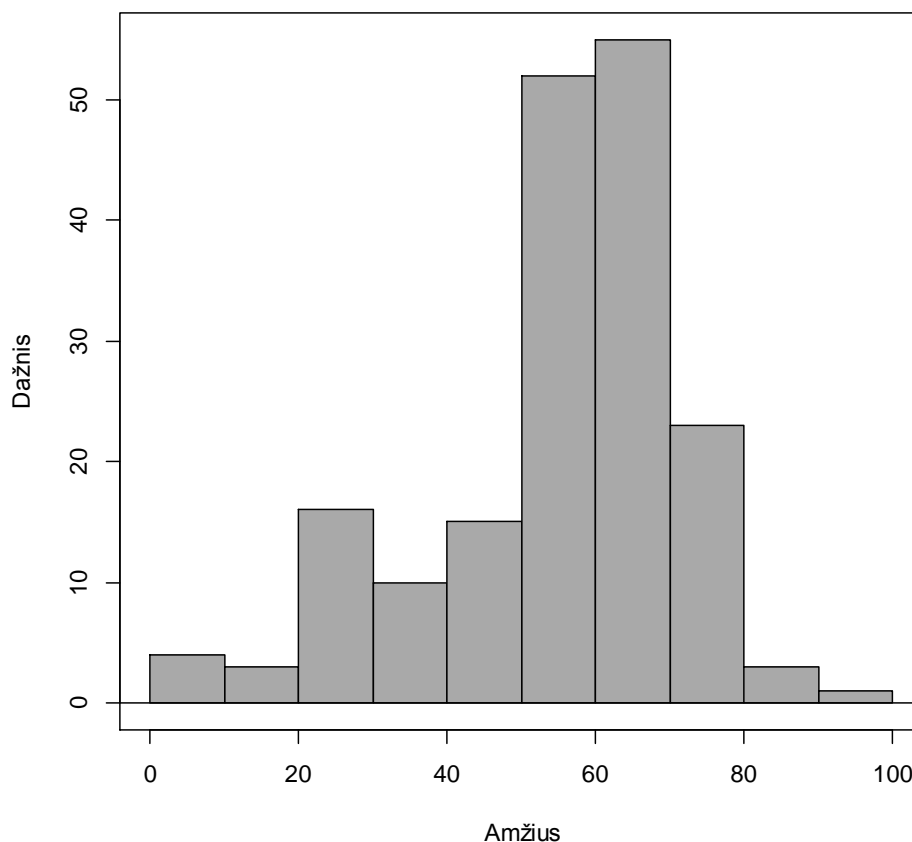
10 pav. Skritulinė diagrama, vaizduojanti tyrimui atrinktų Enterobakterijų pasiskirstymą pagal rūšis.

Didžioji dalis karbapenemams atsparių arba sumažėjusio jautrumo Enterobakterijų VUL SK buvo išskirta iš išmatų (n=134). Likę izoliatai buvo išskirti iš kraujo (n=16), šlapimo (n=15), po keturis izoliatų išskirta iš skreplių ir pilvo ertmės eksudato, po tris – iš žaizdos ir kateterio, po du – iš bronchų aspirato ir punktato ir po vieną izoliatą rasta pūliuose iš absceso ir skystyje iš dreno (11 pav.). Didžioji dalis izoliatų buvo išskirta iš išmatų, kadangi Enterobakterijos yra natūraliai žarnyną kolonizuojančios bakterijos. Tačiau pacientai, kurių žarnyną yra kolonizavusios karbapenemams atsparios Enterobakterijos, yra puikus tokių Enterobakterijų pernešimo šaltinis. Be to, pacientams su nusilpusia imunine sistema, kolonizavusios bakterijos gali sukelti endogeninę infekciją (McConville *et al.*, 2017), o mirštamumas nuo karbapenemams atsparių Enterobakterijų sukeltos infekcijos siekia net 40% (Tangden ir Giske, 2015). Be išmatų, daugiausiai Enterobakterijų išskirta iš kraujo ir šlapimo, tai reiškia, kad mūsų tiriamos karbapenemams atsparios arba sumažėjusio jautrumo Enterobakterijos VUL SK dažniausiai sukėlė kraujo ir šlapimo takų infekcijas.



11 pav. Skritulinė diagrama, vaizduojanti tyrimui atrinktų Enterobakterijų pasiskirstymą pagal tai, iš kokios tiriamosios medžiagos Enterobakterija buvo išskirta.

Didžioji dalis pacientų, kuriems buvo išskirtos mūsų tiriamos bakterijos, buvo vidutinio ir vyresnio amžiaus žmonės, daugiausia pacientų buvo tarp 50 ir 70 metų (12 pav.). Vidutinis amžius siekė 56 ± 17 metų, jauniausiam pacientui buvo 1 metai, o vyriausiam – 92 metai. Skirstant pacientus pagal lytį, iš moterų išskirtų Enterobakterijų buvo 79 (42,7%), iš vyrų – 106 (57,3%). Vieno paciento lytis buvo nežinoma. Vidutinis moterų amžius siekė $56,4 \pm 16$ metų, o vyrų – $55 \pm 17,8$. Statistiškai reikšmingo amžiaus skirtumo tarp vyrų ir moterų nenustatyta ($p=0.511$).



12 pav. Pacientų, kuriems buvo išskirtos tiriamosios bakterijos, amžiaus histograma.

Ėminiai, iš kurių buvo išskirtos tyrimui tinkamos Enterobakterijos, į VUL SK Mikrobiologijos laboratoriją buvo gauti iš 18 skirtingų VUL SK skyrių, taip pat iš Respublikinės Vilniaus psichiatrijos ligoninės ir Medicina praktika gydymo įstaigos (7 lentelė). Daugiausia ėminių gauta iš VUL SK Kaulų čiulpų transplantacijos (KČT) (įskaitant autologinės KČT poskyrį) (n=68), Bendrosios hematologijos (n=60), Nefrologijos ir inkstų transplantacijos (n=15) ir Reanimacijos ir intensyvios terapijos (n=15) skyrių. Iš kitų skyrių išskirtas mažesnis skaičius karbapenemams atsparių arba sumažėjusio jautrumo Enterobakterijų. Yra pastebėta, kad didesnę kolonizacijos ar infekcijos karbapenemams atspariomis Enterobakterijomis riziką turi sunkiomis ligomis sergantys ligoniai, pacientai po transplantacijų su dirbtinai slopinama imunine sistema (Mariappan *et al.*, 2017). Tai paaiškina faktą, kodėl mūsų tyrimo metu buvo stebimas didelis skaičius tiek karbapenemams atsparių, tiek su sumažėjusiu jautrumu Enterobakterijų izoliatų, išskirtų ligoniams, kurie buvo hospitalizuoti kaulų čiulpų ir inkstų transplantaciją atliekančiuose skyriuose. Be transplantacijų, yra ir kiti rizikos veiksniai, tokie kaip piktybinės ligos, ilga hospitalizacija, invazinės procedūros ir antibiotikų vartojimas (Perez *et al.*, 2014; Mariappan *et al.*, 2017). Mūsų atveju į tyrimą pateko didelis skaičius

ėminių iš Bendrosios hematologijos skyriaus, kur yra gydomos piktybinės ir gerybinės kraujo ligos. Kaip jau minėta, piktybinės ligos yra vienas iš rizikos faktorių, be to, kraujo ligų metu gali būti pažeista imuninė sistema, pacientas gali tapti imlesnis infekcijoms, kurios gydomos antibiotikais. O antibiotikų vartojimas yra dar vienas iš karbapenemams atsparių Enterobakterijų kolonizacijos ir infekcijos rizikos veiksnių. Abiejų išvardytų rizikos veiksnių buvimas galėtų paaiškinti, kodėl iš Bendrosios hematologijos skyriaus ligonių išskirtas toks didelis skaičius karbapenemams atsparių ir sumažėjusio jautrumo Enterobakterijų.

7 lentelė Tyrimui naudotų Enterobakterijų izoliatų pasiskirstymas pagal skyrius.

Gydymo įstaigos ir skyriai	Izoliatų skaičius (n; %)
VUL SK	
Anesteziologijos, reanimacijos ir operacinės skyrius	4; 2,2 %
Bendrosios hematologijos skyrius	60; 32,2 %
Bendrosios ir abdominalinės chirurgijos skyrius	2; 1,1 %
Hematologijos ir onkologijos skyrius	2; 1,1 %
Intensyvios kardiologijos, reanimacijos ir intensyvios terapijos skyrius	2; 1,1 %
Kaulų čiulpų transplantacijos (KČT) skyrius*	68; 36,5 %
Krūtinės chirurgijos ir onkologijos skyrius	1; 0,5 %
Nefrologijos ir inkstų transplantacijos skyrius	15; 8,2 %
Neurochirurgijos skyrius	1; 0,5 %
Onkoginekologijos skyrius	1; 0,5 %
I Pilvo chirurgijos skyrius	5; 2,7 %
I, II, III reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriai	15; 8,2 %
Stacionarinės reabilitacijos skyrius	1; 0,5 %
Širdies chirurgijos skyrius	1; 0,5 %
Urologijos skyrius	2; 1,1 %
Vaikų onkohematologijos skyrius	3; 1,6 %
Medicina praktika	2; 1,1 %
Respublikinė Vilniaus psichiatrijos ligoninė	1; 0,5 %
Viso:	186 izoliatai (100%)

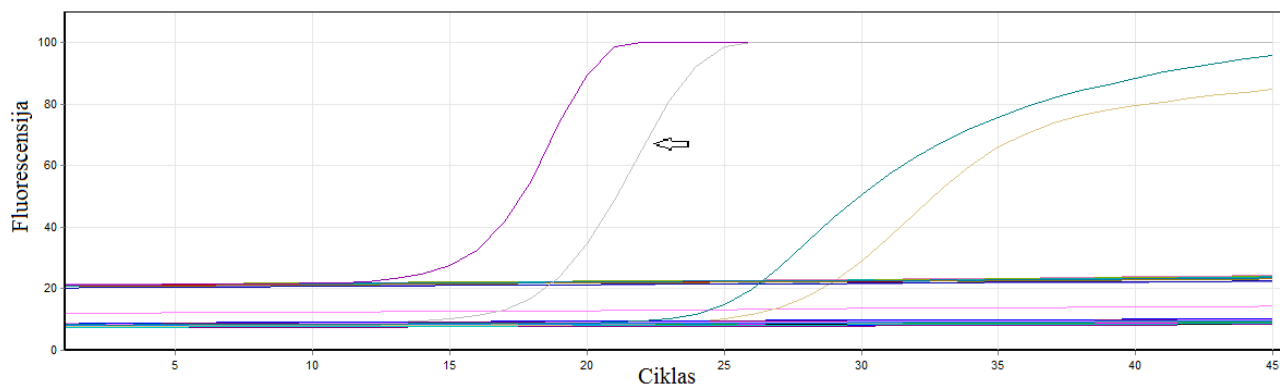
*Įskaitant autologinės KČT poskyrį.

3.2 Karbapenemazių genų tyrimas TL-PGR metodu

Aukščiau aptarti Enterobakterijų izoliatai buvo tiriami TL-PGR metodu. Pirmiausia buvo norima nustatyti, ar tiriamieji izoliatai koduoja pagrindines A klasės (*KPC*, *GES*), B klasės (*NDM*, *VIM*, *IMP*, *GIM*) ir D klasės (*OXA-48*) karbapenemazes. Kaip jau minėta, *KPC*, *NDM*, *VIM*, *IMP*, *GIM* ir *OXA-48* karbapenemazės iširtos 84 izoliatuose (nes 102- juose jau buvo iširti anksčiau (Vitkutė, 2017)), o *GES* karbapenemazė tirta 186 Enterobakterijų izoliatuose.

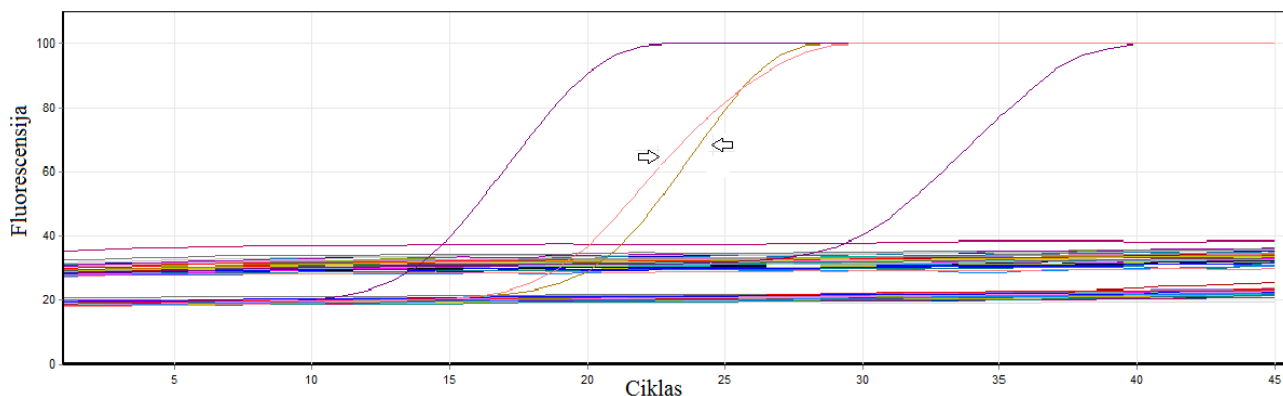
Atlikus TL-PGR nustatyta, kad iš 84 tirtų Enterobakterijų izoliatų tik 1 izoliatas turi *OXA-48* karbapenemazės geną, o likę 83 izoliatai nekoduoja nei vienos iš tirtų karbapenemazių (13

pav). OXA-48 karbapenemazę koduojantis izoliatas buvo *Klebsiella pneumoniae* bakterija. Izoliatas buvo išskirtas iš 72 metų vyro skreplių, kurie į VUL SK Mikrobiologijos laboratoriją buvo pristatyti iš Medicina praktika gydymo įstaigos. Iš skreplių išskirtai *Klebsiella pneumoniae* bakterijai diskų difuzijos metodu nustatytas atsparumas tiek imipenemui, tiek meropenemui.



13 pav. TL-PGR metu gautos amplifikacijos kreivės, iš kurių viena (pažymėta rodykle) vaizduoja *K. pneumoniae* izoliato OXA-48 geno amplifikaciją. Kitos trys kreivės vaizduoja teigiamas kontroles.

Papildomai ištyrus dar 102 izoliatų dėl GES karbapenemazės, rasti 2 GES karbapenemazę koduojantys Enterobakterijų izoliatai (14 pav.). Taigi GES paplitimas tarp 186 tirtų Enterobakterijų izoliatų sudaro 1 %. Pirmasis GES koduojantis izoliatas buvo *Serratia marcescens* bakterija, pastaroji išskirta iš 64 m. vyro kateterio. Tiriamoji medžiaga į VUL SK Mikrobiologijos laboratoriją buvo pristatyta iš I reanimacijos ir intensyvios terapijos skyriaus. Iš kateterio išskirta *Serratia marcescens* buvo atspari tiek imipenemui, tiek meropenemui. Antrasis GES koduojantis izoliatas buvo *Klebsiella pneumoniae*. Karbapenemazę gaminanti bakterija buvo išskirta iš 43 m. moters kraujo, kuris į laboratoriją pristatytas iš Anesteziologijos, reanimacijos ir operacinės skyriaus. Šiuo atveju, GES gaminanti bakterija nebuvo atspari karbapenemams, buvo tik sumažėjęs jautrumas antibiotikui. Meropenemo MSK buvo 0,38 mg/l. Šis pavyzdys patvirtina EUCAST nurodymus, teigiančius, kad ne tik karbapenemams atsparūs Enterobakterijų izoliatai turi būti tiriami dėl karbapenemazių genų. Enterobakterija, turinti net ir nežymiai sumažėjusį jautrumą karbapenemui, gali būti potenciali karbapenemazių gamintoja.



14 pav. TL-PGR metu gautos amplifikacijos kreivės, iš kurių dvi (pažymėta rodykle) vaizduoja *K. pneumoniae* ir *Serratia marcescens* izoliatų GES geno amplifikaciją. Kitos dvi kreivės vaizduoja teigiamas kontroles.

Praeitų metų Šarūnės Vitkutės tyrime ieškant *KPC*, *NDM*, *VIM*, *IMP*, *GIM* ir *OXA-48* genų VUL SK Mikrobiologijos laboratorijoje išskirtose Enterobakterijose, rasta, kad iš 102 Enterobakterijų izoliatų, 1 koduoja NDM karbapenemazę (Vitkutė, 2017). Sudėjus pastaruosius rezultatus su mūsų tyrimo metu gautais rezultatais, galime teigti, kad VUL SK Mikrobiologijos laboratorijoje tarp 186 Enterobakterijų izoliatų, kuriems nustatytas atsparumas ar sumažėjęs jautrumas karbapenemams, *OXA-48*, *NDM* ir *GES* karbapenemazių paplitimas siekia atitinkamai po 0,5 %, 0,5 % ir 1,1 %, tuo tarpu *KPC*, *VIM*, *IMP*, *GIM* karbapenemazių genai neaptikti, paplitimas lygus 0 %. Prieš kelis metus vykstant EuSCAPE tyrimui, Lietuvoje per vieną metų laikotarpį (2014–2015 m.) buvo identifikuoti 9 *Enterobacter cloacae* izoliatai gaminantys NDM karbapenemazę ir 2 *Klebsiella pneumoniae* izoliatai gaminantys *OXA-48* karbapenemazę (Albiger *et al.*, 2015). Tuo tarpu metais anksčiau vykusiam Baltijos šalių ir Rusijos tyrime, nenustatytas nei vienas karbapenemazes gaminančios *E. coli* ir *K. pneumoniae* atvejis Baltijos šalyse (Pavelkovich *et al.*, 2014). Abiejų tyrimų metu nebuvo tirti GES genai, todėl palyginti su mūsų gautais rezultatais negalime. Nepaisant to, remiantis mūsų ir anksčiau aptartų tyrimų duomenimis, galime sakyti, kad Lietuvoje karbapenemazės genai nėra paplitę ir karbapenemazių gamyba nėra pagrindinė Enterobakterijų atsparumo karbapenemams priežastis.

Lyginant mūsų tyrimo rezultatus, gautus apie karbapenemazių paplitimo situaciją VUL SK Mikrobiologijos laboratorijoje išskirtose Enterobakterijose, su kitų šalių duomenimis, galime rasti akivaizdžių skirtumų. Tiriant Enterobakterijas, kurios į tyrimą buvo įtrauktos taip pat pagal EUCAST nurodytas ESV, Ispanijoje karbapenemazes gamino net 54 % (Oteo *et al.*, 2015), Prancūzijoje – 22,9 % (Dortet *et al.*, 2014), Nigerijoje – 15,2 % (Oduyebo *et al.*, 2018) tirtų Enterobakterijų. Irane 23,2 % karbapenemams atsparių *Klebsiella pneumoniae* gamina GES karbapenemazę (Firoozek *et al.*, 2016). Iš duomenų matyti, kad kai kuriose šalyse karbapenemazių gamyba yra daug dažnesnė atsparumo karbapenemams priežastis. Tačiau tokiose šalyse kaip Estija, Latvija, Norvegija, Kipras,

Liuksemburgas, Makedonija ir Albanija, situacija yra panaši – karbapenemazės taip pat nėra plačiai paplitusios (Albiger *et al.*, 2015).

Įdomu, kad pacientai, kurių ėminiuose buvo nustatytos OXA-48 ir NDM karbapenemazės gaminančios Enterobakterijos, buvo atvykę iš užsienio. Pirmasis pacientas buvo atvykęs iš Baltarusijos, antrasis – iš Latvijos, abu atvykę į Lietuvą, dėl tam tikrų priežasčių kreipėsi į Medicina praktika gydymo įstaigą. Žinant šį faktą, galima sakyti, kad nors Lietuvoje, o tiksliau VUL SK, karbapenemazių genai ir nėra paplitę, tačiau žmonėms migruojant, karbapenemazės gaminančios bakterijos gali išplisti ir Lietuvoje. Šis tyrimas yra puikus pavyzdys, vaizduojantis vieną iš priežasčių, kodėl karbapenemazės gaminančios bakterijos yra išplitusios visame pasaulyje. Karbapenemazės gaminančios Enterobakterijos išplinta dėka tarptautinių kelionių ir užkrėsto šiais mikroorganizmais maisto gabenimo (Alotaibi *et al.*, 2017). Mūsų pavyzdys rodo, kad dėka tarptautinės migracijos, karbapenemazės gaminančios bakterijos patenka į sritis, kur iki šiol jos nebuvo aptiktos. Kadangi karbapenemazių genai gali lengvai plisti tarp bakterijų dėka plazmidžių ir transpozonų, pacientų, kurie yra kolonizuoti ar infekuoti karbapenemazės gaminančiomis bakterijomis, migracija suteikia puikias sąlygas karbapenemazių genams pasiekti jų neturinčias bakterijas.

3.3 AmpC β-laktamazių genų tyrimas TL-PGR metodu

Išsiaiškinus, kad didžioji dalis mūsų tiriamų karbapenemams atsparių arba sumažėjusio jautrumo Enterobakterijų nekoduoja karbapenemazių, nutarta ieškoti kitų fermentų, kurie galėtų sąlygoti atsparumą karbapenemams. Kaip jau minėta, tarp β-laktamazių yra ir kitų fermentų, kurie, manoma, galėtų prisidėti prie atsparumo karbapenemams. Tai yra C klasei priklausančios AmpC β-laktamazės. Yra pastebėta, kad *ACT*, *DHA* ir *CMY* AmpC β-laktamazių genai plinta tarp bakterijų plazmidėmis (Brandt *et al.*, 2017). Panaudojus pradmenis *ACT*, *DHA* ir *CMY-2* AmpC β-laktamazėms, TL-PGR metodu nustatyta, kad iš 186 tirtų Enterobakterijų izoliatų, 20 izoliatų koduoja *ACT*, 4 izoliatai – *CMY-2* ir 1 izoliatas – *DHA* AmpC β-laktamazę (8 lentelė). Taigi VUL SK išskirtose Enterobakterijose, kurios pasižymi atsparumu arba sumažėjusiu jautrumu karbapenemams, *ACT* geno paplitimas siekia 10,7 %, *CMY-2* geno – 2,1 % ir mažiausiai iš tiriamųjų genų yra paplitęs *DHA*, jo paplitimas siekia tik 0,5 %.

Žvelgiant į nustatytų AmpC genų pasiskirstymą tarp rūšių, matyti, kad 5 iš 158 tirtų *Klebsiella pneumoniae* izoliatų, 5 iš 7 *Escherichia coli* ir *Enterobacter cloacae* izoliatų, 1 iš 2 *Proteus mirabilis* izoliatų ir visi tirti *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter kobei*, *Morganella morgani*, *Citrobacter freundii* izoliatai gamina vieną iš AmpC cefalosporinazių. Tik *Serratia marcescens* rūšyje nesustatytas nei vienas genas iš tirtų AmpC genų grupės (8 lentelė). Nors

Klebsiella pneumoniae rūšis sudarė didžiąją dalį (85 %) tiriamų Enterobakterijų, tačiau tik 20 % (5 izoliatai) AmpC koduojančių izoliatų priklausė *Klebsiella pneumoniae* rūšiai. Fišerio tiksliuoju kriterijumi nustatyta, kad AmpC aptikimas tarp tirtų rūšių nėra vienodai dažnas ($p < 0,001$). AmpC genai rečiau aptinkami *Klebsiella pneumoniae* rūšyje ir dažniau *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter kobei*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii* rūšyse. Taip yra, nes *Klebsiella pneumoniae* bakterijoje AmpC aptinkami tik plazmidėje, tuo tarpu kitos bakterijų rūšys tam tikras AmpC koduoja ir chromosomoje (AmpC tik plazmidėje taip pat aptinkama *Proteus mirabilis* bakterijoje) (Hanson, 2003). Kaip jau buvo minėta, AmpC gali sukelti atsparumą karbapenemams tais atvejais, kai bakterija įgyja plazmidę su AmpC genais arba tada, kai padidėja chromosomoje esančių AmpC genų raiška (Majewski *et al.*, 2016). Taigi, tarp tiriamų Enterobakterijų, 5 *Klebsiella pneumoniae* izoliatai ir 1 *Proteus mirabilis* izoliatas karbapenemams atsparūs galėjo tapti dėl AmpC geno plazmidėje, o likusios rūšys – dėl chromosomoje koduojamų AmpC cefalosporinazių padidėjusios raiškos ir taip pat, galimai, dėl įgytos plazmidės su AmpC genu.

8 lentelė AmpC genų paplitimas tirtose Enterobakterijose.

Enterobacteriaceae rūšis	ACT	DHA	CMY-2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (158)	5	-	-
<i>Escherichia coli</i> (7)	2	-	3
<i>Enterobacter cloacae</i> (7)	5	-	-
<i>Enterobacter asburiae</i> (2)	2	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (3)	3	-	-
<i>Enterobacter kobei</i> (2)	2	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (2)	1	-	-
<i>Morganella morganii</i> (1)	-	1	-
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	-	-	1
<i>Serratia marcescens</i> (3)	-	-	-
Iš viso:	20	1	4

Kaip pavaizduota 9 lentelėje, analizuojant kitus kintamuosius, nustatyta, kad moteris reikšmingai dažniau nei vyrus ($p=0,0028$) kolonizuoja arba infekuoja AmpC gaminančios Enterobakterijos. Be to, AmpC gaminantys izoliatai reikšmingai rečiau nustatyti išmatose ($p=0,0458$), lyginant su kitomis tiriamosiomis medžiagomis (kraujas, šlapimas, skrepliai, kateteris, pilvo ertmės eksudatas, bronchų aspiratas, punktatas, pūliai iš absceso, skystis iš dreno). Iš to galėtume daryti prielaidą, kad karbapenemams atsparios arba mažiau jautrios ir AmpC gaminančios Enterobakterijos pacientams dažniau sukelia infekcijas nei kolonizuoja žarnyną. Tuo tarpu sąryšio

tarp paciento amžiaus, bakterijos jautrumo imipenemui, meropenemui ir AmpC genų buvimo tiriamose Enterobakterijose, nenustatyta.

9 lentelė Sąryšis tarp paciento amžiaus ir lyties, tiriamosios medžiagos, bakterijos jautrumo imipenemui, meropenemui ir AmpC cefalosporinazių genų buvimo tiriamose Enterobakterijose.

Kintamieji	AmpC gaminantys izoliatai	Ampc negaminantys izoliatai	Iš viso	<i>p</i> reikšmė
Pacientų amžius				0,3015
≤50 metų	8	40	48	
>50 metų	15	122	137	
Lytis				0,0028
Vyrai	7	99	106	
Moterys	17	62	79	
Tiriamoji medžiaga				0,0458
Išmatos	14	121	134	
Kita	11	40	52	
Jautrumas imipenemui				0,4506
Atsparu	8	54	62	
Mažai jautru	8	51	59	
Jautru	4	54	58	
Jautrumas meropenemui				0,9457
Atsparu	6	43	48	
Mažai jautru	12	72	84	
Jautru	6	39	45	

Kaip jau buvo minėta, AmpC fermentai gali prisidėti prie atsparumo karbapenemams dėka jų karbapenemazinio aktyvumo arba gebėjimo prisijungti prie karbapenemų ir sutrukdyti jiems pasiekti savo taikinį (Boxtel *et al.*, 2017; Jeon *et al.*, 2014). TL-PGR metu nustačius, kad 13,5 % tiriamų Enterobakterijų koduoja AmpC cefalosporinazes, galime daryti prielaidą, kad daliai tirtų Enterobakterijų atsparumas karbapenemams yra dėl AmpC genų produktų veiklos. Žiūrint į kitų tyrėjų, kurie taip pat nustatė, kad karbapenemazių gamyba tarp karbapenemams atsparių Enterobakterijų nėra išplitusi, rezultatus, matyti, kad AmpC cefalosporinazės yra laikomos viena iš atsparumo priežasčių. Korėjos mokslininkų tyrimai parodė, kad didžioji dalis karbapenemams atsparių *Enterobacter cloacae* izoliatų nekoduoja karbapenemazių genų, tačiau beveik visi koduoja AmpC cefalosporinazes ir turi sumažėjusią porinų raišką (Lee *et al.*, 2012). Todėl atsparumą karbapenemams sieja su AmpC cefalosporinazių gamyba esant kurtu sumažėjusiai porinų, per kuriuos karbapenemai patenka į bakteriją, raiškai. Piotr Majewski tyrimų grupė taip pat nustatė, kad *Enterobacter cloacae* atsparumas karbapenemams yra susijęs su pakitusia porinų raiška ir AmpC

cefalosporinazėmis. Šio tyrimo metu taip pat nustatyta, kad 97,7 % karbapenemams atsparių padermių AmpC raiška yra padidėjusi (Majewski *et al.*, 2016). Nors mūsų tyrimo metu nebuvo tirti porinai, tačiau buvo rasta nemaža dalis (13,5 %) AmpC koduojančių Enterobakterijų. Ateityje būtų įdomu patikrinti, ar šio tyrimo metu nustatytų AmpC koduojančių izoliatų AmpC genų raiška skiriasi nuo karbapenemams jautrių padermių. Taip pat būtų svarbu patikrinti kitus jautrumą karbapenemams įtakojančius veiksnius: porinus ir išmetamąsias pompas. Panašu, kad VUL SK išskirtoms Enterobakterijoms karbapenemazių ir AmpC cefalosporinazių gamyba nėra vienintelė atsparumo karbapenemams priežastis.

IŠVADOS

1. Tarp VUL SK išskirtų Enterobakterijų, karbapenemams atspari arba mažiau jautri dažniausiai yra *Klebsiella pneumoniae* (84,9 %) rūšis. Tiriamos Enterobakterijos dažniausiai išskiriamos 50-70 metų pacientams, vyraujanti tiriamoji medžiaga yra išmatos (72,4 %).
2. Karbapenemazių genai tarp karbapenemams atsparių arba sumažėjusio jautrumo Enterobakterijų nėra paplitę. GES paplitimas siekia 1 %, OXA-48 – 0,5 %, o GIM, VIM, NDM, IMP karbapenemazių – 0 %.
3. AmpC cefalosporinazių genai yra labiau paplitę nei karbapenemazių. ACT geno paplitimas siekia 10,7 %, CMY-2 ir DHA atitinkamai 2,1 % ir 0,5 %.

KARBAPENEMAMS ATSPARIŲ ENTEROBAKTERIJŲ FERMENTŲ GENŲ TYRIMAS TIKRALAIKĖS PGR METODU

Santrauka

Karbapenemai yra β -laktaminiai antibiotikai, plačiai naudojami kovojant su Enterobakterijų sukeltomis infekcijomis. Enterobakterijos yra gramneigiamos lazdelės, jos kolonizuoja žmogaus žarnyną ir yra dažna sukeltos infekcijos priežastis (Nordmann *et al.*, 2011). Yra pastebima, kad tuo toliau, tuo daugiau karbapenemams atsparių Enterobakterijų nustatoma (Li *et al.*, 2018). Atsparumo plitimas yra tapęs didele problema, nes mirštamumas nuo KAE sukeltos infekcijos siekia net 40 % (Tangden ir Giske, 2015). Viena iš atsparumo karbapenemams priežasčių yra karbapenemazių arba kitų β -laktamazių gamyba (Walsh, 2010).

Šio tyrimo tikslas buvo nustatyti, ar VUL SK Mikrobiologijos laboratorijoje išskirtos karbapenemams atsparios arba mažiau jautrios Enterobakterijos koduoja *KPC*, *NDM*, *VIM*, *OXA-48*, *IMP*, *GES* karbapenemazes ir *ACT*, *CMY-2* ir *DHA* AmpC β -laktamazes. Nustatymas atliktas TL-PGR metodu, kuris laikomas auksiniu standartu karbapenemazių ir AmpC β -laktamazių nustatymui (Smiljanic *et al.*, 2017; Helmy ir Wasfi, 2014). Atlikus tyrimą išsiaiškinta, kad tarp tiriamų Enterobakterijų VUL SK *GES* ir *OXA-48* karbapenemazių genų paplitimas siekia atitinkamai 1 % ir 0,5 %, o *GIM*, *VIM*, *NDM*, *IMP* karbapenemazių – 0 %. AmpC β -laktamazių genai yra labiau paplitę, *ACT* geno paplitimas siekia 10,7 %, *CMY-2* ir *DHA* atitinkamai 2,1 % ir 0,5 %. Iš gautų rezultatų matyti, kad VUL SK išskirtoms Enterobakterijoms karbapenemazių ir AmpC cefalosporinazių gamyba nėra vienintelė atsparumo karbapenemams priežastis.

DETECTION OF ENZYMES BY REAL-TIME PCR IN CARBAPENEM RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE

Summary

Carbapenems are β -lactam antibiotics commonly used for treatment of *Enterobacteriaceae* infections. *Enterobacteriaceae* (Gram-negative bacilli) are inhabitants of the intestinal flora and are the common human pathogens causing infections (Nordmann *et al.*, 2011). The prevalence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* is increasing (Li *et al.*, 2018). Infections caused by these bacteria have been associated with high mortality rates of approximately 40 % (Tangden ir Giske, 2015). One of the carbapenem resistance mechanisms is production of the carbapenemase or other β -lactamase (Walsh, 2010).

The purpose of this work was to determine if the carbapenem resistant or less sensible *Enterobacteria* extracted in the VUH SC Microbiology laboratory contain *KPC*, *NDM*, *VIM*, *OXA-48*, *IMP*, *GES* carbapenemase and *ACT*, *CMY-2*, *DHA* AmpC β -lactamase genes. For this purpose we used RT-PCR which are suggested as the gold standard technique for identification of carbapenemase or AmpC β -lactamase genes (Smiljanic *et al.*, 2017; Helmy ir Wasfi, 2014). According to the results, the prevalence of *GES* and *OXA-48* carbapenemase genes reaches 1 % and 0,5 %, whereas *GIM*, *VIM*, *NDM*, *IMP* carbapenemase genes haven't been detected. AmpC β -lactamase genes were more prevalent. The prevalence of *ACT*, *CMY-2* and *DHA* genes reaches 10,7 %, 2,1 % and 0,5 %. According to the results obtained, production of carbapenemases and AmpC β -lactamases isn't the only reason why *Enterobacteria* extracted in the VUH SC Microbiology laboratory have resistance to carbapenems.

Padėka

Esu dėkinga VUL SK Mikrobiologijos laboratorijai už suteiktą galimybę ir sąlygas atlikti magistro baigiamąjį darbą. Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovui dr. Maksim Bratčikov ir darbo konsultantei dr. Silvijai Kiverytei už pagalbą atliekant tyrimus ir rašant darbą, už kantrybę ir draugiškumą. Taip pat dėkoju visai laboratorijos komandai už draugišką priėmimą ir jaukią aplinką.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 1988;10(4):677-8.
2. Albiger B, Glasner C, Struelens M, Grundmann H, Monnet D. the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill* 2015;20(45):pii=30062.
3. Alotaibi FE, Bukhari EE, Al-Mohizea MM, Hafiz T, Essa EB, AlTokhais YI. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated from patients in a university hospital in Saudi Arabia. Epidemiology, clinical profiles and outcomes. *Journal of Infection and Public Health* 2017;10(5):667-73.
4. AlTamimi M, AlSalamah A, AlKhulaifi M, AlAjlan H. Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemases production by Enterobacteriaceae. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2017;24:155–61.
5. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289(1036):321–31.
6. Amudhan MS, Sekar U, Kamalanathan A, Balaraman S. blaIMP and blaVIM mediated carbapenem resistance in Pseudomonas and Acinetobacter species in India. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2012;6(11):757-62.
7. Antunes NT, Lamoureaux TL, Toth M, Stewart NK, Frase H, Vakulenko SB. Class D β -Lactamases: Are They All Carbapenemases? *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(4): 2119-25.
8. Asthana S, Mathur P, Tak V. Detection of Carbapenemase Production in Gram-negative Bacteria. *J Lab Physicians* 2014;6(2):69–75.
9. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:104565-7.
10. Barua T, Shariff M, Thukral SS. Detection and Characterization of AmpC B-Lactamases in Gram-Negative Bacteria. *BioMed Research International* 2014, straipsnio ID 249856, 12 psl.
11. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 2008;153:347–57.
12. Bonomo R, Szabo D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2006;43:S49-S56.
13. Boxtel R, Wattel AA, Arenasa J, Goessensb WHF, Tommassen J. Acquisition of Carbapenem Resistance by Plasmid-Encoded-AmpC-Expressing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(1);01413-16.
14. Boyd D, Taylor G, Fuller J, Bryce E, Ambree J, Gravel D *et al.*, Complete sequence of four multidrug resistant MOBQ1 plasmids harboring GES-5 isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* persisting in a hospital in Canada. *Microbial drug resistance* 2015;21(3).

15. Brandt C, Braun SD, Stein C, Slickers P, Ehricht R, Pletz MW, Makarewicz O. In silico serine β -lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. *Scientific Reports* 2017;7:straipsnio nr. 43232.
16. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211–33.
17. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, bla_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: 4654 – 61.
18. Cheruvanky A, Stoesser N, Sheppard AE, Crook DW, Hoffman PS, Weddle E *et al.* Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017;61(6):e00025-17.
19. Cuzon G, Bonnin RA, Nordmann P. First Identification of Novel NDM Carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *Plos one* 2013;8(4): e61322.
20. Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Singh B. Carbapenemases: A Review. *International Journal of Advanced Health Sciences* 2015;2(4):11-7.
21. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal* 2009;41(2):117-22.
22. Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B *et al.* Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2005;43:1198–204.
23. Dortet L, Cuzon G, Nordmann P. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2012. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:623-7.
24. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in
25. Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence* 2017;8(4):460–9.
26. Dupont H, Gaillot O, Goetgheluck AS, Plassart C, Emond JP, Lecuru M, *et al.* Molecular Characterization of Carbapenem-Nonsusceptible Enterobacterial Isolates Collected during a Prospective Interregional Survey in France and Susceptibility to the Novel Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam Combinations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016;60(1):215–21.
27. El-Hady SA, Adel LA. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among Enterobacteriaceae isolates from patients at Ain Shams University Hospital. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2015;16:239–44.
28. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Versija 2.0, 2017. http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/
29. Firoozeh F, Aghaseyed-Hosseini M, Zibaei M, Piroozmand A. Detection of bla KPC and bla GES Carbapenemase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hospitalized Patients in Kashan, Iran. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 2016;11(2):183-8.

30. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2012;50:477–9.
31. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrasević A, Canton R, Carmeli Y *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill* 2013;18(28):pii=20525.
32. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang T, Leclipteux T, Bogaerts P. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(5):1217-22.
33. Gommers J. The contribution of refugees to ESBL-E import in Europe. Narrative review 2017.
34. Gutierrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P *et al.* Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007;51(12):4329–35.
35. Hammoudi D, Moubareck CA, Karam Sarkis D. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods* 2014;107:106-18.
36. Hanson ND. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother* 2003;52(1):2-4.
37. Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsuhashi M. Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot* 1984;37(4):394-400.
38. Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:i1–i9.
39. Helmy MM, Wasfi R. Phenotypic and Molecular Characterization of Plasmid Mediated AmpC β -Lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus mirabilis* Isolated from Urinary Tract Infections in Egyptian Hospitals. *BioMed Research International* 2014; ID 171548: 8 psl.
40. Hoffnung LA, Burdelova E, Adler A. Evaluation of two commercial real-time PCR assays for detection of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Medical Microbiology* 2017;66: 1612-5.
41. Indian Clinical Isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Universal Journal of Microbiology Research* 2013;1(2):15-21.
42. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):161–82.
43. Jeon JH, Hong MK, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM *et al.* Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014;70:2924–36.
44. Kaase M. Zur aktuellen Situation bei Carbapenemase-bildenden gramnegativen Bakterien (current situation of carbapenemase producing Gram-negative). *Epidemiol Bull* 2013;19:167–71.
45. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology* 2017;17:101

46. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R *et al.* Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1584-90.
47. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2012;11:32.
48. Lee Y, Choi H, Yum JH, Kang G, Bae K, Jeong SH, Lee K. Molecular Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates from Korea and Clinical Outcome. *Ann Clin Lab Sci Summer* 2012;42(3):281-6.
49. Li Y, Sun Q, Shen Y, Zhang Y, Yang J, Shu L *et al.* Rapid increase in the prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and emergence of colistin resistance gene mcr-1 in CRE in a hospital in Henan, China. *JCM* 2018;56(3)
50. Lutgring JD, Limbago BM. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. *J Clin Microbiol* 2016;54(3):529-34.
51. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017;1-18.
52. Majewski P, Wieczorek P, Ojdana D, Sieńko A, Kowalczyk O, Sachaet P *et al.* Altered Outer Membrane Transcriptome Balance with AmpC Overexpression in Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae*. *Frontiers in Microbiology* 2016;7:2054.
53. Mariappan S, Sekar U, Kamalanathan A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* 2017;7(1):32-39.
54. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev* 2015;28(3):565-91.
55. Matsumura Y, Peirano G, Motyle MR, Adamsf MD, Cheng L, Kreiswirthg B *et al.* *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(4):02729-16.
56. McConville TH, Sullivan SB, Gomez-Simmonds A, Whittier S, Uhlemann AC. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae colonization (CRE) and subsequent risk of infection and 90-day mortality in critically ill patients, an observational study. *PLoS ONE* 2017;12(10):e0186195.
57. Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, Sofianou D, Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia* 2012;16:303-7.
58. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis* 2016;3(1):15-21.
59. Mohd Khari FI, Karunakaran R, Rosli R, Tee Tay S. Genotypic and Phenotypic Detection of AmpC β -lactamases in *Enterobacter* spp. Isolated from a Teaching Hospital in Malaysia. *PLoS ONE* 2016;11(3): e0150643.
60. Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 1990;56-65.
61. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013;13(9):785–96.

62. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7693–7.
63. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine* 2012;18(5):263-72.
64. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emer Infect Dis* 2011;17:1791-8.
65. Nordmann P, Poirel L. Rapid diagnostic tests for detecting emerging antibiotic resistance are mostly available and should be used now. *Infectious Diseases Hub* 2017 (<https://www.id-hub.com/2017/02/13/11199/>).
66. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:821–30.
67. Oduyebo OO, Falayi OM, Oshun P, Ettu AO. Phenotypic Determination of Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae Isolates from Clinical Specimens at a Tertiary Hospital in Lagos, Nigeria. *Niger Postgrad Med J* 2015;22:223-7.
68. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:71–8.
69. Oteo J, Miro E, Prez-Vazquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in future? *Enferm Infecc Microbiol clin* 2014;32(4):17-23.
70. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M *et al.* Prospective Multicenter Study of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae from 83 Hospitals in Spain Reveals High In Vitro Susceptibility to Colistin and Meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(6):3406-12.
71. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:893–903.
72. Park SO, Liu J, Furuya EY, Larson EL. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection in Three New York City Hospitals Trended Downwards From 2006 to 2014. *OFID* 2016. DOI: 10.1093/ofid/ofw222
73. Pavelkovich A, Balode A, Edquist P, Egorova S, Ivanova M, Kaftyreva L *et al.* Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in the Baltic Countries and St. Petersburg Area. *BioMed Research International* 2014; straisnio ID 548960: 7 psl.
74. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;59(10):5873-84.
75. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15–22.
76. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(1):24-38.
77. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of Efflux System, ampC, and oprD Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(5):1633–41.

78. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3):440–58.
79. Ribeiro VB, Falci DR, Rozales FP, Barth AL, Zavascki AP. Carbapenem-resistant GES-5 producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2014;18(2);231-2.
80. Salabi AE, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gramnegative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 2013;39:113-22.
81. Sanbongi Y, Ida T, Ishikawa M, Osaki Y, Kataoka H, Suzuki T *et al.* Complete Sequences of Six Penicillin-Binding Protein Genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* Clinical Isolates Collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(6):2244-50.
82. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A *et al.* National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013;34(1):1-14.
83. Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P, Ghebremedhin B. Comparison of in-house and commercial real time-PCR based carbapenemase gene detection methods in *Enterobacteriaceae* and non-fermenting gram-negative bacterial isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2017;16:48.
84. Subirats J, Royo E, Balcázar JL, Borrego CM. Real-time PCR assays for the detection and quantification of carbapenemase genes (*bla* KPC, *bla* NDM, and *bla* OXA-48) in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research* 2017;24(7):6710–4.
85. Tangden T ir Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of internal medicine* 2015;277:501–12.
86. Tmedweb.tulane.edu [internetinė svetainė]. Tulane university school of medicine; atnaujinta 2017-03-28; cituota 2017-06-15. Adresas: http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/betalactam_pharm
87. Turner PJ. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008,60,185-92.
88. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, Souza PRE, Carvalho AAT, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* 2009;40(1):1–11.
89. Vitkutė Š. Karbapenemazių genų tyrimas tikro laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu [magistrinis darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2017.
90. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306–25.
91. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases* 2011;11(5):355–62.
92. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:8-14.
93. Weib D, Engelmann I, Braun SD, Monecke S, Ehricht R. A multiplex real-time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes *bla*KPC, *bla*NDM, *bla*VIM and *bla*OXA-48. *Journal of Microbiological Methods* 2017;142:20-6.

94. Wendel AF, Brodner AH, Wydra S, Ressina S, Henrich B, Pfeffer K *et al.* Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas* spp. and Enterobacteriaceae during a long-term outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5162-5.
95. Wendel AF, MacKenzie CR. Characterization of a novel metallo-beta-lactamase variant, GIM-2, from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1824-5.
96. Williamson R, Collatz E, Gutmann L. Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance. *Presse Med* 1986;15(46):2282-9.
97. Yoneda K, Chikumi H, Murata T, Gotoh N, Yamamoto H, Fujiwara H *et al.* Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiology Letters* 2005;243:125-31.
98. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(12):5046-54.