



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Klinikinių *Acinetobacter baumannii* padermių atsparumo antibiotikams mechanizmų analizė

Baigiamasis magistro projektas

Pranas Vidutis

Projekto autorius

prof. dr. Astra Vitkauskienė

Vadovė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Klinikinių *Acinetobacter baumannii* padermių atsparumo antibiotikams mechanizmų analizė

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Pranas Vidutis
Projekto autorius

prof. dr. Astra Vitkauskienė
Vadovė

lekt. Asta Dambrauskienė
Recenzentė

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas

Farmacijos fakultetas

Pranas Vidutis

Klinikinių *Acinetobacter baumannii* padermių atsparumo antibiotikams mechanizmų analizė

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Prano Vidučio, baigiamasis projektas tema „Klinikinių *Acinetobacter baumannii* padermių atsparumo antibiotikams mechanizmų analizė“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Pranas Vidutis. Klinikinių *Acinetobacter baumannii* padermių atsparumo antibiotikams mechanizmų analizė. Baigiamasis magistro projektas / vadovė prof. dr. Astra Vitkauskienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *Acinetobacter baumannii*, β -laktamazės, atsparumas antibiotikams.

Kaunas, 2019. 48 p.

Santrauka

Acinetobacter baumannii yra vienas sėkmingiausiai prisitaikančių šiuolaikinių sveikatos priežiūros sistemų patogenų. Pastaraisiais metais didėjant invazinių procedūrų skaičiui ligoninėse, pacientams vis dažniau vartojant antibiotikus, *A. baumannii* ligoninėse tapo vienu pavojingiausių patogenų, dėl elastingo genomo, kuris leidžia išvystyti įvairius vidinius atsparumo antibiotikams mechanizmus. Infekcijos ir protrūkiai, kuriuos sukelia daugeliui antibiotikų atsparūs *A. baumannii* izoliatai, yra plačiai paplitę ir per pastaruosius dvidešimt ar daugiau metų apie juos pranešta visame pasaulyje. Siekiant veiksmingai išspręsti šią didėjančią problemą, labai svarbu identifikuoti tiriamas rūšis, jų klinikinius požymius, rizikos ir virulentiškumo veiksniai. Todėl detalus *A. baumannii* naudojamų atsparumo mechanizmų supratimas gali parodyti galimas kovos su antimikrobinio atsparumu sklaidos strategijas. Atsižvelgiant į dabartinius gydymo rezultatus, labai svarbu sukurti ir įvertinti naujų antibiotikų veiksmingumą ir suprasti kitų galimų alternatyvų vaidmenį gydant *A. baumannii* sukeltas infekcijas.

A. baumannii atsparumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymui bei mechanizmų tyrimui buvo pasirinkta penkiasdešimt nepasikartojančių šios bakterijos izoliatų imtis. Darbo metu analizuojami bakterijų mėginiai surinkti periodu nuo 2018 metų Vasario mėnesio iki 2018 metų Rugsėjo mėnesio, buvo gauti iš skirtingų Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų intensyvios terapijos skyrių. Atliktas jautrumo antibiotikams nustatymas diskų difuzijos metodu, pasirinktos medžiagos: Amikacinas, Ampicilinas – Sulbaktamas, Cefoperazonas – Sulbaktamas, Ciprofloksacinas, Meropenemas. Taip pat nustatyti bakterijų fermentiniai atsparumo antibiotikams mechanizmai, identifikuojant specifinius fermentus- β -laktamazės bei karbapenemazės. Gauti rezultatai palyginami tarpusavyje.

LSMU ligoninėje Kauno klinikose 2018 metais didžiausias *A. baumannii* infekcijų dažnis buvo nustatytas Centriniam intensyvios terapijos skyriuje, mažiausias – Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje. Tyrimo metu analizuotas *A. baumannii* atsparumas skirtingiems antibiotikams, nustatyta, jog visi izoliatai buvo atsparūs ciprofloksacinui ir meropenemui, mažiausias atsparumas nustatytas Ampicilinui- Sulbaktamui ir Cefoperazonui- Sulbaktamui. Lyginant bakterijų atsparumą antibiotikams atskiruose intensyvios terapijos skyriuose, nustatyta, kad Centriniam intensyvios terapijos skyriuje bakterijų atsparumas yra reikšmingai didesnis nei kituose skyriuose. Atlikus rezultatų analizę, pastebėta, jog asmenų virš 65 metų amžiaus infekcijos buvo atsparesnės visiems tirtiems antibiotikams, palyginus su jaunesniais asmenimis. Tyrimo metu identifikuotos *A. baumannii* sintetiniai atsparumo antibiotikams fermentai, nustatyta jog 25 izoliatai sintetina Amp-C β -laktamazės bei 2 izoliatai sintetina ir Amp-C, ir ESBL β -laktamazės. Taip nustatyta, jog visi tirti izoliatai sintetina A klasės karbapenemazės.

Pranas Vidutis. Analysis of Antimicrobial Resistance Mechanisms in *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains. Master's Final Degree Project / prof. dr. Astra Vitkauskienė; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, β -lactamase, antibiotic resistance.

Kaunas, 2019. 48 pages.

Summary

The most successful pathogen in nowadays health care system is *Acinetobacter baumannii* which can survive under critical environmental conditions. With an increase of invasive procedures in hospital and the rise of antibiotics intake *A. baumannii* became the most hazardous pathogen in hospitals during the last decades. The main reason why this pathogen can spread and proliferate is the genome flexibility which enables the improvement of inner mechanisms leading to antibiotics resistant cells development. During the last twenty years the infections caused by *A. baumannii* isolates, resistant to the most common antibiotics, have spread out and the records about these outbreaks can be found worldwide. To effectively solve this rising issue it is really important to identify not only pathogen species but also clinical features, risks and virulence factors related to the corresponding pathogen. Knowledge about resistance mechanisms of *A. baumannii* can reveal a strategy on how the spread of these pathogens can be stopped. The effectiveness of newly investigated antibiotics should be evaluated when applied to treat infections caused by *A. baumannii* following with the perception of alternate drugs application.

To investigate mechanisms of antimicrobial resistance fifty non-repetitive isolates of *A. baumannii* were selected. The samples of research pathogens were collected from Lithuanian University of Health Sciences Kaunas Clinics Intensive Care Unit during the period of February-September on 2018. Antibiotics resistance tests were performed by disk diffusion method with the active agents of amikacin, ampicillin-sulbactam, cefoperazone-sulbactam, ciprofloxacin, meropenem. Antibiotics resistance mechanisms by observing certain enzymes (β -lactamase and carbapenemase) were identified. The results were compared to each other.

The highest rate of infections caused by *A. baumannii* in LUHS Kaunas Clinics hospital was observed in the Central Intensive Care Unit, the lowest – In the Cardiac Intensive Care Unit. When investigating *A. baumannii* resistance to antibiotics, all samples were resistant to ciprofloxacin and meropenem. It was identified that *A. baumannii* has the lowest resistance rate to ampicillin-sulbactam and cefoperazone-sulbactam. When antibiotics resistance rates in different units of hospital were compared, the significantly higher resistance rate in the Central Intensive Care Unit was observed. The results have shown that infections of people over 65 years old were more resistant to all antibiotics applied when compared to younger people. During this research the enzymes responsible for *A. baumannii* antibiotics resistance were determined: 25 *A. baumannii* samples synthesize Amp-C β -lactamases and 2 samples - Amp-C along with ESBL β -lactamases. Hence, all *A. baumannii* samples synthesize class A carbapenemases.

Turinys

Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų ir terminų sąrašas	10
Įvadas.....	11
1. Literatūros apžvalga	12
1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i> charakteristikos	12
1.2. Bendros <i>Acinetobacter</i> rūšies savybės	12
1.3. <i>Acinetobacter</i> identifikavimas.....	13
1.4. Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms.....	15
1.5. Nefermentiniai atsparumo mechanizmai.....	16
1.5.1. Efliukso siurbliai.....	16
1.5.2. Porinų mažinimas	18
1.5.3. Tikslinių molekulių modifikavimas.....	18
1.6. Fermentiniai atsparumo mechanizmai.....	19
1.6.1. Beta laktamazės	19
1.6.2. Aminoglikozidus modifikuojantys fermentai	21
1.6.3. Atsparumas kolistinui	22
1.7. <i>A. baumannii</i> epidemiologija.....	22
1.8. Apibendrinimas	24
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	25
2.1. Mikroorganizmai	25
2.2. Reagentai	25
2.3. Prietaisai ir priemonės	25
2.4. Tirpalai ir mitybinės terpės.....	26
2.5. Tyrimo metodai	26
2.5.1. Mikrobiologiniai metodai	26
2.5.2. ESBL ir Amp-C β-laktamazių ekspresijos nustatymo metodas.....	27
2.5.3. Meropenemo diskų kombinacijų metodas	29
2.5.4. Jautrumo antibiotikams nustatymas diskų difuzijos metodu	31
2.6. Statistinė analizė	31
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	32
3.1. <i>A. baumannii</i> izoliatų pasiskirstymas pagal intensyvios terapijos skyrius.....	32
3.2. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes	32
3.3. <i>A. baumannii</i> izoliatų ESBL ir Amp-C β-laktamazių ekspresija	33
3.4. <i>A. baumannii</i> izoliatų tyrimas meropenemo diskų kombinacijų metodu.....	34
3.5. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose.....	35
3.6. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Centriniam intensyvios terapijos skyriuje	36
3.7. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyriuje	36
3.8. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje	37
3.9. Atsparumas tiriamiems antibiotikams pagal amžiaus grupes.....	38
3.10. Izoliatų jautrumas amikacinui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose.....	38
3.11. Izoliatų jautrumas Ampicilinui-Sulbaktamui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose.....	39

3.12. Izoliatų jautrumas Cefoperazonui-Sulbaktamui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose.....	40
3.13. Izoliatų jautrumas Ciprofloksacinui ir Meropenemui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose.....	40
3.14. Rezultatų aptarimas.....	41
Išvados	43
Literatūros sąrašas	44

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Tyrime naudotos medžiagos ir reagentai	25
2 lentelė. Tyrime naudoti prietaisai ir priemonės	25
3 lentelė. Jautrumas antibiotikams remiantis EUCAST standartu	31
4 lentelė. <i>A. baumannii</i> izoliatų ESBL ir Amp-C β -laktamazių ekspresija.....	34

Paveikslų sąrašas

1 pav. <i>Acinetobacter baumannii</i> kolonijos (9)	13
2 pav. <i>A. baumannii</i> vidinio atsparumo antibiotikams keliai	16
3 pav. β -laktamazės, aptiktos <i>A. baumannii</i> , suskirstytos pagal Ambler klasifikavimo sistemą (40)20	
4 pav. Invazinių <i>Acinetobacter</i> izoliatų, kurie yra atsparūs karbapenemams, procentinė dalis (%) pagal šalis, ES / EEE šalyse, A- 2016 metų duomenys ir B- 2014 metų duomenys (60).	24
5 pav. Izoliatų tyrimas naudojant diskus su skirtingų antibiotikų kombinacijomis	28
6 pav. Izoliatų tyrimas naudojant meropenemo diskus	30
7 pav. Meropenemo diskų metodo rezultatų interpretavimas.....	30
8 pav. Tiriamų <i>A. baumannii</i> izoliatų pasiskirstymas skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose	32
9 pav. Tiriamų <i>A. baumannii</i> izoliatų pasiskirstymas pagal sergančiųjų amžių.....	33
10 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų auginimas tiriant ESBL ir Amp-C β -laktamazių ekspresija.....	33
11 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų ESBL ir Amp-C β -laktamazių ekspresija skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose	34
12 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų auginimas tiriant karbapenemazių ekspresija.....	35
13 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams.....	35
14 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Centriniam intensyvios terapijos skyriuje	36
15 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Centriniam intensyvios terapijos skyriuje	37
16 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje	37
17 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų atsparumas tiriamiems antibiotikams pagal amžiaus grupes.....	38
18 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų atsparumas amikacinui Širdies chirurgijos (ŠITS), Neurologijos (NITS) ir Centriniam (CR) intensyvios terapijos skyriuje.....	39
19 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų atsparumas ampicilinui-sulbaktamui Širdies chirurgijos (ŠITS), Neurologijos (NITS) ir Centriniam (CR) intensyvios terapijos skyriuje.....	39
20 pav. <i>A. baumannii</i> izoliatų atsparumas cefoperazonui-sulbaktamui Širdies chirurgijos (ŠITS), Neurologijos (NITS) ir Centriniam (CR) intensyvios terapijos skyriuje.....	40

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

Amp-C – Ambler C klasės cefalosporinazės

CR – Centrinis intensyvios terapijos skyrius

ESBL išplėstinio spektro β -laktamazėmis

EUCAST – Europos antimikrobinio jautrumo nustatymo komitetas (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

KPC – *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė

MBL – B klasės metalo- β -laktamazė

NITS – Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyrius

ŠITS – Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyrius

Įvadas

Pirmieji atsparumo antimikrobinėms medžiagoms, naudojamoms infekcinėms ligoms gydyti, mechanizmai buvo žinomi, net prieš prasidedant antibiotikų įprastiniam klinikiniam vartojimui (1). Tačiau nepagrįstas ir per dažnas antimikrobinų medžiagų vartojimas padidino atsparumo problemą, praturtindamas atsparias bakterines populiacijas jautrių bakterijų sąskaita (2). Vis dažniau susiduriame su svarbiais žmogaus patogenais, kuriems būdingas atsparumas daugeliui antimikrobinų medžiagų, dėl šios priežasties moderni medicina, nuolatos privalo kovoti su iššūkiu gydyti infekcijas, kurioms veiksmingų vaistų nuolat mažėja. Šiuo metu, bakterijų atsparumo antimikrobinėms medžiagoms mechanizmų yra nustatyta daug ir įvairių. Dažniausiai stebimi yra šie: fermentinis antibiotikų skaldymas, antimikrobinų agentų tikslinių baltymų arba molekulių modifikavimas, sumažėjęs pralaidumas per ląstelės sienelę ir antibiotikų išsiurbimas iš ląstelės.

Acinetobacter baumannii yra labai įvairiapusė hospitalinė bakterija, kuri yra susijusi su daugeliu ligoninėse įvykstančių infekcijų tarp sunkiai sergančių ligonių ir pasižyminti dideliu mirtingumu. Šios infekcijos apima kvėpavimo takų pneumoniją, kraujotakos infekcijas, šlapimo takų infekcijas ir žaizdų infekcijas. Daugeliui antimikrobinų medžiagų ir ypač karbapenemui atsparių *Acinetobacter baumannii* izoliatų dažnis ligoninėse taip pat sparčiai didėja, tai verčia gydytojus ieškoti rečiau naudojamų, tačiau galimai veiksmingų antibiotikų, tokių kaip kolistinas. Šis patogenas pasižymi plačia įvairių vidinių atsparumo mechanizmų, virulentiškumą lemiančių veiksnių gama, taip pat jis turi elastingą genomą, kuris leidžia lengvai išvystyti atsparumą beveik visiems antimikrobinams vaistams. Natūralus *A. baumannii* atsparumas labai riboja gydymo galimybes, pastebimos tik kelios antimikrobinės medžiagos, kurios išlaiko gerą aktyvumą prieš šį patogeną. Nepaisant to, dideli šio organizmo gebėjimo prisitaikyti pajėgumai dažnai sukelia atsparumą ir dar labiau riboja galimą gydymo būdą. Nors ankstesniais dešimtmečiais buvo gaunami nerimą keliantys pranešimai, apie daugeliui antibiotikų atsparius *A. baumannii* izoliatų, šiandien galima rasti duomenų, kuriose yra išsamių pranešimų netgi apie visiems antimikrobinams vaistams atsparius izoliatų. Ypač nerimą kelia atsparumo karbapenemams dažnis, nes šie vaistai dažniausiai pasirenkami kritiškai sergantiems pacientams, užsikrėtusiems daugeliui antibiotikų atspariais organizmais.

Dėl šių *A. baumannii* savybių, būtina laiku ir tinkamai atlikti laboratorinius tyrimus, taip pat ruošti pranešimus susijusius su padidėjusiu sergamumu ir mirtingumu. Nes tik tokiu būdu bus užtikrintas efektyvus pacientų gydymas ir užkirstas kelias antimikrobinio atsparumo plitimui.

Darbo tikslas: Nustatyti *Acinetobacter baumannii* sukėlėjų atsparumą pasirinktiems antibiotikams, identifikuoti produkuojamus atsparumo antibiotikams fermentus 2018 metų laikotarpyje ir nustatyti jų sąsajas

Darbo uždaviniai:

1. nustatyti ir palyginti *A. baumannii* infekcijų dažnį skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose 2018 metų laikotarpyje
2. nustatyti ir palyginti *A. baumannii* sintetinių β -laktamazių bei karbapenemazių dažnį skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose 2018 metų laikotarpyje
3. nustatyti ir palyginti *A. baumannii* padermių atsparumo pasirinktiems antibiotikams dinamiką skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose tiriamuoju laikotarpiu laikotarpiu
4. atlikti *A. baumannii* padermių atsparumo pasirinktiems antibiotikams rezultatų palyginimą su atsparumo mechanizmais

1. Literatūros apžvalga

1.1. *Acinetobacter baumannii* charakteristikos

Acinetobacter yra gentis, kuri šiuo metu klasifikuojama *Moraxellaceae* šeimoje, kuri taip pat apima *Moraxella*, *Psychrobacter* gentis ir kitus susijusius organizmus. Ši šeima yra klasikinių *Gammaproteobacteria* klasės atstovė. Nepaisant to, *Acinetobacter* gentis iš esmės pasikeitė taksonominiais pokyčiais nuo tada, kai ji pirmą kartą buvo atrasta 1911 m. Tai iš esmės yra todėl, kad šios genties nariai gali prisitaikyti prie daugumos substratų naudodami skirtingus katabolinius kelius ir taip klaidindami biocheminių tyrimų interpretaciją (3).

Pirmąsias bakterijas, priklausančias šiai genčiai, 1911 m. nustatė olandų mikrobiologas Martinas Beijerinckas. Tirtasis izoliatas buvo gautas iš aplinkos mėginio ir tuo metu buvo vadinamas *Micrococcus calcoaceticus*. Nuo to laiko iki 1970-ųjų buvo apibūdintos kelios panašios rūšys ir gentys, kurios vėliau pasirodė esą *Acinetobacter* genties dalimi. Šios rūšys buvo apibendrintos Henrikseno 1973 m. jos apima *Achromobacter anitratus*, *Achromobacter mucosus*, *Alcaligenes hemolysans*, *Bacterium anitratum*, *Diplococcus mucosus*, ir kitas. Tarp šių bakterijų buvo rasta daugybė bendrų savybių, kol 1968 m. plačiai paplitusi jų grupė buvo pavadinta *Acinetobacter* po išsamių jų fenotipinių savybių tyrimų (4). Tai, savo ruožtu, leido oficialiai pripažinti šią gentį ir ją atskirti nuo *Achromobacter* genties. Vėliau ši gentis buvo įvardinta ir sisteminės bakteriologijos vadove, kuriame buvo tik viena aprašyta rūšis.

1986 m. atlikus DNR-DNR hibridizacijos tyrimus buvo aprašyta 12 skirtingų *Acinetobacter* genties atstovų, kurie turėjo daugiau kaip 70% DNR-DNR sutapimo. Šios rūšys buvo *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter junii* ir *Acinetobacter lwoffii* (5). Nepaisant to, ne visos atrastos rūšys tuo metu buvo pavadintos. Per vėlesnius 38 metus buvo nustatyta papildoma 31 genomo rūšis, iš kurių 17 buvo įvardytos. Likusi dalis buvo vadinama genomine rūšimi, po kurios nurodomas skaičius, kuris gali skirtis priklausomai nuo naudojamos nomenklatūros schemos (6).

2012 metais dėl identifikavimo metodų kiekio ir tikslumo, nustatytas genominių rūšių skaičius padidėjo iki 36, o iš viso 27 rūšims buvo suteiktas galiojantis pavadinimas (7). Šiuo metu vis dažniau atsiranda naujų rūšių, susijusių su *Acinetobacter*, iš viso yra identifikuoti 51 šios genties atstovai ir nurodyti galiojantys ar preliminarūs jų pavadinimai.

1.2. Bendros *Acinetobacter* rūšies savybės

Žodis *Acinetobacter* pirmą kartą pasiūlytas iš graikų kalbos žodžio „Akinetos“, kuris išvertus tiesiog reiškia „nemobilus“. Šis vardas buvo pasiūlytas siekiant atskirti nejudrias rūšis nuo judrių, priklausančių *Achromobacter* genčiai, ir sugrupuoti nejudrias rūšis priskiriant jas naujai rūšiai *Acinetobacter*. Tai buvo todėl, kad tiriant šios genties narius tradiciniais metodais, jie ilgą laiką buvo laikomi nemobiliais. Nepaisant to, naujesni tyrimai parodė, kad kai kurios *Acinetobacter* genties padermės gali rodyti paviršinį ar traukimo judrumą (8).

Acinetobacter gentis yra lengvai auginama ant įprastų standžių ir skystose auginimo terpėse. Auginant ant standžių agarų lėkštelių jos yra panašios į *Enterobacteriaceae*, auga lygiai pilkšvai baltomis kolonijomis, kurios kartais gali būti gleivinės ir kurių skersmuo yra nuo 1,5 iki 3 mm po

24 valandų inkubacijos (9). 1 paveiksle parodyta *Acinetobacter baumannii* kolonijų forma auginant ant kraujo agaro.



1 pav. *Acinetobacter baumannii* kolonijos (9)

Dauguma šios genties rūšių gerai auga temperatūroje nuo 25 °C iki 45 °C, o optimalus augimas pasiekiamas 37 °C temperatūroje. Biochemiškai dauguma *Acinetobacter* genties narių gali gaminti rūgštį iš gliukozės, galaktozės, manozės, ramnozės, laktozės ir ksilozės. Jos taip pat yra teigiamos Simono citrato testui, tačiau jos nesugeba gaminti rūgšties iš manitolio ir sacharozės. Be to, šios rūšys yra neigiamos indolui, nitratui, eskulino hidrolizei, H₂S gamybai ir Vogeso-Proskauerio testams (10). *Acinetobacter* taip pat nustatyta, kad ji gali pabloginti ksenobiotikų junginius, tokius kaip alkanai, herbicidai ir net kai kurie farmaciniai junginiai (8).

Acinetobacter genties nariai turi keletą bendrų savybių tarpusavyje. Nudažyti Gramo būdu, jie atrodo kaip gramneigiami kokai, kurie gali būti diploidiniai ar kintamo ilgio grandinės. Tačiau juos sunku išblukinti, todėl juos galima klaidingai nustatyti, kaip gramneigiamus ar gramteigiamus kokus. Šie organizmai taip pat yra griežtai aerobiniai, galintys augti minimalioje terpėje, kurių DNR citozino ir guanino kiekis svyruoja nuo 39 proc. iki 47 proc. (11).

1.3. *Acinetobacter* identifikavimas

Tyrimai parodė, kad labai sunku atskirti *Acinetobacter* genties narius vieną nuo kito, remiantis tik paprastais įprastiniais biocheminiais tyrimais. Nepaisant to, buvo sukurta daug tobulesnių metodų identifikuoti *Acinetobacter baumannii*, pagrindinį šios genties patogeną (9). Pirmasis Bouveto ir Grimonto (1986) pasiūlytas DNR-DNR hibridizavimo schemas metodas iki šiol išlieka galiojančiu identifikavimo metodu kelioms *Acinetobacter* rūšims nustatyti. Vėlesniais metais sukurta keletas papildomų metodų, kurie sėkmingai pritaikyta identifikuoti *Acinetobacter* rūšį. Toliau šiame skyriuje pateikiami pagrindiniai *Acinetobacter* rūšių nustatymo metodai naudojami laboratorijose.

Vienas iš tokių metodų yra amplifikuota ribosominės DNR sukarpymo analizė. Šis metodas pagrįstas bakterijos 16S ribosominės DNR padauginimu polimerazės grandinės reakcijos (PGR) metodu ir vėlesnis šių DNR fragmentų suskaidymas keturiais skirtingais fermentais, restrikcijos endonukleazėmis. Tuomet suskaidyta DNR yra elektroforezuojama agarozės geliuose, o modeliai, kurie gaunami paveikus DNR restrikcijos endonukleazėmis yra vizualizuojami ir lyginami su

anksčiau nustatytais modeliais, leidžiančiais identifikuoti rūšis (12). Šis bandymas pasiteisino nustatant keletą *Acinetobacter* rūšių, įskaitant *Acinetobacter baumannii*.

Panašus į anksčiau minėtą metodą, naudojamas identifikuoti *Acinetobacter* rūšis, yra PGR riboto fragmento ilgio polimorfizmas (PCR-RFLP). Šioje technikoje 16S ribosominės RNR genas amplifikuojamas PGR metodu ir po to karpomas *HaeIII* restrikcijos endonukleaze. Tada fragmentai įleidžiami į agarozės gelius, vizualizuojami ir lyginami su jau žinomais *Acinetobacter* izoliatais (13). Šiuo metodu sėkmingai aptinkami *Acinetobacter baumannii* izoliatai, netgi tie, kurių neįmanoma automatiškai nustatyti per auginimą kraujo kultūrose.

Amplifikuoto fragmento ilgio polimorfizmas (AFLP) yra dar viena naudinga *Acinetobacter* identifikavimo priemonė, kurios metu gaunami aukštos raiškos DNR atspaudai. Šiuo metodu visas bakterijų genomas suskaidomas dviem restrikcijos endonukleazėmis (*EcoRI* ir *MseI*), todėl daugybė fragmentų gali skirtis, priklausomai nuo vienetinių nukleotidų polimorfizmų kiekio ir vietų. Tada specifiniai adapteriai yra sumaišomi su fragmentais ir atsiranda selektyvus stiprinimas (remiantis vienu iš restrikcijos endonukleazių adapteriu). Tada amplifikuoti fragmentai yra žymimi ir elektroforezuojami agarozės gelyje, siekiant gauti DNR atspaudus ir identifikuoti rūšis (14).

Ribosomų nutatymo metodas, šiek tiek panašus į AFLP metodiką, taip pat sėkmingai naudojamas identifikuoti *Acinetobacter*. Šis metodas remiasi viso genomo sukarpymu naudojant restrikcijos endonukleazes. Tuomet fragmentai yra atskiriami elektroforeze, pernešami į *Southern Blot* ir hibridizuojami su radiomagnetizuotais ribosominiais operono zondais. Vizualizuotos juostos atitinka kiekvieno mėginio ribosominės RNR įvairovę ir sukuria unikalų modelį, atitinkantį konkrečią rūšį (15). Kitas būdas, naudojamas identifikuoti *Acinetobacter* yra 16S-23S ribosominės RNR tarpinės sekos ribinės analizės metodas. Ši technika yra labai panaši į ribosomų nustatymo, tačiau skirtumas yra tai, kad restrikcijos endonukleazė *EcoRI* kerpa 16S-23S ribosominės RNR intarpinės srities PGR produktais naudojant atitinkamus zondus (16).

Visi anksčiau apibūdinti metodai yra tikslūs, identifikuojant rūšies lygio *Acinetobacter* genties narius. Tačiau jie yra sudėtingi ir ilgai užtrunkantys. Nors šie metodai vis dar yra naudojami etaloninėse laboratorijose, tačiau netinka įprastoms diagnostikos laboratorijoms. Atsižvelgiant į technologijų pažangą ir susidomėjimą šios rūšies nariais, ypač patogenišku *Acinetobacter baumannii*, yra sukurta daugybė ne tokių sudėtingų metodų. Vienas iš tokių būdų yra 16S-23S ribosominės RNR geno intarpinės srities genetinė sekoskaita. Šis metodas remiasi tarpinių sričių amplifikavimu tarp minėtų genų ir jų vėlesne sekoskaita automatizuotomis priemonėmis. Atlikus nustatymą, gautos sekos yra palyginamos su žinomų duomenų bazių sekomis ir rūšimis (17). Šiuo metu plačiai naudojamas metodas yra 16S ribosominio DNR geno sekos nustatymas ir identifikavimas, pagrįstas palyginimu su paskelbtomis sekomis NCBI duomenų bazėje. Šis metodas tampa vis labiau naudojamas, nes NCBI duomenų bazėje yra daugiau galimų sekų. Aptariamasis metodas yra greitas, paprastas ir tiksliai nustato tiriamų bakterijų rūšis. Be to, neseniai validavus sekos nustatymo metodus ir naujos kartos sekvenavimą, visuotinio genomo sekvenavimas buvo pažymėtas kaip galutinė identifikavimo, epidemiologinė ir genomine tyrimo metodika (18). Tačiau šis metodas yra santykinai brangus, nes analizei reikalingos naujos kartos sekos nustatymo sistemos.

Kitas greitas būdas, galintis identifikuoti rūšis maždaug po 4 valandų, yra PGR–elektronų jonizacijos masės spektrometrija (PGR / ESI-MS). Šiuo metodu septyni genai yra amplifikuojami

PGR būdu, o vėliau atliekamas ESI-MS, siekiant nustatyti adeninų, timinų, guaninų ir cisteinų skaičių kiekviename mėginyje. Tai, atspindi kiekvienos rūšies tapatybę (19). Masės spektrofotometrija taip pat naudojama bakterijų izoliatams identifikuoti naudojant matricos padedamo lazerio desorbcijos-jonizacijos skrydžio laiko masės spektrometriją (MALDI-TOF MS). Pagal šią technologiją bakterijų izoliatai auginami skystose kultūrose ir koncentruojami centrifuguojant. Tada mėginiai tinkamai apdorojami ir dedami į masės spektrofotometrą. Gauti spektrai yra lyginami su standartinėmis spektrogramomis duomenų bazėse, kurias paprastai pateikia gamintojai, ir yra nustatomas izoliato tapatumas (20). Šios technologijos, nors ir yra greitos, tačiau joms yra reikalingas masių spektrofotometras, kurį turi tik nedaugelis laboratorijų.

1.4. Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

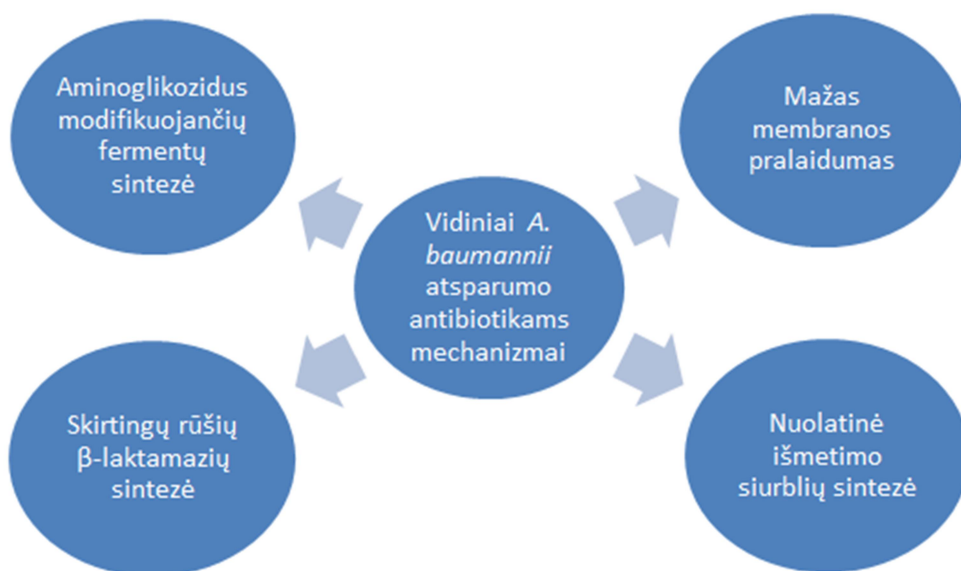
Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms yra reiškinys, kuris buvo nustatytas, kai tik šios molekulės buvo aptiktos prieš kelis dešimtmečius. Tačiau tyrimai rodo, kad šis reiškinys yra senovinis, kuris buvo gamtoje ilgai prieš antibiotikų atradimą. Šiuo metu sparčiai plintantis atsparių bakterijų atsiradimas visame pasaulyje, kelia pavojų antibiotikų, kurie pakeitė vaistus ir išgelbėjo milijonus gyvybių, veiksmingumui. Antimikrobinis atsparumas tapo viena iš svarbiausių 21-ojo amžiaus visuomenės sveikatos problemų, kuri kelia grėsmę vis didėjančiai infekcijų, kurias sukelia bakterijos, parazitai, virusai ir grybai, kurios nebėra jautrios bendriems vaistams, prevencijai ir gydymui. Antimikrobinis atsparumas tai problema, kuri ypač aktuali dėl vis didėjančio bakterijų atsparumo. Per kelis dešimtmečius, įvairiais laipsniais, bakterijos, sukeliančios įprastas ar sunkias infekcijas, išsivystė atsparumą kiekvienam naujam į rinką patekusiam antibiotikui. Atsižvelgiant į šią tikrovę, būtina imtis veiksmų siekiant išvengti besivystančios pasaulinės sveikatos priežiūros krizės. Dėl šios priežasties, vis dažniau stengiamasi nustatyti galimus bakterijų atsparumo mechanizmus siekiant suvaldyti vis didėjančią riziką.

Bakterijų atsparumo antimikrobinėms medžiagoms mechanizmų yra daug ir įvairių. Dažniausiai atsparumą antimikrobinėms medžiagoms sąlygoja antibiotikų fermentinis skaidymas, antimikrobinų medžiagų tikslo modifikacijos, sumažėjęs antibiotikų pralaidumas ir (arba) išstūmimas. Toliau skyriuje bus aptariami *A. baumannii* turimi atsparumo antibiotikams mechanizmai.

A. baumannii natūraliai turi atsparumo kelioms antimikrobinėms medžiagoms mechanizmus. Vienas iš tokių mechanizmų yra paremtas specifinio fermento Ambler C klasės cefalosporinazės (toliau– Amp-C) sinteze. Šis fermentas suteikia *A. baumannii* atsparumą daugeliui plataus spektro cefalosporinų. Be to, įterptos genetinės sekos *ISAbal* buvimas DNR grandinėje prieš šį geną, nulemia stiprų geno promotorių ir dėl to yra stebima papildoma fermento ekspresija, bei sukuriamas atsparumas ceftazidimui ir cefepimui (21). Be to, buvo nustatyta, kad kai kurie aleliniai šio fermento variantai sąlygoja platesnio spektro atsparumą prieš cefalosporinus, nei kiti, net ir nepastebint pernelyg didelės ekspresijos. *A. baumannii* taip pat natūraliai turi Ambler klasės D oksacilinazę, kuri yra *blaOXA-51* tipo. Šis fermentas paprastai nesuteikia bakterijoms atsparumo plataus spektro antibiotikams, nebent jis yra per daug išreiškiamas dėl šalia DNR grandinėje esančio *ISAbal* promotoriaus (22).

Taip pat, prie atsparumo antimikrobinėms medžiagoms prisideda ir tai, jog *A. baumannii* ląstelių membrana yra žymiai mažiau pralaidi antimikrobinėms medžiagoms, palyginti su kitomis gram-neigiamomis bakterijomis. Tai daugiausia yra dėl to, kad šių bakterijų išorinė membrana turi mažai

porų, kurios tuo pačiu metu yra nedidelės, ko pasėkoje ląstelės išorėje esančios medžiagos sunkiai patenka į vidų. Galiausiai *A. baumannii* nuolatos ekspresuoja įvairius membraninius išmetimo siurblius baziniu lygmeniu, kurie lemia vidinį atsparumą kelioms antimikrobinėms medžiagoms. Pagrindinis išmetimo siurblys, identifiukuotas *A. baumannii*, kuris prisideda prie jo įgimto atsparumo, yra *adeIJK* siurblys (23). Šio organizmo išstūmimo siurblių buvimas ir reguliavimas aptiriamas kitame skyriuje. Visi šie veiksniai prisideda prie *A. baumannii* vidinio atsparumo daugeliui antimikrobinėms medžiagoms ir yra pavaizduoti 2 paveiksle.



2 pav. *A. baumannii* vidinio atsparumo antibiotikams keliai

A. baumannii atsparumas antimikrobinėms medžiagoms taip pat gali būti įgyjamas keliais būdais. Endogeninių genų mutacijos gali sukelti tam tikrų ląstelės funkcijų perteklinę išraišką, pavyzdžiui, išmetimo sistemų arba atvirkščiai, atitinkamų subjektų sumažintą išraišką, pavyzdžiui, išorinės membranos porinus (24). Be to, atskiros mutacijos gali sukelti antimikrobinio agento tikslinės molekulės pasikeitimą, todėl atitinkamas antibiotikas tampa neveiksmingas. Galiausiai ir svarbiausia atsparumo įgijimo priežastis yra, judrieji genetiniai elementai, tokie kaip plazmidės ir transpozonai. Horizontalus genetinės informacijos perdavimas sukelia papildomą atsparumo antibiotikams įgijimą ir platinimą. Be to, šie mobilieji genetiniai elementai gali būti nesunkiai įtraukti į *A. baumannii* genomą ir formuoti atsparumo saleles, kuriose gali būti iki 45 atsparumo antibiotikams genų (2). Dėl *A. baumannii* genomo plastiškumo šis organizmas gali įgyti atsparumą beveik visoms žinomoms antimikrobinėms medžiagoms skirtingais būdais, kurie bus aptarti toliau.

1.5. Nefermentiniai atsparumo mechanizmai

Dažniausiai pasitaikantis *A. baumannii* atsparumo mechanizmas yra fermentinis antimikrobinėms medžiagoms skaidymas, tačiau egzistuoja keletas nefermentinių mechanizmų. Tai apima membraninių išmetimo siurblių perteklinę išraišką kartu su porų mažinimu ir antibiotikų tikslo modifikacijomis. Toliau skyriuje aprašomi pagrindiniai nefermentiniai *A. baumannii* atsparumo mechanizmai.

1.5.1. Eflukso siurbliai

Eflukso arba išmetimo siurblių sistema yra įprasto bakterijų metabolizmo dalis, kuomet jie siurbia toksišką medžiagą iš ląstelės ir apsaugo ją nuo įvairių pavojingų junginių. Šiuo metu išskiriamos

penkios eflukso siurblių šeimos, kurios susijusios su atsparumu vaistams. Tai yra ATP prisirišimo kasečių (ABC) transporteriai, daugelio vaistų ir toksiškų junginių ekstruzijos (MATE) siurbliai, atsparumo- ląstelių dauginimosi (RND) siurbliai, pagrindinių pagalbinių siurblių šeima ir mažos daugiapakopės rezistencijos šeimos (24). Šios išmetimo siurblių šeimos yra laikomos svarbiausiomis, nes jos kerta vidines ir išorines ląstelės membranas ir gali išsiurbti daugelį pavojingų ląstelei medžiagų. ABC transporteriai naudoja ATP energiją norėdami pašalinti nepageidaujamas molekules, o kiti siurblių tipai yra protoniniai ir jie naudoja protonų varomąją jėgą, kaip šaltinį molekulėms pašalinti (25).

Išmetimo siurblių perteklinė raiška yra susijusi su kelių antimikrobinių vaistų išplovimu, tokių kaip, antiseptikų, biocidų ir dažiklių (24). Įgytas atsparumas makrolidams, tetraciklinams ir chinolonams, taip pat susijęs su pertekline išstūmimo siurblių raiška. Nors visų šeimų išmetimo siurbliai paskatina tam tikrus atsparumo antibiotikams laipsnius, dažniausiai tarp *A. baumannii* izoliatų randami, yra RND šeimai priklausantys siurbliai. Šie specifiniai baltymai yra griežtai reguliuojami, o jų transkripcijos reguliatorių mutacijos lemia jų perteklinę raišką. RND išmetimo siurbliai yra sudaryti iš daugybės komponentų, kurie yra: vidinis membranos baltymas, kuris veikia kaip siurblys, su juo susijęs pagrindinis sulietas baltymas ir išorinis membranos faktorius, leidžiantis pašalinti substratus. Pirmasis, RND išstūmimo siurblių *A. baumannii* koduojantis operonas yra *AdeABC*. Pranešama, kad *AdeABC* paplitimas išmetimo siurblius koduojančioje DNR grandinėje tarp klinikinių *A. baumannii* izoliatų, priklausomai nuo regionų visame pasaulyje svyruoja nuo 53 % iki 97 %. Šio operono reguliavimas yra susijęs su atsparumu cefepimui, cefpiramui ir cefotaksimui– bei kitiems β -laktamams. Minėtoji išsiurbimo sistema taip pat yra susijusi su atsparumu aminoglikozidams, tetraciklinams, chloramfenikoliui ir trimetoprimui. Be to, šio siurblio reguliavimas tam tikru laipsniu yra susijęs su atsparumu karbapenemams. Galiausiai buvo nustatyta, kad *AdeABC* operoną turinčių siurblių pernelyg didelė ekspresija gali išstumti iš ląstelės ir tigecikliną – antibiotiką, kuris atsparus išstūmimui daugelyje kitų sistemų (26).

AdeIJK yra kitas RND šeimai priklausantis išstūmimo siurblys, kuris yra esminis *A. baumannii*. Jis veikia sinergiškai su *AdeABC* ekspresija ir yra susijęs su atsparumu šiems antibiotikams: penicilinams, cefalosporinams, monobaktams, tetraciklinams, tigeciklinui, fluorochinolonams, rifampinui, linkozamidams, novobiocinui (27). Be nuolatinio *AdeIJK* išmetimo siurblio buvimo ląstelėje, pernelyg didelė *AdeFGH* išstūmimo siurblio ekspresija taip pat yra susijusi su atsparumu antimikrobinėms medžiagoms (28). Tarp šių medžiagų yra chloramfenikolis, trimetoprimas, sulfametoksazolas, fluorochinolonai, klindamicinas, tigeciklinas ir tetraciklinai (24). Tačiau pernelyg didelė *AdeFGH* ekspresija nėra labai paplitusi, palyginti su kitais RND šeimai priklausančiais išmetimo siurbliais (29). Kitas išmetimo siurblys, susijęs su atsparumu fluorochinolonams, trimetoprimui ir chloramfenikoliui, yra *AbeM*, priklausantis MATE šeimai (30).

Neseniai atliktas tyrimas taip pat nustatė, kad cianid-3-chlorfenilhidrazonas, protonų varomosios jėgos inhibitorius, yra susijęs su padidėjusiu atsparumu kolistinui (31). Be to, *AbeS* išmetimo siurblys, taip pat gali išstumti iš ląstelės amonio pagrindu sukurtus antiseptikus, bei eritromiciną, chloramfenikolį, fluorochinolonus ir novobiociną. Šie išstūmimo siurbliai veikdami kartu suteikia šiai *A. baumannii* tam tikro efektyvumo atsparumą dezinfekcijai ir kelioms antimikrobinėms medžiagoms (8).

1.5.2. Porinų mažinimas

Kitas mechanizmas, kuris veikia sinergiškai su išsiurbimo siurblių reguliavimu, yra membraninių porų reguliavimas. Šis mechanizmas veikia sumažindamas bakterijos membranos pralaidumą, todėl antibiotikai negali iš naujo patekti į ląstelę po išmetimo ir tokiu būdu apsaugo nuo antimikrobinio poveikio. Porinai yra išoriniai membraniniai baltymai, kurie sudaro kanalus, per kuriuos keletas molekulių, įskaitant karbapenemus bei kitus antibiotikus, patenka į bakterinę ląstelę. *CarO* yra specifinis porinas, kuris identifiкуotas *A. baumannii*, šio baltymo mažas reguliavimas yra susijęs su atsparumu karbapenemui. Be to, *A. baumannii* buvo nustatyti kiti išoriniai membraniniai porinai, kurių poveikis yra susijęs su atsparumu karbapenemui. Tarp jų yra *OminF* ir *OprD* homologinės poros, kurios taip pat randamos *Pseudomonas aeruginosa* ir *OmpW*, esančios *Escherichia coli* ir *Pseudomonas aeruginosa* (32).

2000 m. Pradžioje JAV ir Ispanijoje buvo pranešta apie karbapenemui atsparių izoliatų, susijusių su išorinių membraninių baltymų mažinimu, protrūkius. Be to, buvo nustatyta, kad keli porinai, įskaitant *CarO*, veikia sinergiškai su karbapenemą hidrolizuojančiais fermentais, tokiu būdu suteikdami ląstelei atsparumą karbapenemui. Kitas tyrimas parodė, kad genų *CarO* ir *oprD* mutacijos, kartu su *RND* išmetimo siurblių pertekline ekspresija *A. baumannii* taip pat gali sukelti atsparumą karbapenemui (33). Atliekant šiam antibiotikui atsparių izoliatų protrūkių analizę nustatyta, kad visi šie izoliatai sumažino *CarO* ekspresiją, dėl šios priežasties galima teigti, jog šis genas taip prisideda prie atsparumo karbapenemui lygiagrečiai su kitais atsparumo mechanizmais. Tai rodo, kad sumažėjęs membranos pralaidumas gali veikti sinergiškai su kitais atsparumo mechanizmais ir prisideda prie *A. baumannii* atsparumo karbapenemui (34).

1.5.3. Tikslinių molekulių modifikavimas

Kitas nefermentinis atsparumo mechanizmas, nustatytas *A. baumannii*, yra antimikrobinų medžiagų tikslo modifikavimas. DNR girazės ir topoizomerazės IV genų taškinės mutacijos (atitinkamai *gyrA* ir *parC*) lemia fluorokvinolonų tikslo modifikavimą ir vėlesnį atsparumą šiems antibiotikams. Neseniai JAV atliktas tyrimas parodė, kad visi *A. baumannii* izoliatai, atsakingi už du atskirus protrūkius, buvo atsparūs fluorokvinolonams dėl įvykusių *gyrA* ir *parC* mutacijų. Dėl mutacijų pasireiškė tokie patys aminorūgščių pokyčiai, kaip pranešta ankstesniame tyrime. Atlikus 34 fluorochinolonui atsparių *A. baumannii* izoliatų tyrimą Kinijoje nustatyta, kad 48,7 proc. iš jų buvo taškinės *gyrA* DNR mutacijos, 21,6 proc. turėjo taškines *parC* mutacijas ir 5,4 proc. nustatytos mutacijos abiejuose genuose (35). Galiausiai tyrimas atliktas Švedijoje parodė, kad visi chinolonams atsparūs atsparūs *A. baumannii* izoliatai įgijo šį atsparumą, dėl įvykusių anksčiau minėtų mutacijų (36).

Atsparumas aminoglikozidams gali būti įgytas dėl ribozimo baltymų sumažinto pralaidumo, pernelyg didelės išmetimo siurblių ekspresijos ir aminorūgščių pasikeitimų. Tačiau stipriausia atsparumo šioms antimikrobinėms medžiagoms įgijimo forma yra 16S rRNR metilazių keitimas. Iš dešimties 16S rRNR metilazių, identifiкуotų gramneigiamuose organizmuose, *ArmA* ir *RmtB* yra labiausiai paplitę tarp *A. baumannii* (37). Šių fermentų koduojančių genų G ir C nukleotidų kiekio analizė parodė, kad jie nėra būdingi šiai rūšiai, bet buvo gauti per genų transformaciją iš kito organizmo ir įtraukti į genomą. Atrodo, kad *RmtB* metilazė nėra plačiai paplitusi, kai ji buvo nustatyta keliuose skirtinguose tyrimuose. Kita vertus, *ArmA* buvo nustatyta *A. baumannii*

izoliatuose iš viso pasaulio regionų. Apytiksliai 60% iš ištirtų klinikinių *A. baumannii* izoliatų buvo nustatyta, kad jie turi *ArmA* metilazę (37).

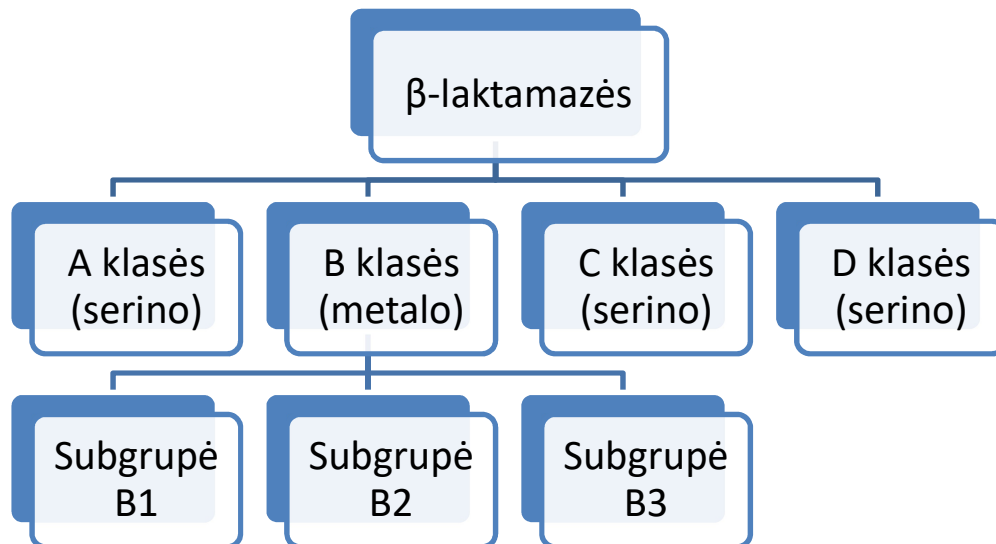
Kita antimikrobinių medžiagų tikslinių molekulių modifikavimo forma yra ribosominės apsaugos mechanizmas, kurią koduoja keli *tet* genai. Šiuo mechanizmu ribosomų apsaugos baltymai rišasi prie pačios ribosomos ir apsaugo ją nuo tetraciklinų veikimo, todėl atsiranda atsparumas šioms antimikrobinėms molekulėms. Šis mechanizmas yra labai plačiai paplitęs tarp *A. baumannii* izoliatų ir veikia sąveikoje su išmetimo siurbliais, siekiant padidinti atsparumą tetraciklinams (37). Tačiau antibiotikas tigeciklinas sugeba išvengti šio pašalinimo mechanizmo ir jį vartojant yra pasiekiamas geras efektyvumas prieš *tet* genus turinčias bakterijas. Nepaisant to, nustatyta, kad *trm* geno, kuris koduoja metiltransferazę, mutacijos sukelia padidėjusį atsparumą tetraciklinui per mechanizmą, kuris vis dar nėra gerai apibrėžtas. Taip pat nustatyta, kad *A. baumannii* peniciliną prisirišančių baltymų modifikacijos pasižymi didesniu atsparumu karbapenemams. Tyrimais parodyta, kad dėl peniciliną prisirišančių baltymų modifikacijų ir jų sumažėjusios išraiškos bei sąveikos su kitais atsparumo mechanizmais, sukuriama papildomas atsparumas karbapenemui. Tačiau duomenys apie šių modifikuotų *A. baumannii* baltymų paplitimą ir tikslius mechanizmus yra labai menki (38).

1.6. Fermentiniai atsparumo mechanizmai

Antimikrobinių medžiagų fermentinis skaidymas yra dar vienas mechanizmas, kuriuo bakterijos tampa atsparios antimikrobinėms medžiagoms. Patogeninės bakterijos sintetina daugiau kaip 900 fermentų, kurie skaido skirtingas antimikrobines medžiagas. Dėl *A. baumannii* genominės DNR plastiškumo nustatyta daugybė antibiotikus hidrolizuojančių fermentų. Kai kurie izoliatai yra įgiję pakankamai fermentinių ir nefermentinių mechanizmų, kad taptų atsparūs visoms žinomoms antimikrobinėms medžiagoms. Toliau skyriuje bus aptariami pagrindiniai fermentiniai atsparumo antibiotikams mechanizmai.

1.6.1. Beta laktamazės

Tarp daugybės fermentų, kurie hidrolizuoja antibiotikus, β -laktamazės, kurios hidrolizuoja β -laktamus ir β -laktaminio žiedo amidinės jungties hidrolazės, yra labiausiai paplitusios tarp gram-neigiamų bakterijų. β -laktamazės yra pagrindinė bakterijų atsparumo β -laktamo antibiotikams priežastis. Plačiausiai naudojama β -laktamazių klasifikacija yra Ambler klasifikacija, pagal kurią β -laktamazės skirstomos į keturias klases: A, B, C ir D, remiantis jų aminorūgščių sekomis. Klasifikacijos autorius iš pradžių išskyrė dvi fermentų klases: A klasė, aktyviosios serino β -laktamazės; ir B klasė, metalo- β -laktamazės, kurių aktyvumui reikalingas divalenčio metalo jonas, paprastai Zn^{2+} . Vėliau buvo nustatyta nauja serino β -laktamazių klasė, kurios amino rūgščių seka buvo mažai panaši į tuo metu žinomos A klasės fermentų. Šiai klasei priskirtas C pavadinimas, o du jos nariai taip pat žinomi kaip Amp-C β -laktamazės. Vėliau nustatyta dar viena serino β -laktamazių klasė, žinoma kaip OXA β -laktamazės, jos yra mažai panašios į A ar C klasės fermentus ir buvo priskirtos D klasei. Toliau pateikiamuose skyriuose plačiau aptariamas skirtingų β -laktamazių, ypač karbapenemazių, paplitimas tarp *A. baumannii* izoliatų (39). β -laktamazių klasifikavimas pagal Ambler yra apibendrintas 3 pav (40).



3 pav. β-laktamazės, aptiktos *A. baumannii*, suskirstytos pagal Ambler klasifikavimo sistemą (40)

Ambler A β -laktamazės

Ambler A klasės β-laktamazės yra fermentų grupė, hidrolizuojanti β-laktamus susidarant acilo fermentui ir savo aktyviajame centre turinti serino atomą. Daugelis šios klasės išplėstinio spektro β-laktamazių yra labai paplitę tarp *Enterobacteriaceae*, tačiau *A. baumannii* paprastai randama tik keletas tipų (37). A klasės β-laktamazė, kuri pirmą kartą buvo nustatyta *A. baumannii*, buvo *Pseudomonas* rūšiai priklausanti išplėstinio atsparumo β-laktamazė– PER-1. Šis fermentas bakterijoms suteikia atsparumą ceftazidimui ir turi nedidelį aktyvumą prieš karbapenemazes. Jis aptinkamas *A. baumannii* izoliatuose, kurie paplitę keliose pasaulio šalyse (37). Tyrimas apimantis 11 mokymo ligoninių Kinijoje parodė, kad per šešerius metus 77,8% iš 221 tirtų *A. baumannii* izoliatų turėjo PER-1 (41).

Kita dažnai pastebima A klasės β-laktamazė yra *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazė (KPC). Šis fermentas pasižymi ypatinga savybe, jis gali plisti tarp bakterijų per mobilius genetinius elementus ir pasižymi stipriomis atsparumo karbapenemams savybėmis (42). Nors šis fermentas paprastai pasireiškia tarp *Enterobacteriaceae* rūšies bakterijų, jo paplitimas tarp *A. baumannii* izoliatų nėra retas bei aptinkamas izoliatuose iš skirtingų pasaulio šalių.

Ambler B β-laktamazės

Ambler B klasės fermentai yra metalo-fermentai, kurie savo aktyviajame centre naudoja cinko joną, kad hidrolizuotų beta laktamo žiedą turinčius junginius. Šie fermentai vadinami „Metallo-Beta-Laktamazėmis“ (MBL), nustatyta jog šios grupės evoliucinė kilmė yra nepriklausoma nuo serino β-laktamazių protėvio. Taip pat šie fermentai tarpusavyje turi labai skirtingas amino rūgščių sekas, dėl šios priežasties jų klasifikacija išskiriama į mažesnes B1, B2 ir B3 grupes. Ambler B klasės β-laktamazės pasižymi labai efektyvia karbapenemų hidrolize ir nėra slopinamos klavulano rūgšties arba tazobaktamo (43). Nors šios β-laktamazės nėra labiausiai paplitusi atsparumo karbapenemui priežastis *A. baumannii*, skirtingose pasaulio vietose aptinkami izoliatai ekspresuojantys šios rūšies fermentus (37).

Ambler C β -laktamazės

Ambler C klasės fermentai yra β -laktamazės, turinčios platų aktyvumo spektrą prieš cefalosporinus. Jie hidrolizuoja β -laktamus panašiai kaip A klasės fermentai. Mokslininkai nenustatė jokių įgytų genų, leidžiančių *A. baumannii* gaminanti šio tipo fermentus, tačiau ši bakterija iš esmės gamina C klasės cefalosporinazę- Amp-C. Amp-C gamyba paprastai yra žemo bazinio lygio, ir todėl nedaug prisideda prie atsparumo plataus veikimo spektro cefalosporinams (44). Tačiau nustatyta, kad atitinkamų genetinių sekų įterpimas prieš Amp-C koduojančias DNR sekas padidina jų ekspresiją ir leidžia įgyti atsparumą plataus spektro cefalosporinams, bet ne karbapenemams. Be to, kai kurie Amp-C variantai, tokie kaip *ADC-33* ir *ADC-56*, turi platesnį aktyvumo spektrą prieš cefalosporinus. Nustatyta, kad jie efektyviau hidrolizuoja ceftazidimą ir cefepimą. Tačiau jų klinikinė reikšmė dar nenustatyta (37).

Ambler D β -laktamazės

Ambler D klasės fermentai yra labiausiai paplitusi *A. baumannii* atsparumo karbapenemams priežastis (38). Tai yra heterogeninė fermentų grupė, bendrai vadinama oksacilinazėmis. Jų veikimo mechanizmas yra panašus kaip A klasės ir C klasės fermentų, jos gali hidrolizuoti cefalotinę ir amoksiciliną, tačiau nėra inhibuojamos klavulano rūgšties (45). *A. baumannii* buvo identifikuoti keli oksacilinazių tipai, kurie suteikia bakterijoms atsparumą karbapenemams. Visos jos bendrai yra suskirstytos į šešias šeimas.

Yra žinoma, kad oksacilinazės dažnai veikia sinergiškai su kitais atsparumo mechanizmais, tokiais kaip sumažėjęs membranos pralaidumas arba padidėjusi išmetimo siurblių išraiška, kad būtų pasiektas didelis atsparumas karbapenemams (46). *A. baumannii* nuolatos ekspresuoja panašius į oksacilinazes fermentus, tačiau vien jų ekspresija nesukelia atsparumo karbapenemams, nebent ji yra pernelyg išreiškiamą naudojant specifines sekas prieš jo geną. Italijoje atliktame tyrime, kuriame dalyvavo 10 intensyvios terapijos skyrių nuo 2005 iki 2009 m., iš visų tirtų *A. baumannii* izoliatų, oksacilinazes koduojančių genų dažnis buvo 71,1% (47).

1.6.2. Aminoglikozidus modifikuojantys fermentai

Aminoglikozidus modifikuojantys fermentai sukelia atsparumą aminoglikozidams– antimikrobinėms medžiagoms, stabdančioms ląstelės baltymų sintezę, neleidžiant susiformuoti ribosoms. Aminoglikozidus modifikuojantys fermentai modifikuoja šių antimikrobinių molekulių amino arba hidroksilo grupes, dėl šios priežasties ryšys tarp aminoglikozidų ir ribosomų tampa silpnas ir to pasėkoje bakterijų izoliatai sugeba sintetinti baltymus ir išlikti gyvi, nepaisant antibiotikų buvimo ląstelėje. *A. baumannii* rasti aminoglikozidus modifikuojantys fermentai apima aminoglikozido acetiltransferazes (AAC), fosforiltransferazes (APH) ir adeniltransferazes (ANT) (48). Genai, koduojantys šiuos fermentus, dažniausiai yra įtraukti į DNR sekų mobiliuosius genetinius elementus ir egzistuoja kartu. Tyrimais nustatytas aminoglikozidus modifikuojančių fermentų dažnis tarp *A. baumannii* klinikinių izoliatų, santykinai nėra labai didelis. 97% amikacinui atsparių *A. baumannii* izoliatų, gautų iš 75 karinių ir civilių pacientų JAV medicinos centre, turėjo teigiamą APH geną- *aphA6*. Be to, ANT genai *aadA1* ir *aadB* bei AAC genai *aacC1* ir *aacC2* buvo aptikti atitinkamai 39%, 48%, 56% ir 5% šių izoliatų (49).

1.6.3. Atsparumas kolistinui

Plati karbapenemui atsparių *A. baumannii* izoliatų sklaida visame pasaulyje ir naujų antimikrobinių medžiagų vystymosi trūkumas privertė klinikų gydytojus vėl pradėti naudoti antibiotiką kolistiną, nepaisant jo nefrotoksinio poveikio. Kolistinas labai gerai veikė prieš daugeliui antibiotikų atsparius *A. baumannii* izoliatus, paskatindamas jį naudoti šių organizmų gydymui. Dėl padidėjusio kolistino, kaip karbapenemui atsparių izoliatų infekcijos terapijos, vartojimo, neišvengiamai pradėjo didėti atsparumas šiai antimikrobinei medžiagai. Be to, *A. baumannii* izolatų atsparumas kolistinui kartu padidino atsparumą gamtiniams katijoniniams antimikrobiniams junginiams (7). Pasipriešinimo kolistinui mechanizmai dar nėra visiškai supracasti, tačiau įrodyta, kad *A. baumannii* genome yra įvykę keletas skirtingų mutacijų, dėl kurių atsiranda atsparumas kolistinui. Bendras veiksnys tarp visų šių mutacijų yra išorinio membranos grynojo neigiamo krūvio sumažinimas, kuris trukdo kolistino ir bakterijų ląstelių sąveikai. Nustatyta, kad pirmuosiuose trijuose genuose, kurie dalyvauja lipidų A sintezėje, vyksta mutacijos, sukeliančios atsparumą kolistinui. Šie genai yra *lpxA*, *lpxC* ir *lpxD*, o jų mutacijų pasėkoje gali būti visiškai prarasta lipopolisacharidų produkcija ir nebelikti kolistino tikslinės molekulės.

Be to, transkriptomų analizė pagal didelio našumo RNR sekos nustatymo kolistinui jautrių ir kolistinui atsparių *A. baumannii* izoliatų parodė, kad atsparumo kolistinui atsiradime dalyvauja šeši genai. Šie genai yra susiję su lipopolisacharidų biosinteze ar elektrostatiniais pokyčiais bakterijų ląstelėse. Jie apima tris *pmrCAB* operono genus ir genus, koduojančius poli-β-1,6-N-acetilglukozamino deacetilazę, glikoziltransferazę ir membranos baltymą. Be to, šiame tyrime buvo nustatyta, kad visi kolistinui atsparūs izoliatai turi modifikuotą lipidų struktūrą, kurią sukelia fosfoetanolamino pridėjimas (50). Nepaisant to, dažniausiai pasireiškianti kolistino atsparumo priežastis *A. baumannii* yra daugybė mutacijų *pmrCAB* operone.

1.7. *A. baumannii* epidemiologija

Vis didėjantis bakterijų atsparumas antibiotikams leidžia daryti prielaidą, jog netrukus galime susidurti su „antibiotikų eros“ pabaiga. Žmogaus išradinimo vaisių- antibiotikų sėkmė, vis dažniau yra įvardijama kaip modernios medicinos problema, dėl didėjančio bakterijų atsparumo. Ši krizė gali būti apibūdinta kaip nepageidaujamas karas. Surinkta medicinos įstaigų statistika iliustruoja atsiradimą ir plitimą bakterijų, kurios yra atsparios visiems žinomiems antibiotikams (51). Šią tendenciją puikiai įkūnija *Acinetobacter* gentis ir dėl šios priežasties nusipelno papildomo dėmesio. *Acinetobacter* ypatinga tuo jog, sugeba išvystyti atsparumo mechanizmus visoms esamoms antibiotikų klasėms, taip pat turi gebėjimą greitai įgyti naujų atsparumo veiksnių (52). Didėjantis *Acinetobacter baumannii* kamienų atsparumas daugeliui vaistinių preparatų gydymo įstaigose yra bauginanti realybė (53). Šiame skyriuje apibendrinamas antibiotikams atsparaus *A. baumannii*, kaip hospitalinio patogeno atsiradimas pasaulyje ir dėmesys sutelkiamas į jo atsparumą tam tikriems antibiotikams. Baigiama santrauka apie dabartines strategijas, susijusias su daugeliui antibiotikų atsparių *A. baumannii* sukeltų infekcijų gydymu ir pateikiamos perspektyvos dėl šios pasaulinės visuomenės sveikatos grėsmės kontrolės.

A. baumannii yra randamas daugelyje sveikatos priežiūros įstaigų ir yra labai veiksmingas žmogaus patogenas ligoninėse. Jo atsparumo aplinkos veikiniams ir plataus spektro atsparumo determinantų derinys daro jį sėkmingu hospitaliniu patogenu. Tokiu būdu *A. baumannii* tampa daugelio pasaulinių infekcijų protrūkių (54) priežastimi, rodančia vis didėjantį pasipriešinimo greitį. Šiuo

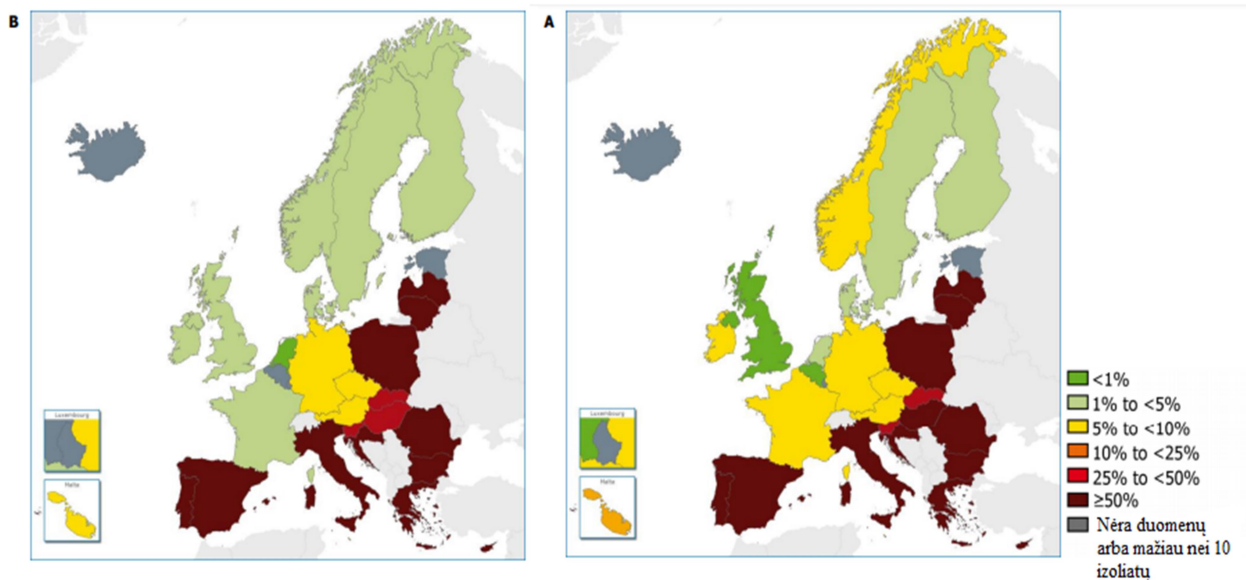
metu yra surinkta pranešimų iš ligoninių apie daugeliui antibiotikų atsparių *A. baumannii* izoliatų paplitimą Europoje, Šiaurės Amerikoje, Argentinoje, Brazilijoje, Kinijoje, Taivane, Honkonge, Japonijoje ir Korėjoje bei tolimesnėse vietovėse, tokiose kaip pietinėje Ramiojo vandenyno dalyje esantis Taitis (55). Šie *A. baumannii* izoliatai lengvai plinta ir sukelia ligos protrūkius visuose miestuose, šalyse ir žemynuose (55). Taip pat buvo įrodytas ir šios bakterijos daugeliui antibiotikų atsparių kamienų plitimas iš vietovių, kuriose atsparumas antimikrobinėms medžiagoms yra labai didelis, į regionus, kuriuose šis atsparumas yra palyginti mažas, pvz., Iš Ispanijos į Norvegiją (56).

Daugeliui antibiotikų atsparių *A. baumannii* infekcijos dažniausiai pasireiškia pacientams, sergantiems imunosupresija, sunkiomis lėtinėmis ligomis, ir tiems, kuriems taikomos invazinės procedūros ir kurie gydomi plačiu spektro antibiotikais (57). Tokiu būdu *A. baumannii* sukeltos infekcijos dažnai randamos intensyviosios terapijos skyriuose, kur jos yra susijusios su pneumonija, šlapimo takų infekcijų priežastimi. *A. baumannii*, nors ir rečiau, sukelia sudėtingas odos ir minkštųjų audinių, pilvo ir centrinės nervų sistemos infekcijas (2). Yra didelių prieštaravimų dėl to, ar šio organizmo sukeltos infekcijos sukelia nepalankias ilgalaikes pasekmes. Tačiau kai kurie gydytojai mano, kad *A. baumannii* gydymas ligoninėje yra asocijuojamas kaip sunkios ligos rodiklis, kurio mirtingumas yra maždaug 30 proc. (58).

Daugeliui antibiotikų atsparūs *Acinetobacter baumannii* izoliatai sparčiai plinta visame pasaulyje, nepriklausomai nuo jų protėvių ląstelių linijos. Neseniai atliktame pasauliniame tyrime, kuriame nagrinėjami 1235 *A. baumannii* izoliatai, gauti iš 2010–2014 m. pastebėta bauginanti tendencija. Iš šaltinių nustatyta, kad daugeliui antibiotikų atsparūs izoliatai sudaro net 43 proc. iš visų nagrinėtų. Be to, šis rodiklis padidėjo nuo 29 proc. 2011 m. iki 56 proc. 2014 m. Konkrečiau, atsparumas meropenemui per šiuos ketverius metus padidėjo nuo 41 iki 63 proc. Didžiausias pasipriešinimo lygis buvo nustatytas Lotynų Amerikoje (63 proc.) ir Artimuosiuose Rytuose (62 proc.), o mažiausias (33 proc.) - Šiaurės Amerikoje (59).

Atsižvelgiant į antibiotikams atsparių *A. baumannii* kamienų epidemijos potencialą, svarbu žinoti dabartinę šių bakterijų atsparumo antibiotikams paplitimą ir jų vystymosi tendencijas, nes tai yra labai svarbi informacija būsimam scenarijui įvertinti. Ankstesni atsparumo antibiotikams paplitimo tyrimai daugiausia apsiribojo tam tikra šalimi, tam tikru laikotarpiu, pasirinktais antibiotikais arba išsamios informacijos trūkumu ir nesistemine analize. Todėl siekiant įvertinti bendrąjį *A. baumannii* infekcijų atsparumo dažniausiai skiriamais antibiotikais paplitimą ligoninėse, svarbu atlikti išsamią turimų duomenų analizę.

Šiuo metu Europos sąjungos valstybės, aktyviai seka šios bakterijos atsparumo antibiotikams mastą. Kiekvienais metais renkami *A. baumannii* infekcijų duomenys iš įvairių gydymo įstaigų, kurie yra analizuojami, sisteminami ir pateikiami metinėse ataskaitose. 2015 m. 12 iš 27 ES / EEE šalių, pranešusių apie atsparumą 10 ar daugiau *Acinetobacter* izoliatų, karbapenemo atsparumas buvo 50 proc. arba didesnis. Tai rodo, kad šiose šalyse yra labai ribotos *Acinetobacter* infekuotų pacientų gydymo galimybės (60). Labiausiai dėmesys yra atkreipiamas į šios rūšies bakterijų plintantį atsparumą karbapenemui (pav. 4). Tačiau tuo pačiu metu yra susiduriama su papildomomis kliūtimis, antibiotikai išsivysčiusiuose šalyse yra gaunami tik receptiniais vaistais, o daugybė antibiotikų gali būti įsigijami be recepto besivystančiose šalyse. Todėl tik suvienodinus reikalavimus įsigyti ir apskaityti antibiotikų vartojimą, būtų galima atlikti išsamius pasaulinius tyrimus ir nustatyti tikrąją *A. baumannii* atsparumo plitimo priežastį ir sumažinti epidemijos tikimybę.



4 pav. Invazinių *Acinetobacter* izoliatų, kurie yra atsparūs karbapenemams, procentinė dalis (%) pagal šalis, ES / EEE šalyse, A- 2016 metų duomenys ir B- 2014 metų duomenys (60).

1.8. Apibendrinimas

Apibendrinant anksčiau nagrinėtas *A. baumannii* savybes galima teigti, jog didėjantis šių mikroorganizmų atsparumas antibiotikams yra svarbi šiuolaikinės medicinos problema, todėl privalu jai skirti atitinkamai dėmesio. Nuoseklūs bakterijų tyrimai atskleidžia vis daugiau informacijos apie šių organizmų gebėjimus prisitaikyti prie juos supančios aplinkos ir įgyti atsparumą antimikrobinėms medžiagoms.

Daugeliui antibiotikų atsparios *A. baumannii* infekcijos dažniausiai nustatomos pacientams, sergantiems sunkiomis ligomis, dažniausiai ligoninių intensyviosios terapijos skyriuose, ir beveik visuomet susiję su invazinėmis procedūromis. Tačiau šios bakterijos infekcijomis vis dažniau pranešamos ir pacientams, kurie yra hospitalizuoti įprastiniuose medicinos ir chirurgijos skyriuose. Dėl sudėtingo *A. baumannii* infekcijų gydymo ir didelio atsparumo, šios bakterijos paplitimas tampa endeminis.

Apžvalgoje nurodyti pagrindiniai atsparumo mechanizmai, pirmasis yra inicijuojamas, kuomet ląstelės DNR jau yra visa reikalinga informacija sukelti atsparumui. Antrasis kelias yra atsparumo įgijimas dėl aplinkos veiksnių, kuomet mutacijų ar transformacijos metu ląstelė įgyja prieš tai neturėtą baltymą ir dėl to atsiranda atsparumas atitinkamiems antibiotikams. Šiuo metu didelis dėmesys yra skiriamas antrajam atsparumo keliui tirti, siekiant išsiaiškinti tikslius atsparumo įgijimo kelius ir tokiu būdu užtikrinti efektyvią infekcijų prevenciją.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1. Mikroorganizmai

A. baumannii atsparumo antimikrobinėms medžiagoms mechanizmų tyrimui buvo pasirinkta penkiasdešimt nepasikartojančių šios bakterijos izoliatų imtis. Darbo metu analizuojami mėginiai surinkti periodu nuo 2018 metų Vasario mėnesio iki 2018 metų Rugsėjo mėnesio, buvo paimti iš skirtingų Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų intensyvios terapijos skyrių. Analizuojamu laikotarpiu, Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje (ŠITS) buvo nustatyti - 14 proc. (7 mėginiai), Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyriuje (NITS) – 20 proc. (10 mėginių), Centriniam intensyvios terapijos skyriuje (CITS) - 66 proc. (33 mėginiai), užsikrėtimai *A. baumannii*. Atsparumo antibiotikams mechanizmų nustatymui pasirinkti du metodai. Pirmasis, leidžiantis nustatyti bakterijas ekspresuojančias fermentus, skaidančius β -laktamo žiedą turinčius antibiotikus, tai išplėstinio spektro β -laktamazės (ESBL) bei Amp-C β -laktamazės. Antrasis metodas, tai kombinuotų meropenemo diskų bandymas, leidžiantis identifikuoti izoliatus, ekspresuojančius B klasės metalo-beta-laktamazės (MBL) ir A klasės karbapenemazės (KPC)

2.2. Reagentai

Darbe naudotų medžiagų ir reagentų sąrašas (žr. Lentelę 1). Medžiagos ir reagentai išvardinti pagal gamintojus.

1 lentelė. Tyrime naudotos medžiagos ir reagentai

Medžiagos ir reagentai	Gamintojas
ESBL ir Amp-C nustatymo rinkinys	Abtek Biologicals
Diskeliai su 10 μ g Meropenemo	APPLICHEM

Darbe naudotų aukščiau išvardintų rinkinių sudėtis:

ESBL AMPC nustatymo rinkinys:

- Diskelis su 30 μ g Cefotaksimo (toliau – CTX 30)
- Diskelis su 30 μ g Cefotaksimo ir 10 μ g Klavulanato (toliau – CXV 40)
- Diskelis su 30 μ g Cefotaksimo ir 200 μ g Kloksacilino (toliau – CTC 230)
- Diskelis su 30 μ g Cefotaksimo, 200 μ g Kloksacilino ir 10 μ g Klavulanato (toliau – CCC 240)

2.3. Prietaisai ir priemonės

Visų tyrimo metu naudotų prietaisų ir priemonių sąrašas pateikiamas 2 lentelėje. Prietaisai išvardinti pagal gamintojus.

2 lentelė. Tyrime naudoti prietaisai ir priemonės

Prietaisas	Modelis	Gamintojas
Šaldytuvas-šaldiklis	ARC 2353	Snaigė
Giluminis šaldytuvas	C-MAG HS7	Panasonic

Termostatas	B6	WTEbinder
Automatinės pipetės	2–20 µL,	Eppendorf
Densitometras	DEN-1 McFarland Densitometer	BIOSAN
Sūkurinis maišytuvas	Biovortex V1	BIOSAN

Kitos priemonės: sterilios plastikinės mikrobiologinės kilpelės, metalinės kilpelės, spiritinė lemputė, vienkartinės pirštinės, adata, švirkštas, 70 proc. ir 96 proc. etanolio tirpalas.

2.4. Tirpalai ir mitybinės terpės

Darbe naudotų tirpalų ir mitybinių terpių aprašymas:

- 0,1M EDTA tirpalas: Etilendiamintetraacto rūgštis, dejonizuotas vanduo.
- 0,16M fenilboro rūgštis tirpalas: fenilboro rūgštis, dejonizuotas vanduo.
- 0,9% NaCl tirpalas: NaCl, dejonizuotas vanduo
- Miulero-Hintono terpė: sudėtyje yra jautienos ekstrakto, kazeino rūgštis hidrolizato, krakmolo ir agarų. Jautienos ekstraktas ir kazeino rūgštis hidrolizatas suteikia bakterijų augimui reikalingų azoto, vitaminų, anglies, amino rūgščių, sieros ir kitų maistinių medžiagų. Krakmolas pridedamas, kad sugertų visus susidarančius toksiškus metabolitus. Krakmolo hidrolizės metu taip pat susidaro dekstrozę, kuri yra naudojama kaip energijos šaltinis. Būtina naudoti tinkamą terpę mikroorganizmų jautrumui sulfonamidams ir trimetoprimumi nustatyti. Antagonizmą su sulfonamido aktyvumu parodo para-aminobenzenkarboksirūgštis (PABA) ir jos analogai. Sumažintas trimetoprimumo aktyvumas, dėl kurio susidaro mažesnės slopinimo zonos ir vidinės kolonijos, yra įrodytas netinkamai paruoštoje Miulero-Hintono terpėje, kurioje yra didelis timidino kiekis. Tiek PABA, tiek timino/timidino kiekis Miulero-Hintono terpėje yra sumažintas iki minimumo, taip žymiai sumažinant sulfonamidų ir trimetoprimumo inaktyvumą, kai terpė naudojama bakterijų izoliatų jautrumui šiems antimikrobiniais vaistams išbandyti.
- Triptozės terpė: sudėtyje yra triptozės, dekstrozės, NaCl ir agarų. Ši terpė gali būti naudojama kaip bendrosios paskirties įvairiausių organizmų auginimui. Ji taip pat gali būti papildyta defibrinuotu krauju (avies, arklio), norint paruošti kraują turinčią terpę, skirtą išskirtiniams organizmams, pvz. *Brucella*. Dekstrozę yra naudojama, kaip energijos šaltinis. Triptozė tarnauja kaip azoto, vitaminų ir amino rūgščių šaltinis, o natrio chloridas teikia būtinus elektrolitus bei palaiko osmotinę pusiausvyrą.

2.5. Tyrimo metodai

2.5.1. Mikrobiologiniai metodai

A. baumannii pradinis atgaivinimas

A. baumannii izoliatai ilgalaikiam saugojimui yra laikomi giluminiame šaldytuve, kurio temperatūra siekia -80°C. Prieš prasidedant mėginių analizei, šiuo būdu saugomus izoliatų pirmiausia reikia atitinkamai parengti. Šiam tikslui naudojama papildoma inkubacija, auginant bakterijas ant standžios triptozės terpės, 30°C temperatūroje, stacionariomis sąlygomis, 24 valandas. Atgaivinimo metu izoliatai atgauna pradinį savo aktyvumą, rūšiai specifines savybes ir tampa tinkami

tolimesniems tyrimams. Taip pat dėl auginimo kietoje terpėje, susiformuoja individualios kolonijos ir atsiranda galimybė, esant būtinybei, ištirti kiekvieną iš jų.

A. *baumannii* antibiotikogramų ruošimas

Po pirminio auginimo *A.baumannii* izoliatai yra parengti tolesnei atsparumo antibiotikams mechanizmų analizei. Siekiant standartizuoti tyrimą, susiformavusios izoliatų kolonijos yra suspenduojamos 0,9% NaCl tirpale, paruošiama 0,5 McFarlando bakterijų suspensija. Paruošus mėginį, petri lėkštelės su Miulerio-Hintono standžia terpe yra inokuliuojamos steriliu vatos tamponu. Ant viršaus uždedami diskai su skirtingomis antibiotikų koncentracijomis. Lėkštelės inkubuojamos 30°C temperatūroje, stacionariomis sąlygomis 24val. Po inkubacijos, vykdoma antibiotikogramų analizė.

2.5.2. ESBL ir Amp-C β-laktamazių ekspresijos nustatymo metodas

Antibiotikams atsparios gramneigiamos bakterijos, ekspresuojančios išplėstinio spektro β-laktamazės, sukelia didelę terapinę problemą gydytojams dėl ribotų gydymo galimybių. Svarbios antimikrobinės medžiagos, kurioms pastebėtas vis didėjantis atsparumas, yra aminopenicilinų ir cefalosporinų grupės. Viena iš šio atsparumo antibiotikams priežasčių yra bakterijų ekspresuojami fermentai, vadinami išplėstinio spektro β-laktamazėmis (ESBL) bei Amp-C β-laktamazėmis (Amp-C). Norint produkuoti šiuos fermentus, bakterijoms reikalingas tam tikras atsparumo genas. Ši genetinė savybė gali būti perduodama iš vienos bakterijos kartos į kitą per ląstelių dalijimosi metu. Tačiau bakterijos gyvavimo metu jis taip pat gali būti perduodamas iš vienos bakterijos ląstelės į kitą užkrečiamų genų sekcijose, tokiose kaip plazmidės. Šios dvi ląstelės taip pat gali priklausyti skirtingoms bakterijų rūšims.

Dažnas ir netikslingas antibiotikų vartojimas skatina ESBL ir (arba) Amp-C gaminančių bakterijų plitimą, nes atsparumas antimikrobinėms medžiagoms reiškia pranašumą konkuruojant su kitomis bakterijų rūšimis.

Pastaraisiais metais atsiranda vis daugiau pranešimų apie ESBL ir (arba) Amp-C gaminančių bakterijų plitimą tarp gyvūnų ir žmonių. Klinikinis cefalosporino ir monobaktamo terapijos nepakankamumas dėl išplėstinio spektro β-laktamazių yra vis didesnė problema ligoninėse, nes bakterijos ekspresuojančios šiuos fermentus nėra atpažįstamos pagal šiuo metu taikomus izoliavimo ir jautrumo tyrimus. ESBL ekspresuojančios bakterijos dažnai turi tik labai nedaug padidėjusį atsparumą trečiosios kartos cefalosporinams ir monobaktamams, todėl jos gali būti jautrios šiems antibiotikams atliekant įprastinius įtariamumo tyrimus ir klaidinti tyrėjus. Dėl šių priežasčių imta ieškoti naujų atsparumo nustatymo metodų, kurie leistų greitai ir tiksliai identifikuoti ESBL ir (arba) Amp-C gaminančias bakterijas

Plazmidžių koduojamos β-laktamazės paprastai ekspresuojamos *Enterobacteriaceae*. Amp-C β-laktamazės paprastai išskiriama iš gramteigiamų bakterijų, atsparių išplėstinio spektro cefalosporinams.

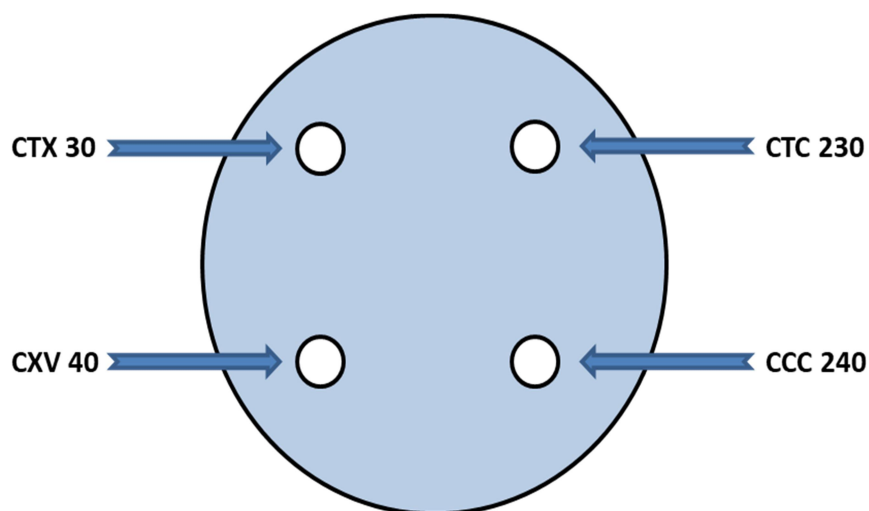
Atlikus tyrimus pastebėta, kad ESBL ekspresuojančių bakterijų augimą slopina klavulantas, o antibiotikų diskų, kuriuose yra klavulanato, slopinimo zonos yra didesnės, palyginti su vien tik cefalosporino turinčiais diskais. Amp-C β-laktamazę slopina kloksacilinas, o inhibicijos zonos su antibiotikų diskais, kurių sudėtyje yra šio antibiotiko, yra žymiai didesnės, lyginant su diskais be

kloksacilino. Nustatyta jog, klavulanatas sukelia Amp-C β -laktamazių sintezę, o inhibicijos zonos skirtumas vien tik su šio vaisto disku gali būti mažiau tikėtinas.

Pagal atlikus tyrimus sukurtas specifinis metodas, leidžiantis identifikuoti ESBL ir (arba) Amp-C ekspresuojančias bakterijas. Naudojant skirtingas antibiotikų kombinacijas galima tiksliai nustatyti tiriamųjų bakterijų sintetinamas β -laktamazes. Šio metodo eiga ir rezultatų analizė aprašoma žemiau (63).

Metodas vykdomas šia eiga:

- 1 žingsnis: Paruošiama 0,5 McFarlando drumstumo bakterijų suspensija (atitinkanti $1,5 \times 10^8$ kolonijas formuojančių vienetų KFV/ml). Pasirenkamos 3-5 gerai izoliuotos, tokio pat morfologinio tipo bakterijų kolonijos. Sterilia kilpele kultūros perkeliama į mėgintuvėlį su steriliu fiziologiniu tirpalu.
- 2 žingsnis: Miulerio-Hintono agarizuota terpė inokuliuojama steriliu vatos tamponu ir ant viršaus uždedami keturi diskai su skirtingų antibiotikų kombinacijomis (4pav.).
- 3 žingsnis: Vykdoma ląstelių inkubuojama 30°C temperatūroje 18-24 val.
- 4 žingsnis: Matuojamos susidariusios bakterijų augimo inhibicijos zonos, apvalinant iki milimetro



5 pav. Izoliatų tyrimas naudojant diskus su skirtingų antibiotikų kombinacijomis

Rezultatų interpretavimas:

Kombinuotų diskų ESBL ir Amp-C mechanizmų identifikavimo bandymo rezultatų aiškinimas yra pagrįstas palyginimu tarp susidarantių keturių skirtingų slopinimo zonų kombinacijų, kaip parodyta 5 paveiksle.

Jei nenustatytas nei vienas iš tiriamųjų atsparumo mechanizmų, disko CXV 40 inhibicijos zonos skersmuo bus iki 2mm didesnis nei CTX 30. Tik ESBL sintezės ląstelėse atveju, CXV 40 diskų, inhibicijos zonos ≥ 5 mm didesnės, palyginus su CTX 30 diskais. Tik Amp-C sintezė ląstelėse bus nustatoma esant vienai iš trijų kombinacijų- jei inhibicijos zonos prie CTC 230 diskų ≥ 5 mm didesnės nei prie CTX 30, arba jeigu inhibicijos zonos prie CCC 240 diskų ≥ 5 mm didesnės nei prie CXV 40, arba jei inhibicijos zonos prie CCC 240 diskų < 5 mm didesnės nei prie CTC 230. Jeigu tiriamasis izoliatas sintetina ir ESBL, ir Amp-C augimo inhibicijos zonos atitinka vieną iš šių variantų: inhibicijos zonos prie CXV 40 diskų < 5 mm didesnės nei prie CTX 30, arba inhibicijos

zonos prie CCC 240 diskų ≥ 5 mm didesnės nei prie CXV 40, arba jei inhibicijos zonos prie CCC 240 diskų ≥ 5 mm didesnės nei prie CTC 230.

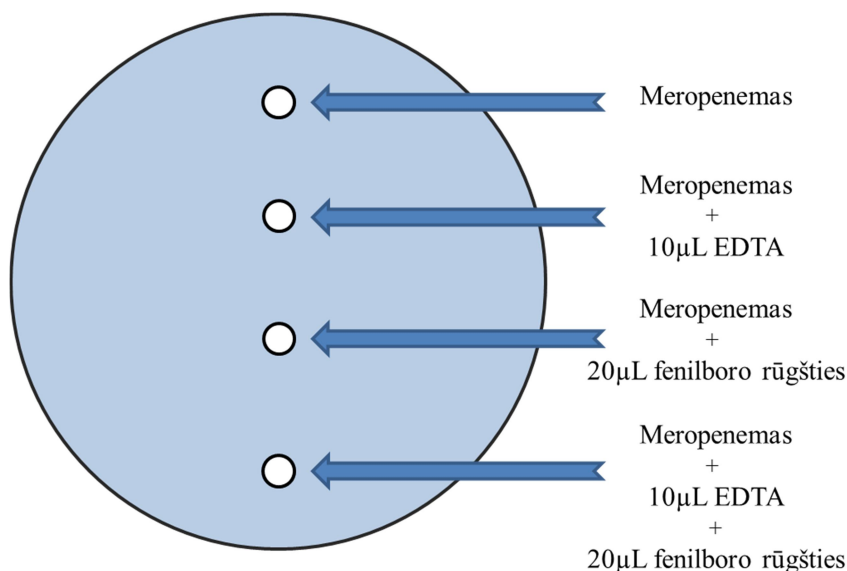
2.5.3. Meropenemo diskų kombinacijų metodas

Tarp įgyjamų atsparumo antibiotikams mechanizmų, β -laktamazių gamyba yra laikoma viena svarbiausių. Šie fermentai ne tik yra lengvai genetiškai perduodami, tačiau ir savo veikimu inaktyvuoja daugelį β -laktamo žiedą turinčių antibiotikų taip pat ir karbapenemus. Šioje didelėje fermentų šeimoje karbapenemazės (B klasės metalobeta-laktamazės (MBL), kurių aktyviame centre yra cinkas ir A klasės karbapenemazės (KPC)) *in vitro* hidrolizuoja visus arba beveik visus β -laktamo žiedą turinčius antibiotikus, įskaitant ir karbapenemus. β -laktamazės sintetinančių patogeninių mikroorganizmų paplitimas sparčiai didėja visame pasaulyje, ir tai yra viena iš svarbiausių grėsmių visuomenės sveikatai, todėl labai svarbu laiku identifikuoti šiuos patogenus, siekiant paskirti efektyvų gydymą ir stabdyti atsparių bakterijų kamienų plitimą.

Darbai pasirinktas metodas yra modernus EDTA ir fenilborno rūgšties bandymo derinys atliekamas vienoje *petri* lėkštelėje ir buvo pirmą kartą pritaikytas Graikijoje tiriant gramneigiamų bakterijų izoliatus, kurie kartu gamina KPC ir MBL karbapenemazes. Bandymo pranašumas prieš kitus, yra tas, kad jo metu galima atskirti *A. baumannii* kamienus, kurie sintetina atitinkamas karbapenemazes. Modernus metodas leidžia identifikuoti tris skirtingas ląstelių rūšis- tik KPC sintetinančias, tik MBL sintetinančias ir abi paminėtas karbapenemazes sintetinančias ląsteles. Šiuo metodu galima tiksliai nustatyti, kuri iš minėtų karbapenemazių yra sintetinama ir pagal gautus rezultatus parinkti efektyvų gydymo būdą (64).

Metodas vykdomas šia eiga:

- 1 žingsnis: Paruošiama 0,5 McFarlando drumstumo bakterijų suspensija (atitinkanti $1,5 \times 10^8$ kolonijas formuojančių vienetų KfV/ml). Pasirenkamos 3-5 gerai izoliuotos, tokio pat morfologinio tipo bakterijų kolonijos. Sterilia kilpele kultūros perkeliama į mėgintuvėlį su steriliu fiziologiniu tirpalu.
- 2 žingsnis: Miulero-Hintono agarizuota terpė inokuliuojama steriliu vatos tamponu ir ant viršaus uždedami keturi meropenemo diskai.
- 3 žingsnis: Ant antro disko užpilama 10 μ l EDTA, ant trečio disko 20 μ l fenilborno rūgšties. Užpilti 20 μ l fenilborno rūgšties ir 10 μ l EDTA ant ketvirtojo disko (5 pav.).
- 4 žingsnis: Vykdoma ląstelių inkubuojama 30 ° C temperatūroje 18-24 val.
- 5 žingsnis: Matuojamos susidariusios bakterijų augimo inhibicijos zonos (MASZ), apvalinant iki milimetro

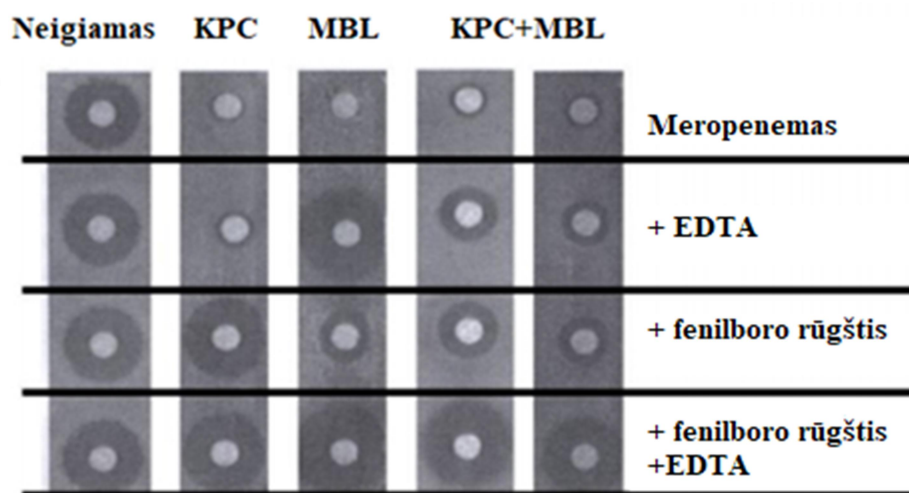


6 pav. Izoliatų tyrimas naudojant meropenemo diskus

Rezultatų interpretavimas:

Kombinuotų meropenemo diskų bandymo rezultatų aiškinimas yra pagrįstas palyginimu tarp susidarantių keturių skirtingų meropenemo diskų slopinimo zonų kombinacijų, kaip parodyta 6 paveiksle.

Jei tiriamasis izoliatas nesintetina karbapenemazių, antibiotikų diskų, kuriuose yra inhibitorių, zonų skersmuo neturės reikšmingų skirtumų (≥ 5 mm), augimo inhibicija vyks tik dėl naudojamo meropenemo disko. KPC sintezės ląstelėse atveju, diskuose, kurie papildomai turi pridėtos fenilboro rūgštis, inhibicijos zonos padidės (≥ 5 mm), palyginus su diskais turinčiais tik meropenemo. MBL sintezė ląstelėse bus nustatoma, kuomet inhibicijos zonos padidės (≥ 5 mm) prie diskų, kurie yra papildyti EDTA tirpalu. Jeigu izoliatas sintetina ir KPC, ir MBL, ketvirtasis diskas turės didesnę nei likusių zonų Inhibicijos skersmenį. Skirtingais atvejais, meropenemo diskai papildyti EDTA arba fenilboro rūgštimi gali turėti arba gali neturėti (≥ 5 mm) didesnio inhibicijos zonos skersmens nei tik meropenemo diskas (7 pav.).



7 pav. Meropenemo diskų metodo rezultatų interpretavimas

2.5.4. Jautrumo antibiotikams nustatymas diskų difuzijos metodu

Atsparumas pasirinktiems antibiotikams buvo nustatytas diskų difuzijos metodu. Miulerio – Hintono agaras buvo inokuliuojamas ir ant viršaus uždedami popieriniai diskai, turintys tam tikrus skirtingų koncentracijų antibakterinius vaistus. Antibiotikai difunduoja į terpę ir suformuoja koncentracijos gradientą su didele koncentracija šalia disko, kuri tolstant nuo jo mažėja.

Metodas vykdomas šia eiga:

- 1 žingsnis: Paruošiama 0,5 McFarlando drumstumo bakterijų suspensija (atitinkanti 1,5 x 10⁸ kolonijas formuojančių vienetų KfV/ml). Pasirenkamos 3-5 gerai izoliuotos, tokio pat morfologinio tipo bakterijų kolonijos. Sterilia kilpele kultūros perkeliama į mėgintuvėlį su steriliu fiziologiniu tirpalu.
- 2 žingsnis: Steriliu vatos tamponėliu užsėjamas Miulerio-Hintono agaro paviršius, braukiant tamponu per agaro paviršių. Ši procedūra pakartojama dar du kartus, kiekvieną kartą pasukant Petri lėkštelę maždaug 60° kampu, kad bakterijų suspensija pasiskirstytų tolygiai.
- 3 žingsnis: Antibiotikų diskai uždedami iš karto ant visos lėkštelės naudojant skirstytuvą, gerai prispaudžiant prie Miulerio-Hintono agaro paviršiaus. Lėkštelės apverčiamos ir 15 min laikotarpiu sudedamos į termostatą. Inkubuojama 35 °C temperatūroje.
- 4 žingsnis: Matuojamos susidariusios bakterijų augimo inhibicijos zonos, apvalinant iki milimetro
- 5 žingsnis: Slopinimo zonų dydžiai interpretuoti remiantis Europos jautrumo antibakterinėms medžiagoms tyrimų komiteto 2016 m. parengtomis EUCAST (angl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) standarto lentelėmis.

Tyrimui pasirinkti penki dažniausiai *A. baumannii* sukeltoms infekcijoms gydyti naudojami antibiotikai ar jų kombinacijos: Amikacinas, Ampicilinas – Sulbaktamas, Cefoperazonas – Sulbaktamas, Ciprofloksacinas, Meropenemas. Jautrumas antibiotikams nustatomas remiantis EUCAST standartu, kuris aprašomas lentelėje

3 lentelė. Jautrumas antibiotikams remiantis EUCAST standartu

Antibiotiko pavadinimas	Antibiotiko koncentracija diskelyje	Inhibicijos zonos diametras, mm	
		Atsparu	Jautru
Amikacinas	30 µg	<19	≥19
Ampicilinas - Sulbaktamas	10 / 10 µg	<15	≥15
Cefoperazonas - Sulbaktamas	30 / 10 µg	<19	≥19
Ciprofloksacinas	5 µg	<21	≥21
Meropenemas	10 µg	<21	≥21

2.6. Statistinė analizė

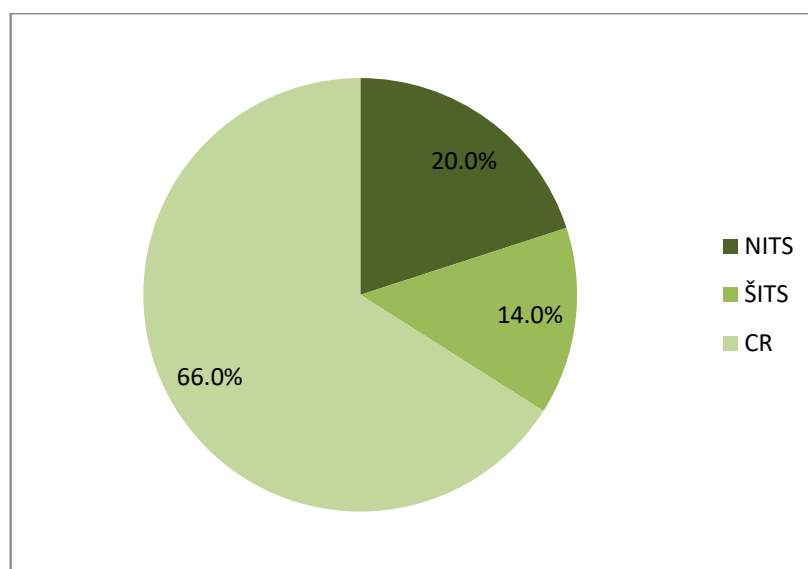
Tyrimo metu surinkti duomenys buvo analizuojami naudojant šias programas: Microsoft Excel for Windows (Microsoft Corporation, JAV) ir IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Corporation, JAV). Dažnio skirtumui tarp kelių grupių vertinti buvo naudojamas neparаметrinis statistinis kriterijus χ^2 . Hipotezėms tikrinti bei skirtumų tarp grupių statistiniam reikšmingumui įvertinti buvo naudojama paklaidos tikimybė $p < 0,05$.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų intensyvios terapijos skyrių iš viso gauta 50 bronchų sekreto mėginių su *A. baumannii* izoliatais, visi mėginiai surinkti per 2018 m. Vistiems mėginiams atliktos antibiotikogramos su pasirinktais skirtingų klasių ir veikimo mechanizmų antibiotikais (Amikacinu, Ampicillinu-Sulbaktamu, Cefoperazonu-Sulbaktamu, Ciprofloksacinu, Meropenemu) ir įvertintas tiriamųjų izoliatų atsparumas. Taip pat siekiant išsiaiškinti *A. baumannii* atsparumo antibiotikams mechanizmus atlikti tyrimai, nustatantys izoliatų ekspresuojamus fermentus, skirtus antibiotikų skaidymui. Tirtos pagrindinės šios paskirties fermentų grupės, tai β -laktamazės ir karbapenemazės pasitelkiant anksčiau aprašytus metodus. Atlikus reikalingus tyrimus, gauti rezultatai buvo susisteminti ir pateikiami žemiau.

3.1. *A. baumannii* izoliatų pasiskirstymas pagal intensyvios terapijos skyrius

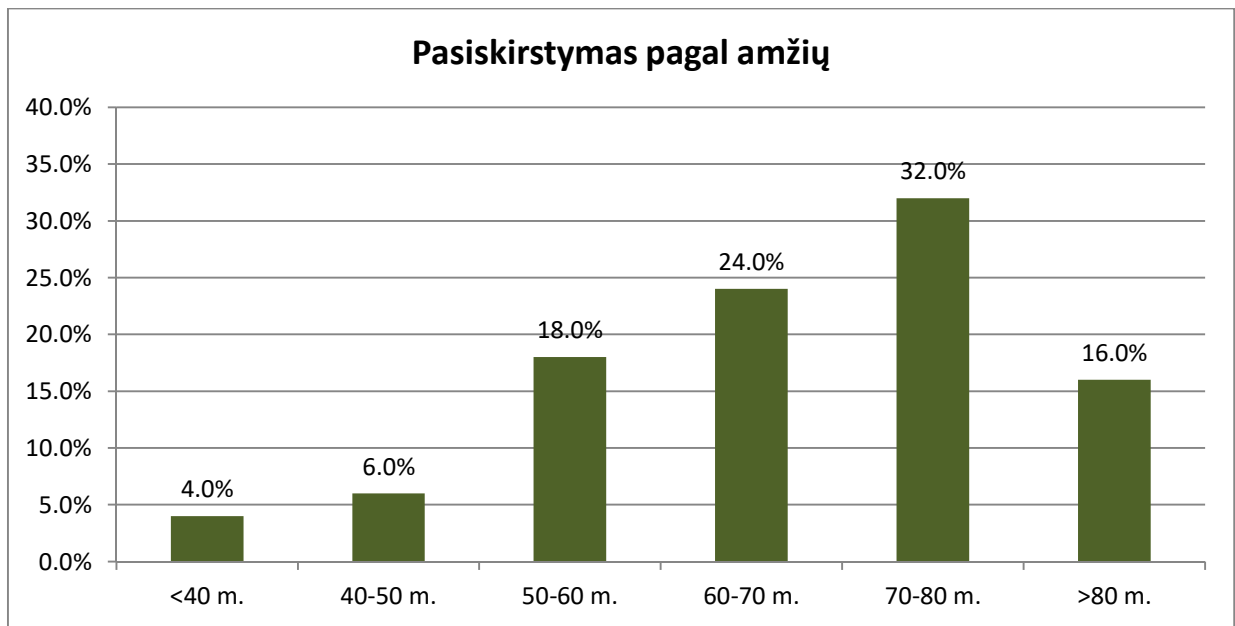
Darbo metu analizuojami mėginiai, buvo paimti iš skirtingų Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų intensyvios terapijos skyrių. Analizuojamu laikotarpiu, Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje buvo nustatyti - 14 proc. (7 mėginiai), Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyriuje – 20 proc. (10 mėginių), Centriniam intensyvios terapijos skyriuje - 66 proc. (33 mėginiai), užsikrėtimai *A. baumannii* (pav. 8).



8 pav. Tiriamų *A. baumannii* izoliatų pasiskirstymas skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose

3.2. Tiriamųjų pasiskirstymas pagal amžiaus grupes

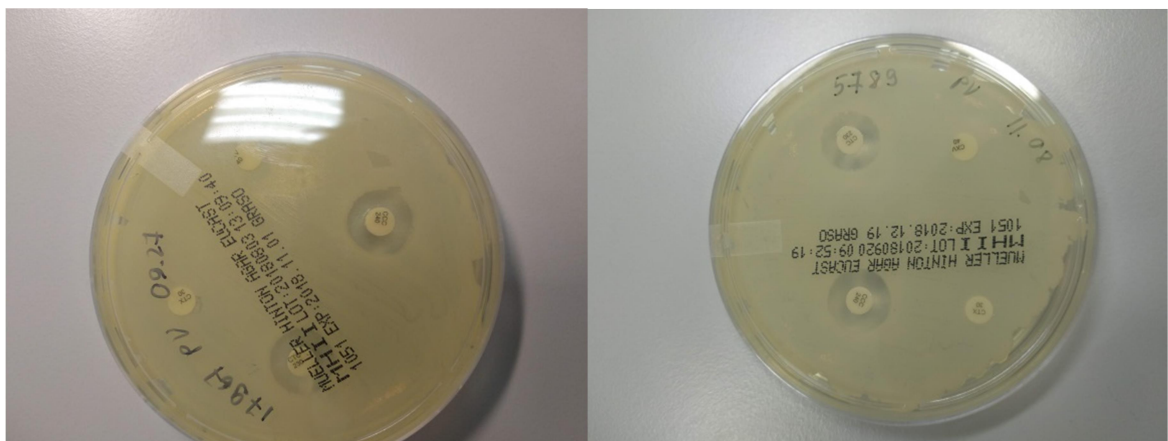
Tyrime analizuojami *A. baumannii* izoliatai aptikti asmenims, kurių amžius siekia nuo 25 iki 101 metų. Atlikus turimų duomenų analizę, pastebėta tendencija, jog tiriamųjų patogenų infekcijos dažniau pasireiškia vyresnio amžiaus žmonėms, todėl atsižvelgiant į turimą informaciją, galima suskirstyti visus infekcijų atvejus į dvi amžiaus grupes: vyresnio amžiaus asmenys ir jaunesni. Vadovaujantis Jungtinių Tautų ir Pasaulio Sveikatos Organizacijos gairėmis, pasirinktoms amžiaus grupėms turėtų priklausyti asmenys iki 65 ir virš 65 metų imtinai. Iš 50 analizuojamų *A. baumannii* izoliatų šioms dviem amžiaus grupėms, buvo priskirti atitinkamai 18 ir 32 mėginiai. Atlikus detalią amžiaus ir infekcijų palyginimą, pastebėta, jog didžiausias infekcijų skaičius priklauso asmenims, kurių amžius yra tarp 70-80 metų (32,0 proc.), o mažiausias susirgimų kiekis priklauso amžiaus grupei iki 40 metų (4.0 proc.) (pav. 9). Atlikus pirminę analizę, galima teigti, jog *A. baumannii* infekcijos dažiau pasireiškia vyresnio amžiaus žmonėms.



9 pav. Tiriamų *A. baumannii* izoliatų pasiskirstymas pagal sergančiųjų amžių

3.3. *A. baumannii* izoliatų ESBL ir Amp-C β-laktamazių ekspresija

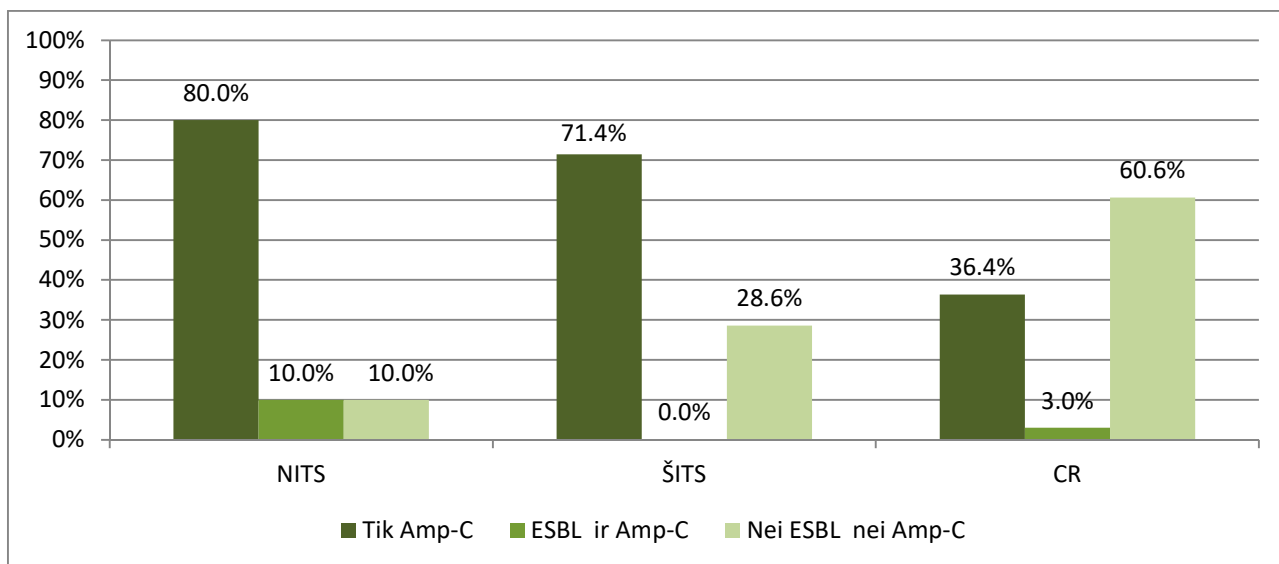
Viena iš pagrindinių atsparumo antibiotikams priežasčių yra bakterijų ekspresuojami fermentai. Tokios medžiagos kaip, išplėstinio spektro β-laktamazės (ESBL) bei Amp-C β-laktamazės ypatingai veikia Aminopenicilinų ir cefalosporinų grupes turinčius antibiotikus. Efektyviam *A. baumannii* infekcijų gydymui bei atsparumo plitimo mažinimui, labai svarbu laiku nustatyti izoliatų atitinkamų β-laktamazių sintezės galimybes. Šių fermentų ekspresijos nustatymui pasitelktas specifinis metodas, leidžiantis identifikuoti individualias, tiriamųjų izoliatų sintetinas β-laktamazes. Tyrimo metu gaunamos bakterijų augimo inhibicijos zonos pavaizduotos paveikslėlyje (pav 10).



10 pav. *A. baumannii* izoliatų auginimas tiriant ESBL ir Amp-C β-laktamazių ekspresija

Antibiotikų kombinacijų jautrumo profiliai buvo surinkti naudojant minimalias slopinančias koncentracijas (MIC) pagal ESBL ir Amp-C β-laktamazių nustatymo gaires aprašytas 2.5.2 skyriuje. Ištyrus penkiasdešimt *A. baumannii* izoliatų paimtų iš skirtingų intensyvios terapijos skyrių, nustatyta, jog dažniausiai bakterijos sintetina Amp-C β-laktamazes. Procentiškai, didžiausia dalis ši fermentą sintetinančių bakterijų nustatyta NITS (80,0 proc.), o mažiausia dalis bakterijų nustatyta CR skyriuje (36,4 proc.) (pav. 11). Taip pat NITS ir CR skyriuose buvo identifikuoti

izoliatai, sintetinantys tiek ESBL, tiek ir Amp-C β -laktamazes, dėl šios priežasties, tiriamieji kamienai, tampa ypatingai atsparūs visiems β laktamo žiedą savo struktūroje turintiems antibiotikams. Atlikus β -laktamazių ekspresijos tyrimą ir nustatius, jog didžioji dauguma tiriamų *A. baumannii* izoliatų sintetina šiuos fermentus, galima daryti prielaidą, jog atlikus atsparumo antibiotikams testus, šios bakterijos bus atsparios aminopenicilinų ir cefalosporinų grupėms.



11 pav. *A. baumannii* izoliatų ESBL ir Amp-C β -laktamazių ekspresija skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose

Tiriamų *A. baumannii* izoliatų ESBL ir Amp-C β -laktamazių ekspresija apibendrinama lentelėje pateiktoje žemiau.

4 lentelė. *A. baumannii* izoliatų ESBL ir Amp-C β -laktamazių ekspresija

Skvrius	Amp-C ekspresija	ESBL ir Amp-C ekspersija	Nei ESBL nei Amp-C
NITS	8	1	1
ŠITS	5	0	2
CR	12	1	20
Viso	25	2	23

3.4. *A. baumannii* izoliatų tyrimas meropenemo diskų kombinacijų metodu

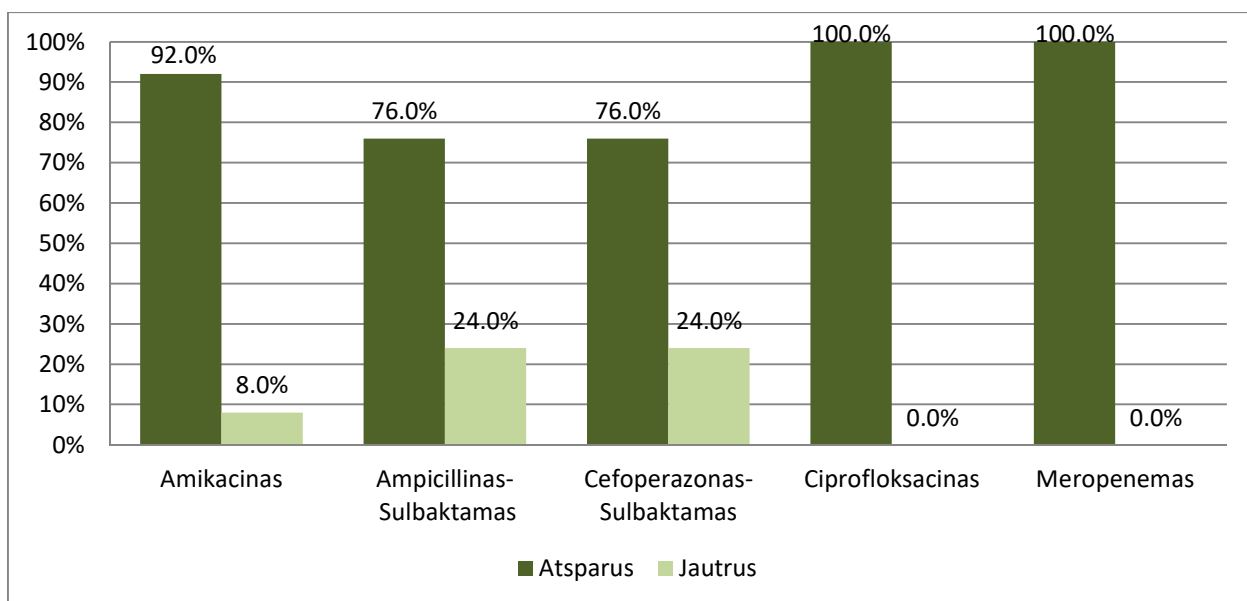
Dar viena didelė fermentų šeima, suteikianti bakterijoms atsparumą antibiotikams yra karbapenemazės. Šiame darbe tirta, dviejų pagrindinių šios klasės fermentų ekspresija, tai B klasės metalo-beta-laktamazių (MBL) ir A klasės karbapenemazių (KPC). Tai pagrindinės medžiagos, kurios *in vitro* hidrolizuoja visus arba beveik visus beta-laktamo žiedą turinčius antibiotikus, įskaitant ir karbapenemus. Šių fermentų sintezės nustatymui pasitelktas specifinis metodas, leidžiantis atskirti kurią iš karbapenemazių klasių sugeba sintetinti tiriamieji izoliatai. Antibiotikų jautrumo profiliai buvo nustatyti naudojant minimalias slopinančias koncentracijas (MIC) pagal Meropenemo diskų kombinacijų metodo gaires 2.5.2 skyriuje. Atlikus tyrimą, nustatyta, jog visi penkiasdešimt tirtų *A. baumannii* bakterijų mėginių, sintetina tik A klasės karbapenemazes. Tai puikiai patvirtina ir turimi atsparumo antibiotikams rezultatai, parodantys, kad visi tiriami mėginiai yra atsparūs meropenemui, pagrindiniam karbapenemazių taikiniui. Tyrimo metu gaunamos bakterijų augimo inhibicijos zonos pavaizduotos 12 paveikslėlyje.



12 pav. *A. baumannii* izoliatų auginimas tiriant karbapenemazių ekspresija

3.5. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose

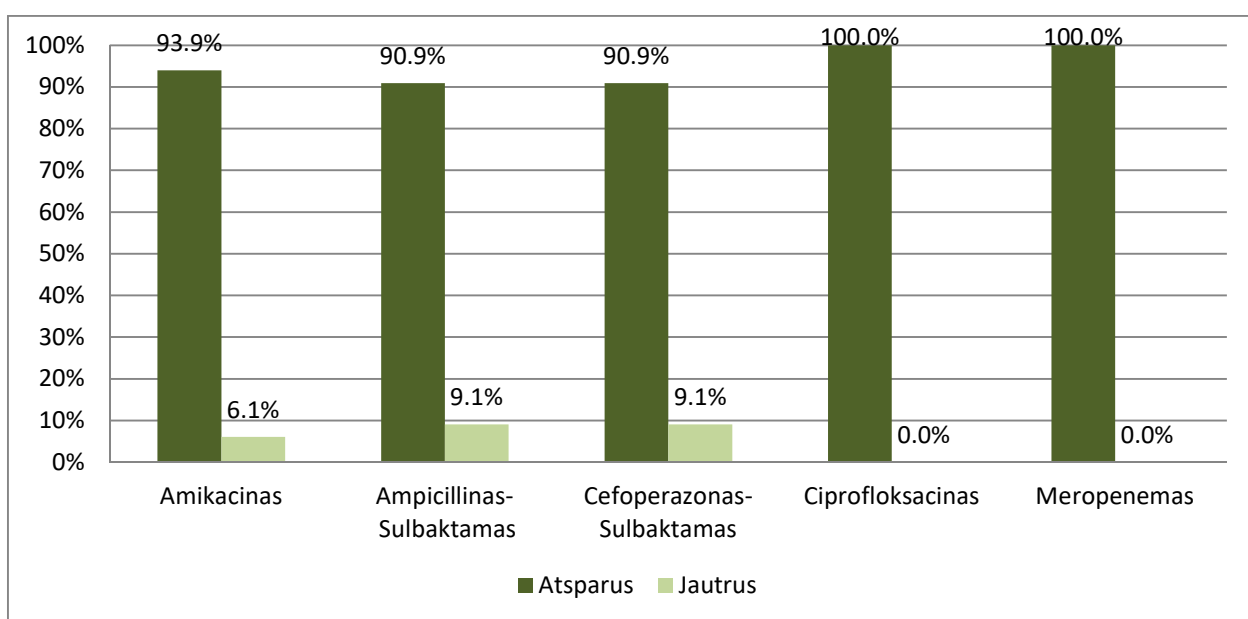
Antibiotikų jautrumo profiliai buvo nustatyti naudojant minimalias slopinančias koncentracijas (MIC) pagal CLSI gaires. 13 paveiksle parodyta tiriamų *A. baumannii* izoliatų jautrumo ir atsparumo procentinė dalis tiriamiesiems antibiotikams. Iš visų Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikose surinktų ir tirtų izoliatų, 76% izoliatų nebuvo jautrūs nei vienam iš pasirinktų antibiotikų. Visi tirti izoliatai nebuvo jautrūs meropenemui, bei ciprofloksacinui, todėl galima teigti, jog šios rūšies bakterijos labai efektyviai skaido ir šalina karbapenemų ir fluorokvinolonų klasėms priklausančius antibiotikus. Labiausiai izoliatai buvo jautrūs Ampicilinui- Sulbaktamui ir Cefoperazonui- Sulbaktamui (24 proc.) (pav. 13). Tai parodo, jog skirtingų klasių antibiotikų kombinacijos, leidžiančios vienu metu naudoti skirtingus ląstelės veikimo mechanizmus, gali pasiekti geresnių rezultatų, nei vartojant tik vienos rūšies antimikrobinę medžiagą. Ypatingai augant ląstelių atsparumui antibiotikams, ši gydymo strategija, leidžia sėkmingai kovoti su sunkiai įveikiamais patogenais.



13 pav. *A. baumannii* izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams

3.6. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Centriniam intensyvioji terapijos skyriuje

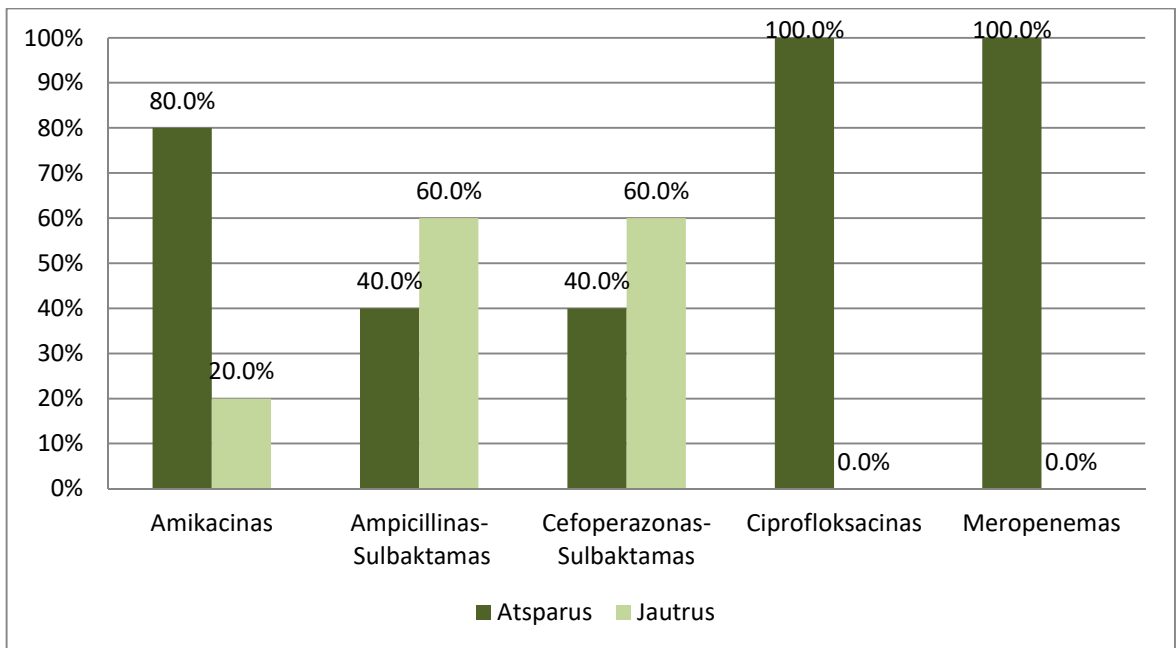
Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Centriniam intensyvioji terapijos skyriuje 2018 metais atsparumas pasirinktoms antimikrobinėms medžiagoms svyravo nuo 90,9 proc. iki 100,0 proc. visų tirtų atvejų. Didžiausią atsparumą šiame skyriuje *A. baumannii* izoliatai turėjo Meropenemui (100,0 proc.) ir Ciprofloksacinui (100,0 proc.). Trečiasis pagal bakterijų atsparumą buvo Amikacinas (93,9 proc.), o rečiausiai izoliatai buvo atsparūs Cefoperazono ir Sulbaktamo kombinacijai (atsparu 46,3 proc.) bei Ampicilino ir Sulbaktamo kombinacijai (atsparu 46,3 proc.) (pav. 14). *A. baumannii* izoliatai surinkti iš Centrinio intensyvioji terapijos skyriaus, pasižymėjo didžiausiu atsparumu pasirinktiems antibiotikams. Dėl didelio infekcijų kiekio daugeliui antibiotikų atsparios bakterijos gali plisti įgauti papildomą atsparumą, todėl labai svarbu identifikuoti visus užsikrėtimo šiame skyriuje atvejus ir taikyti veiksmingą gydymą.



14 pav. *A. baumannii* izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Centriniam intensyvioji terapijos skyriuje

3.7. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Neurochirurgijos intensyvioji terapijos skyriuje

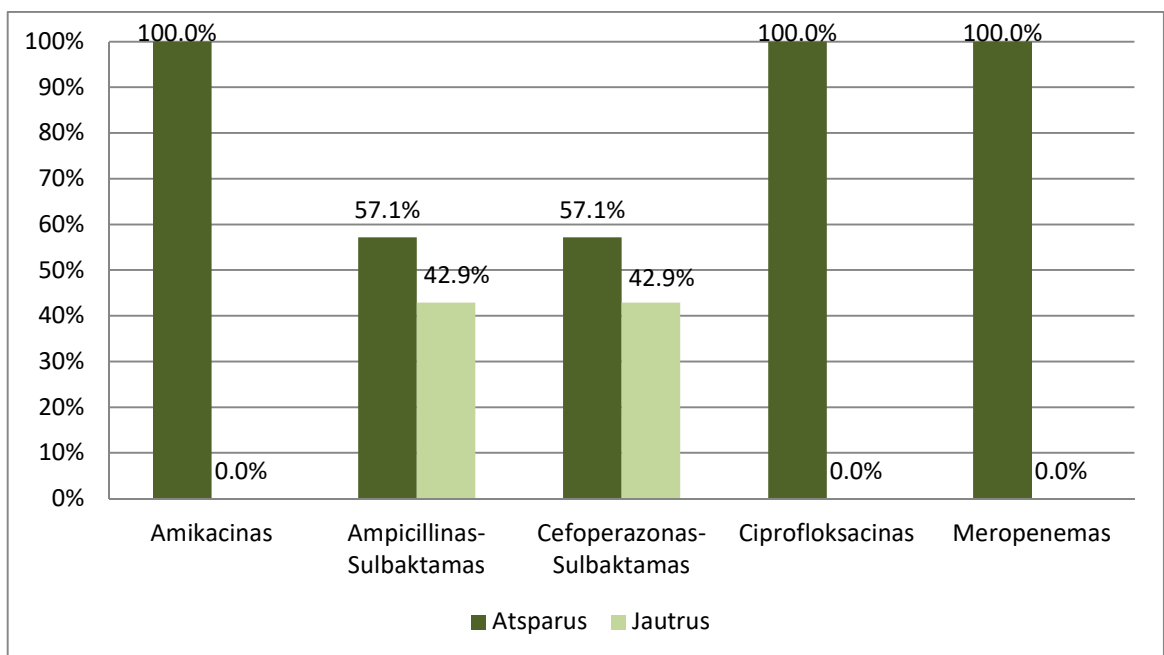
Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Neurochirurgijos intensyvioji terapijos skyriuje 2018 metais atsparumas pasirinktoms antimikrobinėms medžiagoms svyravo nuo 40 iki 100proc. visų tirtų atvejų. Didžiausią atsparumą šiame skyriuje *A. baumannii* izoliatai turėjo Meropenemui(100,0 proc.) ir Ciprofloksacinui(100,0 proc.). Trečiasis antibiotikas pagal bakterijų atsparumą buvo Amikacinas (80,0 proc.), o rečiausiai izoliatai buvo atsparūs Cefoperazono ir Sulbaktamo kombinacijai (atsparu 40,0 proc.) bei Ampicilino ir Sulbaktamo kombinacijai (atsparu 40,0 proc.) (pav. 15). Atlikus gautų rezultatų analizę, galima teigti, jog Neurochirurgijos intensyvioji terapijos skyriuje identifikuoti *A. baumannii* izoliatai yra mažiau atsparūs antibiotikams nei Centriniam intensyvioji terapijos skyriuje, dėl šios priežasties, labai svarbu jog sergantiesiems būtų suteikiamas efektyvus gydymas, kuris neleistų atspariems izoliatams plisti tarp skirtingų skyrių.



15 pav. *A. baumannii* izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Centriniam intensyvios terapijos skyriuje

3.8. Izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje

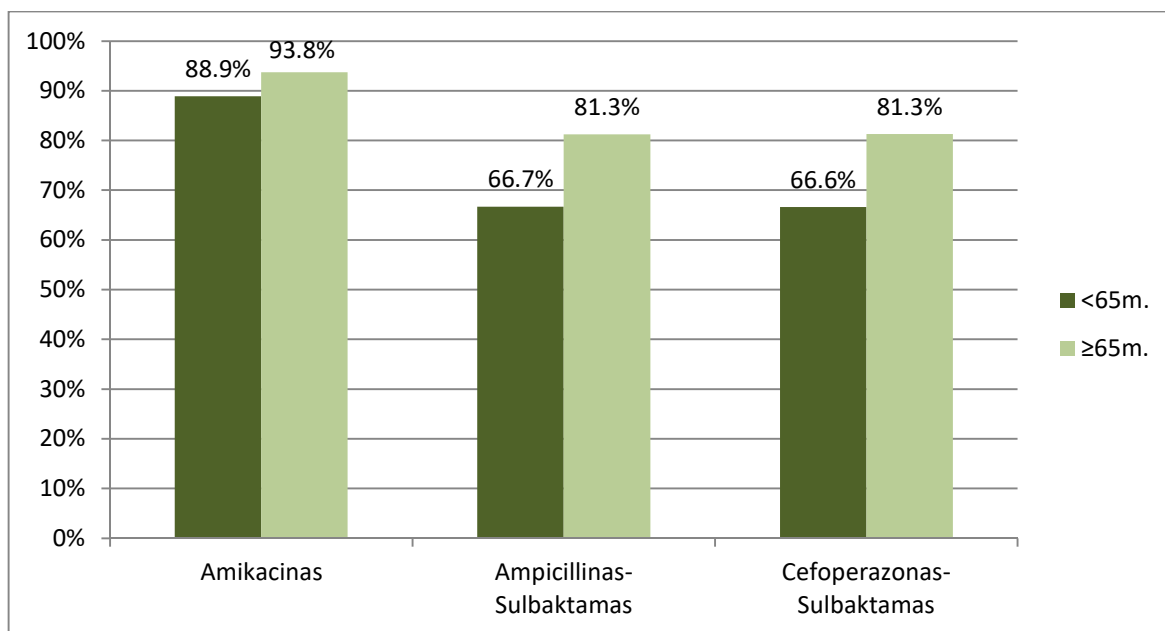
Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje 2018 metais Atsparumas pasirinktoms antimikrobinėms medžiagoms svyravo nuo 79,7 iki 95,0 proc. visų tirtų atvejų. Didžiausią atsparumą šiame skyriuje *A. baumannii* izoliatai turėjo Meropenemui (100,0 proc.), Ciprofloksacinui (100,0 proc.) ir Amikacinui (100,0 proc.), o rečiausiai tiriamieji izoliatai buvo atsparūs Cefoperazono ir Sulbaktamo kombinacijai (atsparu 57,1 proc.) bei Ampicilino ir Sulbaktamo kombinacijai (atsparu 57,1 proc.) (pav. 16)



16 pav. *A. baumannii* izoliatų jautrumas pasirinktiems antibiotikams Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje

3.9. Atsparumas tiriamiems antibiotikams pagal amžiaus grupes

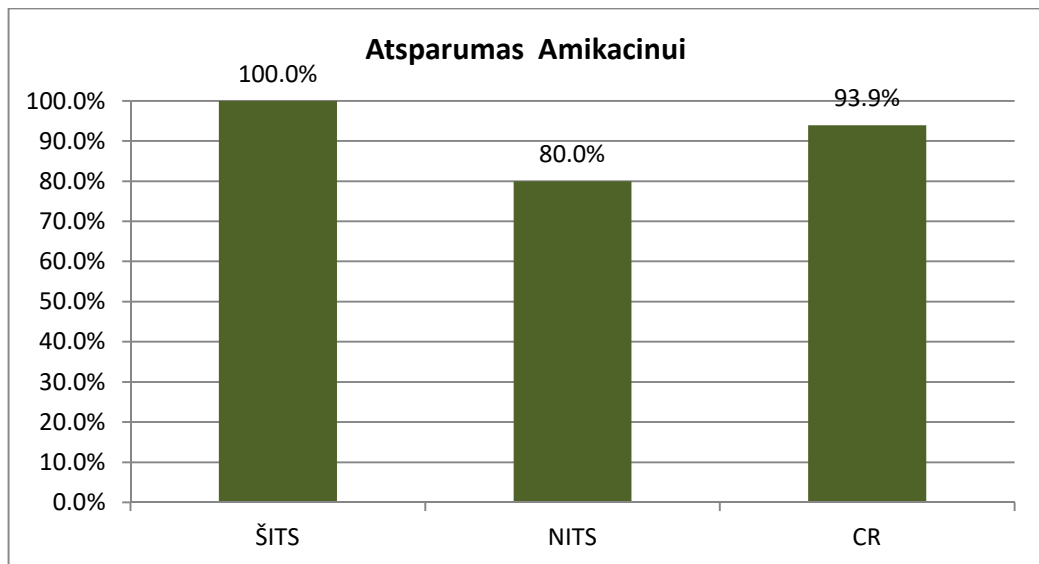
Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno klinikų intensyvios terapijos skyriuose 2018 metais *A. baumannii* atsparumas pasirinktoms antimikrobinėms medžiagoms buvo tendencingas priklausomai nuo amžiaus grupės. Visais tirtais atvejais, kuomet atsparumas antibiotikams nebuvo 100 proc., vyresnio amžiaus žmonėms (≥ 65 m.) nustatyti patogenai, pasižymėjo didesniu atsparumu antibiotikams. Analizuojant gautus duomenis, *A. baumannii* atsparumas šioje amžiaus grupėje svyravo nuo 81,3 proc. iki 93,8 proc. visų tirtų atvejų. Didžiausią atsparumą *A. baumannii* izoliatai turėjo Amikacinui (93,8 proc.) o mažiausiai izoliatai buvo atsparūs Cefoperazono ir Sulbaktamo mišiniui (81,3 proc.) bei Ampicilono ir Sulbaktamo mišiniui (81,3proc.). Tuo tarpu izoliatai gauti iš asmenų iki 65 metų visais atvejais parodė didesnę jautrumą pasirinktiems antibiotikams. Palyginus atsparumo tiriamiesiems antibiotikams profilius tarp skirtingų amžiaus grupių didžiausias skirtumas nustatytas tarp Cefoperazono ir Sulbaktamo mišiniui bei Ampicilino ir Sulbaktamo tai parodo, kad gydant jaunesnius asmenis, didesnė tikimybė, jog antibiotikai bus veiksmingi.



17 pav. *A. baumannii* izoliatų atsparumas tiriamiems antibiotikams pagal amžiaus grupes

3.10. Izoliatų jautrumas amikacinui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose

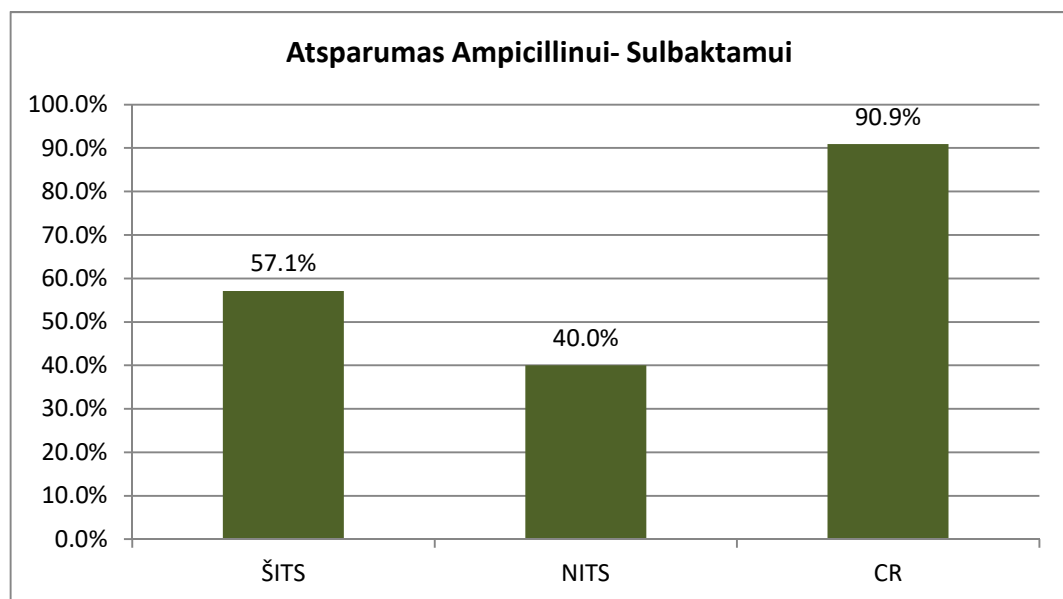
Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose 2018 metais atsparumas amikacinui svyravo nuo 80,0 iki 100,0 proc. visų tirtų atvejų. Didžiausią atsparumą šiam antibiotikui *A. baumannii* izoliatai turėjo Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje (100,0 proc.), o rečiausiai tiriamieji izoliatai amikacinui atsparūs buvo Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyriuje (80,0 proc.). Galima teigti, jog didžiausias šiam antibiotikui atsparių *A. baumannii* kamienų paplitimas yra būtent Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje, todėl pacientų gydymui, nereikėtų rinktis amikacino, nes jis bus visiškai neveiksmingas.



18 pav. *A. baumannii* izoliatų atsparumas amikacinui Širdies chirurgijos (ŠITS), Neurologijos (NITS) ir Centriniam (CR) intensyvios terapijos skyriuje

3.11. Izoliatų jautrumas Ampicilinui- Sulbaktamui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose

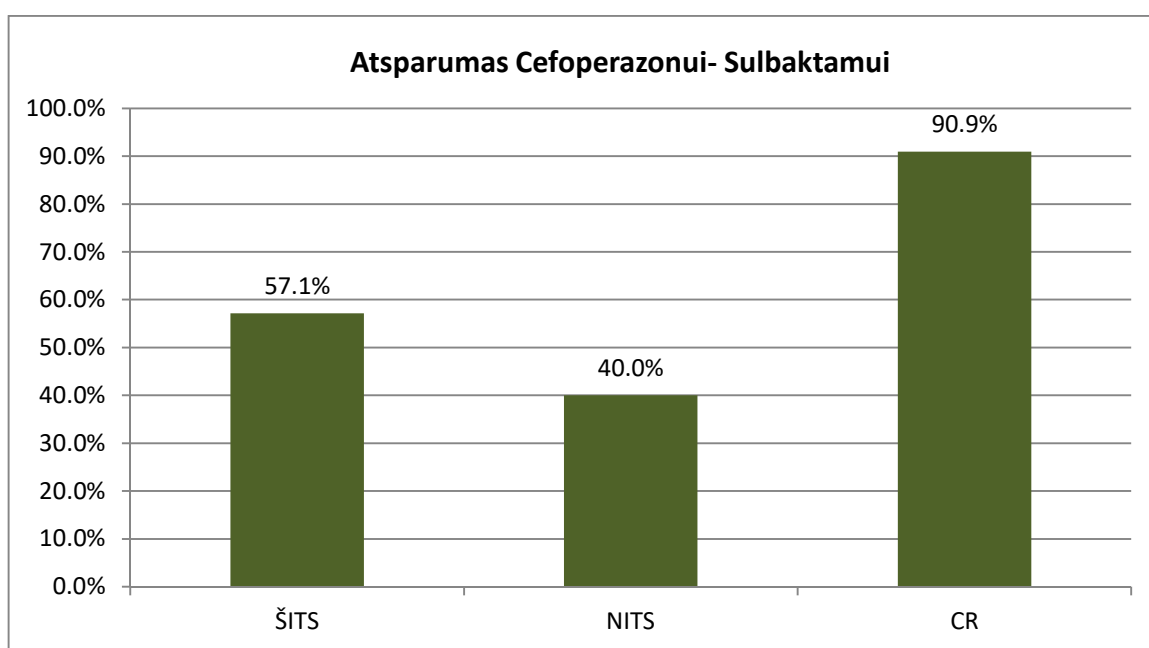
Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose 2018 metais atsparumas Ampicilinui- Sulbaktamui svyravo nuo 40,0 iki 90,9 proc. visų tirtų atvejų. Didžiausią atsparumą šiam antibiotikui *A. baumannii* izoliatai turėjo Centriniam intensyvios terapijos skyriuje (90,9 proc.), o rečiausiai tiriamieji izoliatai Ampicilinui- Sulbaktamui atsparūs buvo Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyriuje (40,0 proc.). Galima teigti, jog didžiausias šiam antibiotikui atsparių *A. baumannii* kamienų paplitimas yra būtent Centriniam intensyvios terapijos skyriuje, todėl pacientų gydymui, nereikėtų rinktis Ampicilino- Sulbaktamo, nes anksčiau minėtame skyriuje jis bus mažai veiksmingas. Taip pat stebimas didelis šių antibiotikų atsparumo skirtumas lyginant intensyvios terapijos skyrius, kuris yra netgi 50,9 proc. tarp CR ir NITS.



19 pav. *A. baumannii* izoliatų atsparumas ampicilinui-sulbaktamui Širdies chirurgijos (ŠITS), Neurologijos (NITS) ir Centriniam (CR) intensyvios terapijos skyriuje

3.12. Izoliatų jautrumas Cefoperazonui - Sulbaktamui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose 2018 metais atsparumas Cefoperazonui- Sulbaktamui svyravo nuo 40,0 iki 90,9 proc. visų tirtų atvejų. Didžiausią atsparumą šiam antibiotikui *A. baumannii* izoliatai turėjo Centriniam intensyvios terapijos skyriuje (90,9 proc.), o rečiausiai tiriamieji izoliatai Cefoperazonui- Sulbaktamui atsparūs buvo Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyriuje (40,0 proc.). Galima teigti, jog didžiausias šiam antibiotikui atsparių *A. baumannii* kamienų paplitimas yra būtent Centriniam intensyvios terapijos skyriuje, todėl pacientų gydymui, nereikėtų rinktis Cefoperazono- Sulbaktamo, nes anksčiau minėtame skyriuje jis bus mažai veiksmingas. Taip pat stebimas didelis šių antibiotikų atsparumo skirtumas lyginant intensyvios terapijos skyrius, kuris yra netgi 50,9 proc. tarp CR ir NITS.



20 pav. *A. baumannii* izoliatų atsparumas cefoperazonui-sulbaktamui Širdies chirurgijos (ŠITS), Neurologijos (NITS) ir Centriniam (CR) intensyvios terapijos skyriuje

3.13. Izoliatų jautrumas Ciprofloksacinui ir Meropenemui skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose 2018 metais tirtų *A. baumannii* izoliatų atsparumas antibiotikams Ciprofloksacinui ir Meropenemui buvo nustatytas 100 proc. visų tirtų atvejų. Galima teigti, jog šiems antibiotikams atsparių *A. baumannii* kamienų paplitimas yra ligoninėje, susijęs su A klasės karbapenemazių (KPC) sinteze, kadangi visi tirti kamienai sintetina šį fermentą, atsakingą už atsparumą karbapenemams. Atsižvelgiant į gautus duomenis, pacientų gydymui, nereikėtų rinktis Ciprofloksacino ir Meropenemo, nes šie antibiotikai bus neveiksmingi.

3.14. Rezultatų aptarimas

Tikslingos *A. baumannii* infekcijų gydymo strategijos parinkimui būtinas etiologijos nustatymas. Šio tyrimo metu skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose aptikti tiriamieji patogenai buvo detalai analizuojami. Nustatyti *A. baumannii* izoliatų atsparumo antibiotikams mechanizmai, identifikuojant sintetinamas pagrindines β -laktamazių ir karbapenemazių grupes, atsakingas už antibiotikų skaidymą ląstelėje. Duomenys apie šių fermentų svarbą išsiskiria, tačiau neabejotinai jie prisideda prie *A. baumannii* izoliatų atsparumo antibiotikams funkcijos. Atsparumo mechanizmams pagrįsti, atliktas jautrumo penkiems skirtingiems antibiotikams nustatymas diskų difuzijos metodu. Papildomai surinkta informacija apie *A. baumannii* infekcijų dažnį ir pacientų amžių skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose, leidžianti atlikti detalią analizę.

Tiriamuoju laikotarpiu pagrindinis skyrius, kuriame buvo nustatyta daugiausia *A. baumannii* bakterijų infekcijų, buvo Centrinis intensyvios terapijos skyrius – sukeltos infekcijos sudarė 66,0 proc. visų tirtų atvejų, likusiuose skyriuose infekcijų atvejai buvo ženkliai retesni. Taip pat pastebėta tendencija, jog bakterijos aptiktos Centriniam intensyvios terapijos skyriuje pasižymi didesniu atsparumu visiems tirtiems antibiotikams. Atsparumo antibiotikams skirtumai tarp skirtingų intensyvios terapijos skyrių buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$), išskyrus cefloksaciną ir meropenemą. Dėl šių priežasčių galima teigti, jog infekcijų skaičius priklauso nuo bakterijų gebėjimo prisitaikyti ir išvystyti atsparumą antibiotikams. Žinant *A. baumannii* virulentiškumą ir greitai prisitaikyti prie pakitusios aplinkos gebantį genomą, labai svarbu laiku nustatyti naujus infekcijų atvejus ir pritaikyti efektyvų gydymą, tik tokiu būdu galima užkirsti kelią šių patogenų plitimui ir atsparumo augimui.

A. baumannii yra pavojingas infekcijų sukėlėjas, pasižymintis dideliu atsparumu daugeliui antibiotikų. Tyrimo metu nustatytas šių bakterijų gebėjimas ekspresuoti β -laktamazes, pagrindinius fermentus, suteikiančius atsparumą didžiajai daliai β -laktamo žiedą turinčių bakterijų. Nustatyta, jog pusė visų tirtų izoliatų sintetina tik Amp-C bei du izoliatai, sintetinantys ir ESBL, ir Amp-C β -laktamazes. Amp-C fermentai suteikia ląstelėms didelį atsparumą prieš cefalosporinus bet ne karbapenemus. Trečios kartos cefalosporinai yra vieni iš pagrindinių antibiotikų, kuriais yra gydomos *A. baumannii* bakterijų sukeltos infekcijos, tyrime analizei pasirinktas šios klasės antibiotikas cefoperazonas, nustatyta, jog priklausomai nuo skyriaus, šiai medžiagai atsparių bakterijų kiekis svyruoja nuo 40,0 neurochirurgijos iki 90,9 proc. centriniam intensyvios terapijos skyriuje. Palyginimui, studija atlikta šiaurinėje Indijos dalyje, nustatė jog iš 82 tirtų *A. baumannii* izoliatų, visi buvo atsparūs antros kartos cefalosporinams ir 64,6 proc. iš jų ekspresavo Amp-C bei 4,8 proc. ESBL β -laktamazes (65). Tai tik patvirtina Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninėje atliktą tyrimą, kurio metu gauti panašūs rezultatai. Nustatyta, jog 54 proc. *A. baumannii* izoliatų ekspresuoja Amp-C ir 4,0 proc. ekspresuoja ESBL β -laktamazes, gauti duomenys buvo statistiškai reikšmingi ($p < 0,05$). Pagrindinis skirtumas nuo tyrimo atliko Indijoje, jog antibiotikų jautrumo testui buvo pasirinktas ne antros, o trečios kartos cefalosporinas – cefoperazonas, kuriam jautrūs buvo 24,0 proc. tirtų izoliatų. Todėl galima teigti, jog skirtingose pasaulio šalyse *A. baumannii* sintetinamų β -laktamazių paplitimas yra panašus ir daugiau nei pusė izoliatų geba sintetinti šiuos fermentus. Tačiau naudojant naujesnės kartos, efektyvesnius antibiotikus galima gauti geresnius gydymo rezultatus, dėl šios priežasties labai svarbu infekcijos atveju taikyti veiksmingą gydymą ir neleisti bakterijoms plisti bei įgyti papildomo atsparumo.

A. baumannii yra pavojingas infekcijų sukėlėjas, pasižymintis dideliu atsparumu daugeliui antibiotikų. Tyrimo metu nustatytas šių bakterijų gebėjimas sintetinti karbapenemų klasės antibiotikus skaidančius fermentus- karbapenemazes, šiuo atveju, tiriama būtent KPC ir MBL fermentų ekspresija. Atlikus gautų rezultatų analizę, nustatyta, jog visi tirti kamienai sintetina tik KPC karbapenemazę. Šių fermentų buvimą patvirtina ir atlikti antibiotikų atsparumo testai, kuriais nustatyta, jog visi analizuojami kamienai buvo atsparūs karbapenemų klasės antibiotikui-meropenemui. Palyginimui, Malaizijos atsparumo antibiotikams tyrimo duomenimis, ligoninėse išskirtų *Acinetobacter* atsparumas karbapenemams, įskaitant meropenamą, pasiekė 50-60 proc. reikšmes ir 2017m. laikosi šio intervalo ribose (66). Studija atlikta Serbijoje pabrėžė tapatų dėsningumą– nuosekliai didėjantį *A. baumannii* atsparumą karbapenemams 2009-2015 m. laikotarpiu, kuris tiesiogiai koreliuoja su didėjusiu šių antibiotikų vartojimo mastu minėtu laikotarpiu (67). Apibendrinant, gautus duomenis ir palyginus juos su kitų šalių turima informacija, galima teigti jog *A. baumannii* bakterijų atsparumas karbapenemų klasės antibiotikams sparčiai plinta.

Didėjantis *Acinetobacter* rūšių paplitimas ir atsparumas antibiotikams ypatingai pasireiškia vyresnio amžiaus žmonėms. Atlikus tyrimą nustatyta, jog iš visų tirtų penkiasdešimties izoliatų, trisdešimt du buvo nustatyti asmenims virš 65 metų. Palyginimui atlikos studijos patvirtina, jog vyresnis amžius yra vienas iš pagrindinių veiksnių *A. baumannii* infekcijoms (68). Kitas tyrimas atliktas Jungtinėse Amerikos Valstijose, taip pat nustatė, jog net 68 proc. infekuotų asmenų buvo virš 60 metų amžiaus (69). Tai tik patvirtina tyrimo metu gautus rezultatus ir parodo, jog ši asmenų grupė yra ypatingai pažeidžiama. Taip pat pastebėta, jog vyresnio amžiaus žmonių infekcijos pasižymėjo didesniu atsparumu visiems tiriamiems antibiotikams, didžiausias atsparumo skirtumas tarp amžiaus grupių lygus 14,6 proc. Taip pat nustatyta, jog net 93,8 proc. izoliatų, nustatytų asmenims virš 65 metų buvo atsparūs amikacinui. Dėl šios priežasties, vyresnių asmenų infekcijos dažniau pasibaigia mirtimi, tai patvirtina ir atlikti tyrimai skirtingose pasaulio šalyse (70).

Apibendrinant, *Acinetobacter baumannii* yra vis svarbesni hospitaliniai patogenai, galintys greitai prisitaikyti prie ligoninės aplinkos. Nėra jokių abejonių, kad šie organizmai ateityje kels dar daugiau problemų, dėl nuolat didėjančio atsparumo įvairiems antibiotikams. Šių organizmų plitimo suvaržymui reikalingas kontrolės priemonių rinkinys. Sėkminga infekcijų kontrolė buvo nustatyta keliose sveikatos priežiūros įstaigose (71) tačiau, kuomet *A. baumannii* infekcijos tapo endeminės, sveikatos priežiūros įstaigose tampa vis sunkiau taikyti veiksmingą gydymą. Dėl šios priežasties ankstyvas atpažinimas, agresyvi infekcijų plitimo kontrolė ir endeminių padermių atsiradimo prevencija yra labai svarbios prevencijos priemonės. Šių infekcijų kontrolė yra labai svarbi, ypač atsižvelgiant į *A. baumannii* gebėjimą sukelti protrūkius. *A. baumannii* protrūkių kontrolės strategijos turėtų apimti aktyvų padermių stebėjimą, aplinkos stebėjimo kultūrą, geresnę rankų higieną, aplinkos valymą ir dezinfekavimą, kohortų slaugą, pacientų izoliavimą vienviečiuose kambariuose, prieigos prie intensyvios terapijos skyrių apribojimą, tinkamą antibiotikų naudojimą ir reguliarių skyrių uždarymą valymui ir dezinfekacijai (72). Todėl reikia nedelsiant imtis veiksmų, kad *A. baumannii* infekcijoms būtų užkirstas kelias ir kontroliuojama tolesnė atsparumo antibiotikams plėtra. Naujų antibiotikų, skirtų *A. baumannii* infekcijai, moksliniai tyrimai ir plėtra turėtų būti skatinami.

Išvados

1. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninėje Kauno klinikose 2018 metais didžiausias *A. baumannii* infekcijų dažnis buvo nustatytas Centriniam intensyvios terapijos skyriuje, mažiausias – Širdies chirurgijos intensyvios terapijos skyriuje.
2. Nustatyta, jog iš penkiasdešimt tirtų *A. baumannii* izoliatų, dvidešimt penki sintetina Amp-C β -laktazames ir du izoliatai sintetina ESBL ir Amp-C. Daugiausia Amp-C sintetinančių izoliatų nustatyta Centriniam intensyvios terapijos skyriuje. Nustatyta, jog visi tirti izoliatai sintetina KPC karbapenemazę.
3. Lyginant *A. baumannii* izoliatų atsparumą skirtinguose intensyvios terapijos skyriuose, nustatyta, jog didžiausias atsparumas pasirinktiems antibiotikams pastebimas Centriniam intensyvios terapijos skyriuje, o mažiausiu atsparumu pasižymi izoliatai surinkti klinikų Neurochirurgijos intensyvios terapijos skyriuje.
4. Atlikus jautrumo antibiotikams testą *A. baumannii* izoliatams ir palyginus gautus rezultatus su šių bakterijų sintetinamomis β -laktazamėmis ir karbapenemazėmis, nustatyta tiesioginė koreliacija tarp sintetinamų fermentų ir atsparumo atitinkamoms antibiotikų grupėms.
5. Atliekant infekuotų asmenų amžiaus analizę, papildomai pastebėta, jog *A. baumannii* infekcijos dažniau identifikuojamos vyresnio amžiaus asmenims. Dėl šios priežasties išskirtos dvi amžiaus grupės iki 65 metų asmenys ir vyresni. Nustatyta, jog vyresnio amžiaus žmonių infekcijoms būdingas didesnis atsparumas visiems tirtiems antibiotikams, tokia pati tendencija pastebima ir užsienyje atliktuose tyrimuose.

Literatūros sąrašas

1. ABRAHAM, E.P. - CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* [interaktyvus]. 1940. Vol. 146, no. 3713, p. 837. [žiūrėta 2019 m. kovo 10 d.]. ISSN 1476-4687. Prieiga per: doi.org/10.1038/146837a0.
2. FOURNIER, P.-E. et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS genetics*. 2006. Vol. 2, no. 1, p. e7. ISSN 1553-7404.
3. SCOLA, B. LA et al. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *Journal of clinical microbiology*. 2006. Vol. 44, no. 3, p. 827–832. ISSN 0095-1137.
4. BAUMANN, P. et al. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of bacteriology*. 1968. Vol. 95, no. 5, p. 1520–1541. ISSN 0021-9193.
5. J. M. BOUVET, P. - GRIMONT, P. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and . *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986. Vol. 36, p. 228-240
6. CARR, E.L. et al. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003. Vol. 53, no. Pt 4, p. 953–963. ISSN 1466-5026.
7. NAPIER, B.A. et al. Clinical use of colistin induces cross-resistance to host antimicrobials in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*. 2013. Vol. 4, no. 3, p. 121-131. ISSN 2150-7511.
8. ANTUNES, L.C.S. et al. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and disease*. 2014. Vol. 71, no. 3, p. 292–301. ISSN 2049-632X.
9. PELEG, A.Y. et al. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008. Vol. 21, no. 3, p. 538–582. ISSN 0893-8512.
10. CONSTANTINIU, S. et al. Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. Strains isolated from hospital units. *The Journal of Preventive Medicine*. 2004. Vol. 12, p. 35–42.
11. ROSSAU, R. et al. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991. Vol. 41. ISSN 0020-7713.
12. VANECHOUTTE, M. et al. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of clinical microbiology*. 1995. Vol. 33, no. 1, p. 11–15. ISSN 0095-1137.
13. LU, J.J. et al. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal of clinical microbiology*. 2000. Vol. 38, no. 6, p. 2076–2080. ISSN 0095-1137.
14. JANSSEN, P. et al. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *International journal of systematic bacteriology*. 1997. Vol. 47, no. 4, p. 1179–1187. ISSN 0020-7713.
15. BOUCHET, V. et al. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clinical microbiology reviews*. 2008. Vol. 21, no. 2, p. 262–73. ISSN 1098-6618.
16. DOLZANI, L. et al. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. *Journal of clinical microbiology*. 1995. Vol. 33, no. 5, p. 1108–1113. ISSN 0095-1137.

17. CHANG, H.C. et al. Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *Journal of clinical microbiology*. 2005. Vol. 43, no. 4, p. 1632–1639. ISSN 0095-1137.
18. KARAH, N. et al. Novel Aminoglycoside Resistance Transposons and Transposon-Derived Circular Forms Detected in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016. Vol. 60, no. 3, p. 1801–1818. ISSN 1532-2084.
19. ECKER, J.A. et al. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2006. Vol. 44, no. 8, p. 2921–2932. ISSN 0095-1137.
20. ROMERO-GOMEZ, M.-P. et al. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective. *The Journal of infection*. 2012. Vol. 65, no. 6, p. 513–520. ISSN 1532-2742.
21. HERITIER, C. et al. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006. Vol. 12, no. 2, p. 123–130. ISSN 1198-743X.
22. TURTON, J.F. et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters*. 2006. Vol. 258, no. 1, p. 72–77. ISSN 0378-1097.
23. VILA, J. et al. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007. Vol. 59, no. 6, p. 1210–1215. ISSN 0305-7453.
24. COYNE, S. et al. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011. Vol. 55, no. 3, p. 947–953. ISSN 1098-6596.
25. POOLE, K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2002. Vol. 3, no. 2, p. 77–98. ISSN 1389-2010.
26. YOON, E.-J. et al. RND-type efflux pumps in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role for AdeABC overexpression and AdeRS mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013. Vol. 57, no. 7, p. 2989–2995. ISSN 1098-6596.
27. DAMIER-PIOLLE, L. et al. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008. Vol. 52, no. 2, p. 557–562. ISSN 0066-4804.
28. ROSENFELD, N. et al. Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdeIJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012. Vol. 56, no. 5, p. 2504–2510. ISSN 1098-6596.
29. YOON, E.-J. et al. Contribution of the Ade Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pumps to Fitness and Pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *mBio*. 2016. Vol. 7, no. 3. ISSN 2150-7511.
30. SU, X.-Z. et al. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. Vol. 49, no. 10, p. 4362–4364. ISSN 0066-4804.
31. NI, W. et al. Effects of Efflux Pump Inhibitors on Colistin Resistance in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016. Vol. 60, no. 5, p. 3215–3218. ISSN 1098-6596.

32. YANG, H. et al. Characterization and distribution of drug resistance associated beta-lactamase, membrane porin and efflux pump genes in MDR *A. baumannii* isolated from Zhenjiang, China. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015. Vol. 8, no. 9, p. 15393–15402. ISSN 1940-5901.
33. BONOMO, R.A. - SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006. Vol. 43 Suppl 2, p. S49-56. ISSN 1537-6591.
34. SEN, B. - JOSHI, S.G. Studies on *Acinetobacter baumannii* involving multiple mechanisms of carbapenem resistance. *Journal of applied microbiology*. 2016. Vol. 120, no. 3, p. 619–629. ISSN 1365-2672.
35. SUN, C. et al. Mutant prevention concentrations of levofloxacin, pazufloxacin and ciprofloxacin for *A. baumannii* and mutations in *gyrA* and *parC* genes. *The Journal of antibiotics*. 2015. Vol. 68, no. 5, p. 313–317. ISSN 0021-8820.
36. KARAH, N. et al. Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2012. Vol. 15, no. 4, p. 237–247. ISSN 1098-6596.
37. POTRON, A. et al. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*. 2015. Vol. 45, no. 6, p. 568–585. ISSN 1872-7913.
38. NOWAK, P. - PALUCHOWSKA, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia histochemica et cytobiologica* . 2016. Vol. 54, no. 2, p. 61–74. ISSN 1897-5631.
39. WELDHAGEN, G.F. et al. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003. Vol. 47, no. 8, p. 2385–2392. ISSN 0066-4804.
40. HALL, B.G. - BARLOW, M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. [interaktyvus]. 2005. Vol. 55, no. 6, p. 1050–1051. [žiūrėta 2019 m. vasario 18 d.]. ISSN 0305-7453. Prieiga per: doi.org/10.1093/jac/dki130.
41. WANG, H. et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007. Vol. 51, no. 11, p. 4022–4028. ISSN 0066-4804.
42. NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008. Vol. 52, no. 4, p. 1257–1263. ISSN 0066-4804.
43. NORDMANN, P. et al. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*. 2012. Vol. 18, no. 5, p. 263–272. ISSN 1471-499X.
44. BOU, G. - MARTINEZ-BELTRAN, J. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000. Vol. 44, no. 2, p. 428–432. ISSN 0066-4804.
45. POIREL, L. et al. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future microbiology*. 2007. Vol. 2, no. 5, p. 501–512. ISSN 1198-743X.
46. POIREL, L. - NORDMANN, P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the*

- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006. Vol. 12, no. 9, p. 826–836. ISSN 1746-0921.
47. D'AREZZO, S. et al. Changing carbapenemase gene pattern in an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lineage causing multiple outbreaks in central Italy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011. Vol. 66, no. 1, p. 54–61. ISSN 1460-2091.
 48. ZAVASCKI, A.P. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert review of anti-infective therapy*. 2010. Vol. 8, no. 1, p. 71–93. ISSN 1744-8336.
 49. HUJER, K.M. et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006. Vol. 50, no. 12, p. 4114–4123. ISSN 0066-4804.
 50. PARK, Y.K. et al. Transcriptomic analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant isolates identifies genes associated with colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015. Vol. 21, no. 8, p. 765.e1–7. ISSN 1469-0691.
 51. GOOSSENS, H. European status of resistance in nosocomial infections. *Chemotherapy*. 2005. Vol. 51, no. 4, p. 177–181. ISSN 0009-3157.
 52. BERGOGNE-BÉRÉZIN, E. - TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical microbiology reviews*. 1996. Vol. 9, no. 2, p. 148–165. ISSN 0893-8512.
 53. LIVERMORE, D.M. The threat from the pink corner. *Annals of medicine*. 2003. Vol. 35, no. 4, p. 226–234. ISSN 0785-3890.
 54. VILLEGAS, M.V. - HARTSTEIN, A.I. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infection control and hospital epidemiology*. 2003. Vol. 24, no. 4, p. 284–295. ISSN 0899-823X.
 55. BARBOLLA, R.E. et al. Identification of an epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires City. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2003. Vol. 45, no. 4, p. 261–264. ISSN 0732-8893.
 56. DETTORI, M. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit. *The new microbiologica*. 2014. Vol. 37, no. 2, p. 185–191. ISSN 1121-7138.
 57. GARCIA-GARMENDIA, J.L. et al. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001. Vol. 33, no. 7, p. 939–946. ISSN 1058-4838.
 58. WILSON, S.J. et al. Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. *American journal of infection control*. 2004. Vol. 32, no. 6, p. 342–344. ISSN 0196-6553.
 59. TÄRNBERG, M. et al. Antimicrobial activity against a global collection of skin and skin structure pathogens: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.), 2010–2014. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016. Vol. 49, p. 141–148. ISSN 1201-9712.
 60. ASSESSMENT, R.R. Targeting patients at high risk for carriage of carbapenem-resistant *A. baumannii* Preventing transmission from patients known to carry carbapenem-resistant *A. baumannii* Specific recommendations for outbreak settings. In [interaktyvus]. 2016. Vol. 2015, no. February 2017. [žiūrėta 2019 m. kovo 15 d.] Prieiga per internetą:

- <[https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/8-Dec-2016-RRA-Acinetobacter baumannii-Europe.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/8-Dec-2016-RRA-Acinetobacter_baumannii-Europe.pdf)>.
61. Atlas Ronald and Snyder James *Handbook of Media for Clinical and Public Health Microbiology*. Jungtinės Amerikos Valstijos. CRC Press. 2014. p.324-325. ISBN 9781466582927.
 62. SCHAU, H.-P. J. F. MacFaddin, Media for Isolation - Cultivation - Identification - Maintenance of Medical Bacteria. *Journal of Basic Microbiology* [interaktyvus]. 1986. Vol. 26, no. 4, p. 240. [žiūrėta 2014 m. kovo 18 d.]. ISBN: 0-683-05316-7 Prieiga per internetą: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jobm.3620260414>>.
 63. SHAYAN, S. - BOKAEIAN, M. Detection of ESBL- and AmpC-producing E. coli isolates from urinary tract infections. *Advanced biomedical research*. 2015. Vol. 4, p. 220. ISSN 2277-9175.
 64. GEORGIOS, M. et al. Phenotypic and Molecular Methods for the Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram Negative Nosocomial Pathogens. SAXENA, S.K.Sud. *Trends in Infectious Diseases* [interaktyvus]. Rijeka: IntechOpen, 2014. [žiūrėta 2014 m. kovo 18 d.]. Prieiga per internetą: <<https://doi.org/10.5772/57582>>.
 65. SINGLA, P. et al. Co-production of ESBL and AmpC β -Lactamases in Clinical Isolates of A. baumannii and A. lwoffii in a Tertiary Care Hospital From Northern India. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014. Vol. 8, no. 4, p. DC16-9. ISSN 2249-782X.
 66. MOHD RANI, F. et al. Acinetobacter spp. Infections in Malaysia: A Review of Antimicrobial Resistance Trends, Mechanisms and Epidemiology. *Frontiers in microbiology*. 2017. Vol. 8, p. 2479. ISSN 1664-302X .
 67. LIN, M.-F. - LAN, C.-Y. Antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii: From bench to bedside. *World journal of clinical cases*. 2014. Vol. 2, no. 12, p. 787–814. ISSN 2307-8960.
 68. HUANG, H. et al. A multi-center study on the risk factors of infection caused by multi-drug resistant Acinetobacter baumannii. *BMC infectious diseases*. 2018. Vol. 18, no. 1, p. 11. ISSN 1471-2334.
 69. SENGSTOCK, D.M. et al. Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: an emerging pathogen among older adults in community hospitals and nursing homes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010. Vol. 50, no. 12, p. 1611–1616. ISSN 1537-6591.
 70. FOURNIER, P.E. - RICHEL, H. The epidemiology and control of Acinetobacter baumannii in health care facilities. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006. Vol. 42, no. 5, p. 692–699. ISSN 1537-6591.
 71. JONG, G. DE et al. Back to basics--optimizing the use of available resources during an outbreak of multi-drug resistant Acinetobacter spp. *Journal of Hospital Infection*. 2006 Vol. 57:186-190. ISSN 0195-6701.
 72. COOKSON B. Working party guidance on the control of multi-resistant Acinetobacter outbreaks. *Journal of Hospital Infection*. 2006. Vol. 64, no. 3, p. 312. ISSN 0195-6701.