

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

**BIOFILMAS UN METALLO- β -LAKTAMĀZES PRODUCĒŠANAS NOTEIKŠANA
PSEUDOMONAS AERUGINOSA UN *ACINETOBACTER BAUMANNII* BAKTĒRIJU
CELMOS**

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Linda Alksne**

Studenta apliecības Nr.: 1a18049

Darba vadītāja: Dr. med. Iveta Līduma

RĪGA 2020

ANOTĀCIJA

Pseudomonas aeruginosa un *Acinetobacter baumannii* metallo- β -laktamāžu producēšana ir kļuvusi par pieaugošu terapeitisko problēmu visā pasaulē, kā arī antibiotiku rezistentiem celmiem ir spēja veidot noturīgākas biofilmas, kas rada problēmas šo patogēnu izraisīto infekciju ārstēšanā.

Darba mērķis: noteikt *Pseudomonas aeruginosa* un *Acinetobacter baumannii* spēju veidot biofilmas, producēt metallo- β -laktamāzes, kā arī statistiski apkopot datus par jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem starp 2017. gadu un 2019. gadu, un veikt rezistences izmaiņas salīdzinājumu.

Uzdevumi: identificēt no elpceļiem iegūtos izolātus ar *BBL*TM *Crystal*TM sistēmu, kā arī ar *GenoType*[®] *BC gramnegative* testu, veikt antibakteriālo līdzekļu jutības testus un noteikt metallo- β -laktamāžu producēšanu, izmantojot *Bauer – Kirby*TM disku difūzijas testu, *E*TM – testu, apkopot fenotipus pēc antibiogrammām, veikt statistisko analīzi izmantojot *MS Excel 2016*.

Rezultāti: 2019. gadā *P. aeruginosa* izolātiem (n=75) pret ciprofloksacīnu noteikta vislielākā rezistence - 17,33% (n=13). 2019. gadā *A. baumannii* izolātiem (n=20) vislielākā rezistence noteikta pret ceftazidīmu - 55% (n=11). Salīdzinot 2017. gadu ar 2019. gadu, *A. baumannii* rezistences palielināšanas visbiežāk tika noteikta pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu, kas ir attiecīgi 8,78% un 11,67%, kas liecina par metallo- β -laktamāžu producēšanu. *P. aeruginosa* novērota rezistences palielināšanās pret ciprofloksacīnu, kas ir 6,56%. 2019. gadā *P. aeruginosa* kombinētā rezistence tika konstatēta 9,33 % gadījumā (n=6). 2019. gadā *A. baumannii* kombinētā rezistence tika konstatēta 45% gadījumā (n=9). No 15 *P. aeruginosa* izolātiem 9 veido biofilmas, kas ir 60%, un no 12 *A. baumannii* izolātiem 8 veidoja biofilmas, kas ir 66,67%. Bioplēves veidošanās pozitīvi korelēja ar MBL producēšanu.

Atslēgas vārdi: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, antibakteriālie līdzekļi, metallo- β -laktamāzes, biofilmas, antibiotiku rezistence

ABSTRACT

The production of metallo- β lactamases by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* has become a growing therapeutic problem worldwide, and antibiotic-resistant strains have the ability to produce more stable biofilms, which poses problems in the treatment of infections caused by these pathogens.

Aim of the study: to determine the ability of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* to form biofilms, to produce metallo- β -lactamases, as well as to statistically collect data on antibacterial susceptibility between 2017 and 2019, and to compare the change in resistance.

Tasks: to identify airway isolates with *BBL*[™] *Crystal*[™] system, as well as with *GenoType*[®] *BC gramnegative* test, to perform antibacterial susceptibility tests and to determine metallo- β -lactamase production using *Bauer – Kirby*[™] disc diffusion test, E[™] - test, to summarize phenotypes according to antibiograms, to perform statistical analysis using *MS Excel 2016*.

Results: In 2019, *P. aeruginosa* isolates (n = 75) had the highest resistance to ciprofloxacin - 17.33% (n = 13). In 2019, *A. baumannii* isolates (n = 20) had the highest resistance to ceftazidime - 55% (n = 11). Comparing 2017 with 2019, increases in *A. baumannii* resistance were most commonly detected against carbapenems - imipenem and meropenem, which are 8.78% and 11.67% respectively, indicating production of metallo- β -lactamases. An increase in resistance to ciprofloxacin of 6.56% was observed in *P. aeruginosa*. In 2019, combined resistance of *P. aeruginosa* was observed at 9.33% (n = 6). In 2019, the combined resistance of *A. baumannii* was observed at 45% (n = 9). Of the 15 *P. aeruginosa* isolates, 9 formed (60%) biofilms and 8 (66.67%) of the 12 *A. baumannii* isolates formed biofilms. Biofilm formation positively correlated with MBL production.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, antibacterial agents, metallo- β -lactamases, biofilms, antibiotic resistance

SATURS

ANOTĀCIJA.....	2
ABSTRACT	3
APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS.....	9
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	11
1.1. Baktēriju raksturojums.....	11
1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.1.1.1. Virulences faktori	12
1.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	14
1.1.1.2. Virulences faktori	15
1.2. Biofilmas.....	17
1.2.1. <i>P. aeruginosa</i> veidotās biofilmas	18
1.2.2. <i>A. baumannii</i> veidotās biofilmas	21
1.3. Antibakteriālā terapija	24
1.3.1. β -laktāma antibiotikas	24
1.3.2. Aminoglikozīdi	25
1.3.3. Fluorohinoloni	25
1.3.4. Kolistīns	25
1.4. Rezistences mehānismi	25
1.4.1. Rezistence pret aminoglikozīdiem	26
1.4.2. Rezistence pret fluorohinoloniem	26
1.4.3. Rezistence pret kolistīnu	26
1.4.4. Rezistence pret β -laktamāmiem	27
1.4.4.1. Metallo- β -laktamāzes	29
2. METODES UN MATERIĀLI.....	34
2.1. Materiāli.....	35

2.1.1. <i>P. aeruginosa</i> un <i>A. baumannii</i> izolāti	35
2.1.2. Antibakteriālie līdzekļi.....	35
2.1.3. Darbā izmantotās barotnes un reaģenti.....	35
2.1.4. Trauki un aparatūra.....	37
2.2. Metodes.....	39
2.2.1. <i>BBL</i> TM <i>Crystal</i> TM identifikācijas sistēma	39
2.2.2. <i>GenoType</i> [®] <i>BC gramnegative</i> tests	39
2.2.2.1. DNS ekstrakcija	39
2.2.2.2. Amplifikācija	39
2.2.2.3. Hibridizācija	40
2.2.3. <i>Bauer – Kirby</i> TM disku difūzijas tests	41
2.2.4. E TM -tests	42
2.2.5. Fenotipēšana izmantojot antibiogrammas	43
2.2.6. Biofilmas producēšanās noteikšana	43
2.2.7. Datu statistiskā analīze	44
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	45
SECINĀJUMI.....	81
PATEICĪBAS.....	82
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	83

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AAC - aminoglikozīdu acetiltransferāze

ADF- adenoīna difosfāts

AHL- acilhomoserīna laktons

Bap -ar bioplēvi saistītais proteīns

cAMP - cikliskais adenoīnmonofosfāts (no angļu val.- cyclic adenosine monophosphate)

CF – cistiskā fibroze

cikliskā diGMP - cikliskā-3'5'-diguānīlskābe

CU - šaperonu-ievēdējs (no angļu val. - *Chaperone – usher*)

DNS- dezoksiribonukleīnskābe

EARS-NET – Eiropas Antibakteriālās Rezistences Uzraudzības Datubāze European (no angļu val. -Antimicrobial Resistance Surveillance Network)

EPS- ekstracelulārās polimēru vielas (no angļu val.- extracellular polymeric substances)

ES/EEZ – Eiropas Savienība/ Eiropas Ekonomikas zona

ESBL - paplašināta spektra β-laktamāzes (no angļu val. - extended spectrum β lactamase)

ETA - eksotoksīns A

ExoS - eksoenzīms S

ExoT - eksoenzīms T

ExoU- eksotoksīns U

ExoY- eksoenzīms Y

FIM - Florences imipenemāzes tipa metallo-β laktamāzes

Fur -dzelzs uzņemšanas regulatoru (no angļu val.- ferric uptake regulator)

g- grami

HlyD - hemolizīna sekrēcijas proteīna D

HPLC- hemolītiskā fosfolipāze C

I – vidēji jutīgs (no angļu val. - intermediate)

IL-6 – interleikīns 6

IL-8 – interleikīns 8

IMP – imipenemāzes tipa metallo-β laktamāzes

iNOS - slāpekļa oksīda sintāzes

iNOS- slāpekļa oksīda sintāze

LipA – lipāze A

LipC – lipāze C

LPS – lipopolisaharīdi

MBL - metallo-β laktamāzes

MDR – multizāļu rezistents (no angļu val. – multi-drug resistant)

MIK - minimālā inhibējošā koncentrācija

ml – mililitri

mm – milimetri

n- skaits

NAD (P) H – nikotīnamīdadenīdinukleotīdfosfāts

ncRNS - nekodēta ribonukleīnskābe

NDM – Ņūdēlī tipa metallo- β laktamāzes (no angļu val. - New Delhi metallo-β-lactamase)

OMP- ārējās membrānas proteīns (no angļu val. – outer membrane protein)

OMV - ārējās membrānas vezikuli (no angļu val.- outer membrane vesicle)

OXA – oksacilīnus hidrolizējošas β –laktamāzes

PNAG - poli- (1-6) -nacetilglikozamīnu

Ptk - proteīna tirozīna kināze

PVO - Pasaules Veselības organizācija

QS – kvoruma sajūtas sistēma (no angļu val.- quorum sensing system)

R – rezistents (no angļu val. – resistant)

RND - rezistences-nodalījuma-sadalījuma grupu

RNS - ribonukleīnskābe

S – jutīgs (no angļu val. – susceptible)

SPM – Sanpaulu tipa metallo-β laktamāze (no angļu val.- Sao Paulo metallo-β-lactamase)

T1SS - I tipa sekrēcijas sistēma

T2SS- II tipa sekrēcijas sistēma

T3SS – III tipa sekrēcijas sistēma

T5SS- V tipa sekrēcijas sistēma

TEM – temoniera β-laktamāze

TLR2 - Toll līdzīgā receptora 2

TLR4 - toll-līdzīgais receptors - 4

TNF – α - tumora nekrozes faktors alfa

VIM - Veronas integrīna kodētā tipa metallo-β laktamāzes (no angļu val.- Verona integron-encoded metallo-β-lactamase)

μl –mikrolitri

μm-mikrometri

IEVADS

Vieni no galvenajiem ar veselības aprūpi saistīto infekciju izraisītājiem ir gramnegatīvās aerobās *Pseudomonas aeruginosa* un *Acinetobacter baumannii* baktērijas, it īpaši multizāļu rezistentie celmi. Multizāļu rezistentu baktēriju infekcijas pacientiem ir cieši saistītas ar augstu mirstību, ilgstošu hospitalizāciju, vairākām saslīmšanām un palielinātām izmaksām, kā arī ierobežoto antibakteriālo terapijas iespēju. Visā pasaulē aptuveni 45% no visiem *A. baumannii* izolātiem tiek uzskatīti par multirezistentiem (MDR-*multidrug resistant*), un Latīņamerikā un Tuvajos Austrumos šis rādītājs sasniedz pat 70%. Šie MDR rādītāji ir gandrīz četras reizes lielāki nekā *P. aeruginosa* (Reena AAA *et al.*, 2017).

P. aeruginosa un *A. baumannii* izraisa vairākus infekcijas veidus, ieskaitot pneimoniju, meningītu, septicēmiju un urīnceļu infekciju. Abiem šiem organismiem ir liels bioplēves veidošanas potenciāls, kas varētu izskaidrot to palielināto rezistenci pret antibiotikām, izdzīvošanas īpašībām un paaugstinātu virulenci. Šiem nozokomiālajam patogēniem ir dažādi rezistences mehānismi pret antibakteriālajiem līdzekļiem, kā piemēram, paplašināta spektra β laktamāzes un metallo- β laktamāzes (MBL), porīnu mutācijas, plazmīdu enzimatiskās modifikācijas, DNS girāzes mutācija un efluksa sūkņi (Ochoa *et al.*, 2015). Karbapenēmi (imipenēms un meropenēms) ir vieni no pirmajām antibakteriālo līdzekļu izvēlēm *P. aeruginosa* un *A. baumannii* izraisītu infekciju ārstēšanai. Rezistenci pret karbapenēmiem rada ārējās membrānas proteīna (porīna) OprD zudums, paaugstināta efluksa sūkņu (MexAB-OprD) ekspresija, kā arī metallo- β laktamāžu producēšana, kas ir kļuvusi par pieaugošu terapeitisko problēmu visā pasaulē (Kapoor *et al.*, 2017).

Pasaules Veselības organizācija (PVO) 2017. gadā karbapenēmu rezistentu *A. baumannii* klasificēja kā galveno 1. prioritātes kritiskās grupas organismiem, bet karbapenēmu rezistentā *P. aeruginosa* ir otrā baktērija, kas ir klasificēta arī kā pirmās prioritātes kritiskās grupas organisms, kas nozīmē, ka steidzami ir nepieciešams izstrādāt jaunas antibiotikas, kas būtu efektīvas baktēriju izraisīto infekciju ārstēšanā (World Health Organization, 2017).

Maģistra darba mērķis: noteikt *Pseudomonas aeruginosa* un *Acinetobacter baumannii* spēju veidot biofilmas, to spēju producēt metallo- β -laktamāzes, kā arī statistiski apkopot datus par jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem starp 2017. gadu un 2019. gadu, un veikt rezistences izmaiņas salīdzinājumu.

Atbilstoši darba mērķim izvirzīti sekojoši **uzdevumi**:

1. *P. aeruginosa* un *A. baumannii* identificēšana ar *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēmas metodi, kā arī veicot polimerāzes ķēdes reakciju, izmantojot *GenoType® BC gramnegative* testu.
2. Veicot *Bauer – Kirby™* disku difūzijas testu, kā arī *E™* – testu, noteikt identificētajiem *P. aeruginosa* un *A. baumannii* metallo- β -laktamāzes producēšanu
3. Noteikt *P. aeruginosa* un *A. baumannii* paraugu spēju veidot biofilmas, izmantojot mikrotitru plates metodi.
4. Apkopot datus un veikt statistisko analīzi par *P. aeruginosa* un *A. baumannii* jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem, kā arī veikt antibakteriālo līdzekļu rezistences izmaiņas salīdzinājumu starp 2017. gadu un 2019. gadu. Datus apstrādāt ar *Microsoft Excel 2016*.
5. Identificēto *P. aeruginosa* un *A. baumannii* celmu fenotipēšana, izmantojot antibiogrammas.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Baktēriju raksturojums

1.1.1. *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ir gramnegatīva nūjiņveida baktērija, kuras izmērs ir no 1,5 līdz 3,0 μm. *P. aeruginosa* ir nefermentējoša, kustīga, katalāzes un oksidāzes pozitīva. Gandrīz visi celmi ir kustīgi, izmantojot vienu polāro viciņu, bet dažiem celmiem ir divas vai trīs viciņas (sk.1.1. att.). Lielākā daļa *P. aeruginosa* celmu rada vienu vai vairākus pigmentus, ieskaitot piocianīnu (zili zaļš), pioverdīnu (dzeltenīgi zaļš un fluorescējošs) un piorubīnu (sarkanbrūns), piomelanīnu (melnā krāsā) (Moradali *et al.*, 2017).



1.1. att. *P. aeruginosa*

Attēls no Centers for Disease Control and Prevention [tiešsaiste] –(atsauce 2020. gads).
Pieejams internetā: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>

P. aeruginosa labi aug temperatūrā no 25 ° C līdz 37 ° C (LaBauve *et al.*, 2012). Baktērija labi aug uz neselektīvajām barotnēm, kā piemēram, uz triptona sojas agara, *Columbia* asins agara, vai uz selektīvas barotnes, kā piemēram, uz *MacConkey* agara. Tā kā *P. aeruginosa* producē hemolizīnu, uz asins agara platēm var novērot hemolīzi (sk.1.2.att.). *P.aeruginosa* kolonijām ir raksturīgs metāliskais spīdums un tās ir mukoīdas. Izmantojot selektīvu barotni – cetrimīda agara, cetrimīds veicina *P. aeruginosa* pigmentu - piocianīna un pioverdīna –veidošanos (Wisplinghoff, 2017). *P. aeruginosa* ir izraisa dažādas nozokomiālās infekcijas, ieskaitot sepsi, pneimoniju, urīnceļu infekcijas un mīksto audu infekcijas. *P. aeruginosa* ir galvenais cistiskās fibrozes (CF) plaušu infekciju izraisītājs un

vissvarīgākais patogēns progresējošas un smagas CF plaušu slimības gadījumā (Bhagirath *et al.*, 2016).



1.2. att. Uz triptona sojas agara (5% asins piedeva) novērotā *P. aeruginosa* hemolīze, autores foto

1.1.1.1. Virulences faktori.

LPS. Tāpat kā citām gramnegatīvām baktērijām, *P. aeruginosa* lipopolisaharīdi (LPS) ir endotoksīni. LPS sastāv no hidrofobā lipīdu A reģiona, centrālā serdes oligosaharīdu reģiona un atkārtojošās O-saistītās polisaharīda daļas. LPS asociētā patogēnēze ir saistīta ar imunomodulatoru molekulu indukciju, kā piemēram, tumora nekrozes faktoru α (TNF $-\alpha$), interleikīnu-1, IL-6, IL-8 un IL-10 (Zowalaty *et al.*, 2015).

Kvoruma sajūtas sistēma. Kā *P. aeruginosa* virulences faktorus var minēt bioplēves, piocianīna, elastāzes un ramnolipīda veidošanos, un tos kontrolē signalizācijas regula, kas pazīstama kā kvoruma sajūtas sistēma (QS - *quorum sensing system*). QS kontrolē baktēriju sociālo uzvedību, izmantojot vairākus savstarpēji saistītus signalizācijas ceļus. Tas ļauj baktēriju kopienām regulēt dažādus bioloģiskos procesus, kas ir svarīgi baktēriju adaptācijai un izdzīvošanai. QS darbība atkarīga no specifisku gēnu komplektu ekspresijas regulēšanas, reaģējot uz signālmolekulām, kas pazīstams kā autoinducētāji. *P. aeruginosa* ir četri galvenie QS atkarīgo signalizācijas ceļi - *las*, *iqs*, *pqs* un *rhl* (Lee and Zhang, 2015). Kā jau minēts, *P. aeruginosa* QS sistēma ietver *las* un *rhl* sistēmas, kas abas sastāv no LuxI tipa sintāzēm (LasI un RhlI), kas producē specifiskas acilhomoserīna laktona (AHL) molekulas, N- (3 oksododekanoil) -L-homoserīna laktonu (3-okso-C12-HSL) un N butanoil-L-homoserīna laktonu (C4-HSL). AHL molekulas saistās ar LuxR tipa receptoriem (LasR un RhlR), veidojot transkripcijas aktivācijas kompleksus, kas regulē dažādu gēnu transkripciju, kas saistīti ar *P. aeruginosa* virulenci (Ahmed *et al.*, 2019).

Sekrēcijas sistēmas. *P. aeruginosa* producē vairākus ekstracelulāros proteīnus, kas pēc sākotnējā kolonizācijas posma var izraisīt plašus audu bojājumus, asinsrites invāziju un izplatīšanos. Kā vienu no ekstracelulāriem virulences faktoriem var minēt sekrēcijas sistēmas (Moradali *et al.*, 2017).

Virulences faktori, kas tiek izdalīti, izmantojot I tipa sekrēcijas sistēmu, ir trīs proteīni - sārmainā proteāze (aeruginolizīns), HasAp un AprX. Aeruginolizīns, kura sintēzi nodrošina *aprA*, noārda audu proteīnus, piemēram, laminīnu, inaktivē imūnsistēmas galvenos komponentus, kā arī tas ir svarīgs faktors audu invāzijai (Wisplinghoff, 2017).

Lielākā daļa ekstracelulārie virulences faktori (LasA un LasB elastāzes, ETA, lipāzes, fosfolipāze C un proteāze IV) tiek izdalīti caur II tipa sekrēcijas ceļu. ETA jeb eksotoksīns A ir viens no toksiskākajiem virulences faktoriem, kas citotoksiski iekļūst saimnieka šūnās, inhibē saimnieka proteīna sintēzi, izraisa šūnu nāvi, audu bojājumus, baktēriju invāziju un imūnsupresiju. *P. aeruginosa* spēja noārdīt elastīnu tiek uzskatīta par galveno virulences faktoru akūtas infekcijas laikā, un šajā procesā ir iesaistītas LasB and LasA elastāzes. LasB inaktivē imūnsistēmas galveno komponentus, kā arī noārda netikai elastīnu, bet arī kolagēnu, fibrīnu (Sawa *et al.*, 2014).

P. aeruginosa producē hemolītisku un nehemolītisku fosfolipāzi C. Tā kā nehemolītiskā fosfolipāzes C formai nav pierādīta patogēna aktivitāte, tad hemolītiskai fosfolipāzei C (HPLC) piemīt citolītiskā aktivitāte, kā arī šūnu membrānas iznīcināšana un audu invāzija. HPLC ierosina iekaisuma mediatoru izdalīšanos no cilvēka trombocītiem, neitrofilēm un bazofiliem, bet samazina IL-8 veidošanos no monocītiem. HPLC hidrolizē fosfatidilholīnu, sfingomielīnu un fosfatidilholīnu (Wisplinghoff, 2017). *P. aeruginosa* producē divas lipāzes (LipA un LipC). Lipāzēm ir nozīme patogēnēzē ar HPLC kopā noārdot galveno plaušu virsmaktīvās vielas lipīdu dipalmitoilfosfatidilholīnu. IV proteāze ir serīna proteāze, kas noārda komplementa komponentus Clq un C3, imūnglobulīnu G, fibrinogēnu, plazmīnu un plazminogēnu (Moradali *et al.*, 2017).

Caur III tipa sekrēcijas ceļu tiek izdalīti eksoenzīms S, eksoenzīms T, eksotoksīns U un eksoenzīms Y. ExoS ir bifunkcionāls toksīns ar GTFāzes aktivējošu un ADF ribosiltransferāzes aktivitāti. Šīs aktivitātes noved pie aktīva citoskeleta darbības pārtraukšanas un apoptozei līdzīgu šūnu nāves (Galle *et al.*, 2012). ExoT ir 76% identisks ExoS, un tam ir arī gan GTFāzi aktivējošas, gan ADF ribosiltransferāzes aktivitāte, bet tomēr ExoT ADF ribosiltransferāzes aktivitāte ir vērsta pret dažādiem substrātiem. Šīs aktivitātes noved pie aktīva citoskeleta darbības pārtraukšanas un apoptozei līdzīgu šūnu nāves. ExoU ir A2 fosfolipāzes aktivitāte, kas izraisa ātru šūnu līzi. ExoY ir adenililciklāze. ExoY izraisa

intracelulāras cAMP koncentrācijas paaugstināšan ās un vairāku gēnu diferenciālu ekspresiju. Šie efekti noved pie palielināta endotēlija caurlaidības (Anantharajah *et al.*, 2016).

Ramnolipīdi. Kā citu ekstracelulāro virulances faktoru var minēt ramnolipīdus, kuru sintēzi nodrošina *rhlAB* operons un *rhlC*. Ramnolipīdi ir ramnozi saturoši glikolipīdu biosurfaktanti, kuriem ir deterģenta līdzīga struktūra, un tiek uzskatīts, ka tās izšķīdina plaušu surfaktantu (Zowalaty *et al.*, 2015).

Citi virulances faktori. Kā citus virulances faktori var minēt piocianīnu, kas ir zils redokss aktīvs fenazīna pigments, kas rada reaktīvās skābekļa formas, pateicoties intracelulāram redokss ciklam. Piocianīnu samazina NAD (P) H, un reducētais pigments reaģē ar molekulāro skābekli, producējot superoksīdu un ūdeņraža peroksidāzi, pakļaujot saimnieka šūnas oksidatīvajam stresam (Hall *et al.*, 2016). Dzelzs ierobežojošos apstākļos *P. aeruginosa* sekretē pioverdīnu, kas ir zaļgandzeltens pigments, un tas konkurē ar transferīnu par dzelzs saistīšanu. Pēc tam dzelzs tiek uzņemts baktērijā, izmantojot specifiskus šūnu virsmas receptorus, piemēram, FpvAII. Kā rezultātā saimniekšūnas mitohondrijiem izjauc to funkciju un izraisa autofāģiju (Kang *et al.*, 2018).

1.1.2. *A.baumannii*

A.baumannii ir 1 līdz 1,5 μm liela kokiem līdzīga gramnegatīva baktērija, kas ir aeroba, nekustīga, nefermentējoša, citohroma oksidāzes, ureāzes negatīva, katalāzes pozitīva (sk.1.3. att.). Baktērija labi aug uz parastajām laboratorijas barotnēm, piemēram, uz asins agara, šokolādes agara un *MacConkey* agara. Piemērotākā temperatūra augšanai ir 20-44°C (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015).



1.3. att. *A. baumannii*

Attēls no Centers for Disease Control and Prevention [tiešsaiste] –(atsauce 2020. gads).
Pieejams internetā: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/acinetobacter.html>

Asins agarā tas veido bezkrāsainas, nehemolītiskas, spīdīgas, gludas mukoīdu kolonijas, ar diametru 1–2 mm pēc 18–24 stundu inkubācijas 37 ° C temperatūrā. Uz triptona sojas agara veido dzeltenas līdz pelēcīgas kolonijas, kas ir 1-2 mm lielumā (Wisplinghoff, 2017). *MacConkey* agarā *A. baumannii* rada bezkrāsainas kolonijas, kurām ir spīdīga mukoīda un ovāla forma, kas norāda uz to, ka tās nespēj fermentēt laktozi. Uz selektīvā agara *Leeds A. baumannii* veido rozā krāsas kolonijas (McConnell *et al.*, 2011).

A.baumannii izraisītās infekcijas ir plaši sastopamas slimnīcu vidē, kas no tām izraisa 26% mirstības līmeni, bet intensīvās aprūpes nodaļās izraisa līdz pat 43 % lielu mirstības līmeni. *A. baumannii* ir galvenais ar ventilatoru-saistītu pneimonijas izraisītājs, kas veido gandrīz 15% no visām slimnīcā iegūtajām infekcijām ar visaugstāko mirstības līmeni īpaši intensīvās aprūpes nodaļās. *A. baumannii* nav tipisks urīntrakta infekciju izraisītājs, bet tas to var izraisīt novājinātiem gados vecākiem pacientiem (Jiménez-Guerra *et al.*, 2018). Tas var izraisīt nozokomiālo meningītu, kā arī keratītu un oftalmītu, kas rodas pēc kontaktlēcu lietošanas un acu operācijas (Wisplinghoff, 2017).

1.1.2.1. Virulences faktori.

Ārējās membrānas proteīni. Viens no izplatītākajiem ārējās membrānas proteīniem (OMP - *outer membrane protein*) ir OmpA. OmpA mijiedarbība ar eikariotu šūnām izraisa citotoksicitāti caur saistīšanos ar eikariotu šūnu tumora nekrozes faktora grupas receptoriem, kas rezultātā izraisa apoptozi. OmpA palielina slāpekļa oksīda sintāzes (iNOS) veidošanos un Toll līdzīgā receptora 2 (TLR2) virsmas ekspresiju epitēlija šūnās, kā rezultātā tiek izraisīta saimnieka šūnu nāve. OmpA spēj pārvietoties uz mitohondriju vai kodolu. Mitohondrijā OmpA inducē proapoptotiskus signālus, aktivizējot Bcl-2 grupas proteīnus, citohroma C izdalīšanos un apoptozi inducējošu faktoru (Hee *et al.*, 2005). OmpA var arī pārvietoties uz kodolu, pateicoties tā paškodētajam kodola lokalizācijas signālam (KTKEGRAMNRR), kura nav citiem *A. baumannii* ārējās membrānas proteīniem, un izraisa saimnieka DNS degradāciju DNāzes I līdzīgā veidā. Papildus citotoksiskajām īpašībām, OmpA modulē virkni citus virulences faktorus, kā piemēram, veicina adhēziju ar ārpusšūnu matricas proteīniem, ieskaitot fibronektīnu, kas ir svarīgs plaušu epitēlija kolonizācijai. Līdzīgi kā OmpA, Omp34 inducē apoptozi eikariotu šūnās, izmantojot no kaspāzes-atkarīgus mehānismus (Morris *et al.*, 2019).

Kapsulārie polisaharīdi un LPS. *A.baumannii* kapsulāro polisaharīdu veidošanos regulē gēnu kopa, ko sauc par K lokusu. Kapsulas polimerizācijai ir nepieciešami divi gēni, kas ir *ptk* (proteīna tirozīna kināze) un *epsA*. Kapsulas producēšana ir negatīvi regulēta ar BfmRS divkomponentu regulatīvo sistēmu, reaģējot uz vides stimuliem, ieskaitot noteiktas

antibiotikas (hloramfenikolu un eritromicīnu), kā rezultātā palielinās ekspresija un baktēriju rezistence (Lee *et al.*, 2016).

LPS ir galvenā ārējās membrānas sastāvdaļa un ir imūnreaktīva molekula, kas inducē tumora nekrozes faktora α un interleikīna-8 atbrīvošanu no makrofāgiem no Toll līdzīga receptora 4 (TLR4) atkarīgā veidā (Lin *et al.*, 2012).

Sekrēcijas sistēmas. *A. baumannii* kodē daudzveidīgu sekrēcijas sistēmu klāstu. I tipa sekrēcijas sistēma (T1SS) ir trīspusēja sistēma, kas piegādā proteīnus no citosola ārpusšūnu vidē, piemēram, RTX (satur RTX toksīna domēnu) un Bap (ar bioplēvi saistītais proteīns) (Morris *et al.*, 2019). II tipa sekrēcijas sistēma (T2SS) ir divpakāpju sekrēcijas mehānisms, kas sekretē efektorproteīnus, kā piemēram, lipāzi, elastāzi, sārmaino fosfatāzi un fosfolipāzi, kas ir svarīgi *A. baumannii* virulencei. Fosfolipāze ir lipolītisks enzīms, kas ir būtisks fosfolipīdu metabolismam, un tas ir virulences faktors daudzām baktērijām tajā skaitā *A. baumannii* (Lee *et al.*, 2016). *A. baumannii* kodē divas fosfolipāzes C un trīs fosfolipāzes D enzīmus, kuriem visiem ir substrāta specifiskums attiecībā pret eikariotu membrānas komponentu – fosfatidilholīnu. Abi enzīmi tiek regulēti ar dzelzs uzņemšanas regulatoru (Fur), un tiem piemīt eritrocītu hemolītiska aktivitāte (Morris *et al.*, 2019). Trīs fosfolipāzes D gēni ir saistīti ar seruma rezistenci, epitēlija šūnu invāziju un *in vivo* patoģenēzi. *A. baumannii* specifiskos T2SS efektorus ietilpst metaloendopeptidāze - CpaA, kas atbild par fibrinogēna un V faktora degradāciju, kā arī lipāzes, LipA un LipH, kas hidrolizē garās ķēdes taukskābes kā oglekļa avotu, ko izmanto baktēriju augšanai (Weber *et al.*, 2017). V tipa sekrēcijas sistēma (T5SS) (autotransportētāji) ir vienkāršākā un izplatītākā gramnegatīvo baktēriju sekrēcijas sistēma. V tipa sekrēcijas sistēmas autotransportētājs Ata nodrošina biofilmas producēšanu, adhēziju ārpusšūnu matricas komponentiem, piemēram, I, III un IV kolagēnam (Lee *et al.*, 2016).

Ārējās membrānas vezikuli. Ārējās membrānas vezikuli ir sfēriskas, 20–200 nm diametra vezikulas, kas sastāv no LPS, ārējās membrānas un periplazmas proteīniem, fosfolipīdiem un DNS vai RNS, un ir atzīti par baktēriju efektoru nesējvielām saimnieka šūnās (Morris *et al.*, 2019). Daudzi *A. baumannii* celmi izdala ārējās membrānas vezikulus, kas satur dažādus virulences faktorus, ieskaitot OmpA, proteāzes un fosfolipāzes. *A. baumannii* ārējās membrānas vezikulas nodrošina plazmīdu izplatīšanu, kas satur karbapenēmu rezistences gēnu - blaNDM-1 (Lee *et al.*, 2016).

1.2. Biofilmas

Pāreja uz nekustīgu dzīvesveidu līdz ar zemāku virulenci ir izdzīvošanas priekšrocība, ar kuras palīdzību daudzas patogēnās baktērijas, tajā skaitā, *P. aeruginosa* un *A. baumannii*, izvairās no stresa un nelabvēlīgiem apstākļiem. Tās zaudē kustīgumu un piestiprinās virsmām un veido šūnu sakopojumus vai mikrokolonijas, kuras sauc par biofilmām. Tās ir izturīgas pret fagocitozi, oksidatīvo stresu, barības vielu, kā arī skābekļa ierobežošanu, sugu savstarpējo konkurenci un antibakteriālajiem līdzekļiem (Moradali *et al.*, 2017). 65–80% cilvēku infekciju izraisa bioplēves veidojošās baktērijas (Yang *et al.*, 2019). Ar bioplēvē saistītas infekcijas ir hroniskas infekcijas, tāpēc to ārstēšanai ir vajadzīgas lielākas antibiotiku devas nekā planktonisko šūnu akūtai infekcijai, kā rezultātā radītā antibakteriālo līdzekļu rezistence ir izraisījusi ilgstošu uzturēšanos slimnīcā, kā arī palielinātu nāves skaita daudzumu (Eze *et al.*, 2018).

Bioplēves izveide ietver 5 soļus: i) brīvi peldošas planktoniskas šūnas; ii) sākotnējā atgriezeniskā piestiprināšanās, kurai seko neatgriezeniska sēdošo šūnu piestiprināšanās; iii) piestiprināto baktēriju turpmāka augšana vai agregācija, kā rezultātā veidojas mikrokolonijas; iv) organizētas struktūras ar atšķirīgu struktūru, kas izriet no mikrokoloniju attīstības; un v) planktonisko baktēriju izkļiedēšana no nobriedušām bioplēvē. Salīdzinot ar planktona šūnām, bioplēves baktērijas ar dažādiem fizioloģiskiem fenotipiem gūst labumu no ģenētiskās adaptācijas, variācijas un stohastiskā gēna maiņas, kā rezultātā palielinās izturība pret apkārtējās vides apstākļiem, antibiotiku infiltrācijas, saimnieka imūnsistēmas šūnām (Chang, 2018).

Biofilmā esošās baktērijas izmanto QS šūnu savstarpējai komunikācijai un noteiktu gēnu ekspresijas regulēšanai. Baktērijās QS pozitīvi regulē gēnus, kas iesaistīti bioplēves nogatavināšanas un noturības progresā. Piemēram, baktēriju celmi ar QS deficītu veido plānas un daudz mazāk attīstītas bioplēves, kas ir jutīgākas pret antibiotikām (Li and Tian, 2012). Bioplēvēs var pastāvēt arī polimikrobu kopienas, un ar tām saistītā ģenētiskā daudzveidība rada sinerģiju starp baktēriju sugām un starp tām bioplēves veidošanās laikā, līdz ar to baktēriju sugu polimikrobiālajai eksistencei ir būtiska ietekme uz infekciju klīnisko ārstēšanu (Pakharukova *et al.*, 2018). Baktērijas polimikrobu kopienās producē vairāk bioplēvju nekā atsevišķi baktērijas sugas. Mikrobu sugas, kurās trūkst viena vai vairāku metabolismam nepieciešamo enzīmu, piemēram, polisaharīdus noārdošie enzīmi, polimikrobu agregācijas laikā var rasties citas baktērijas klātbūtnē, kas producē šādus aktīvos enzīmus (Li and Tian, 2012). Baktēriju bioplēvju spēja izdzīvot augstā antibiotiku koncentrācijā ir saistīta ar tādiem faktoriem kā izmantotā antibiotiku klase infekcijas ārstēšanai, traucēta antibiotiku difūzija, zāļu indifERENCE, bioplēvei raksturīgo gēnu mehānismu ekspresija un “noturīgu šūnu”

klātbūtne, kas veido 0,001% līdz 0,1% populācijas kopu. “Noturīgās šūnas” nav rezistenti mutanti, jo nespēj augt antibiotiku klātbūtnē, bet tiklīdz tiek pārtraukta antibakteriālo līdzekļu lietošana, tās var astākt augšanu, atjaunot bioplēvi un izraisīt infekcijas atkārtosanos (Lebeaux *et al.*, 2014).

1.2.1. *P. aeruginosa* veidotās bioplēves

P. aeruginosa veido mukoīda tipa bioplēves, kuras dominē CF plaušu mikrobu kopienā. Citas ar *P. aeruginosa* biofilmu saistītās infekcijas ir hroniska brūču infekcija, hronisks vidusauss iekaisums, hronisks rinosinusīts, ar katetru saistīta urīnceļu infekcija un ar kontaktlēcām saistīts keratīts (Moradali *et al.*, 2017).

***P. aeruginosa* biofilmas sastāvs.** *P. aeruginosa* veidotās biofilmas ir sēnei līdzīga forma – ar kātiņu un cepurīti. Uz abiotiskām un biotiskām virsmām veidotās biofilmas, kas satur baktēriju šūnas, matrica var būt vairāk nekā 90% no visas bioplēves masas sausās masas. Matricu galvenokārt veido ārpusšūnu (ekstracelulārās) polimēru vielas (EPS), kas galvenokārt ir polisaharīdi, proteīni, ārpusšūnu DNS (eDNS) un lipīdi (Stempel *et al.*, 2013).

Eksopolisaharīdi Psl, Pel un algināts ir galvenās *P. aeruginosa* bioplēves matricas sastāvdaļas, kas ir iesaistītas virsmas adhēzijā, un kopā ar eDNS nosaka bioplēves struktūru. Šiem EPS ir nozīmīga loma antibiotiku rezistencē. Dažādu EPS klātbūtne, kurām ir atšķirīgas fizikāli ķīmiskās īpašības, sniedz bioplēvju fleksibilitātes un stabilitātes palielināšanu zem dažādiem vides apstākļiem (Jennings *et al.*, 2015). Celmos, kas nav mukoīdi, kā galveno matricas strukturālo polisaharīdu var izmantot vai nu Pel, vai Psl (Chang, 2018). Psl polisaharīds ir galvenais elements bioplēves veidošanās agrīnā stadijā - šūnu adhēzijas uz virsmas. Tas iniciē bioplēves veidošanos ar šūnu migrācijas veicināšanu, šūnu-šūnu mijiedarbību un šūnu-virsmas adhēziju. Psl nodrošina tūlītēju aizsargājošu lomu pret anti-biofilmu līdzekļiem un plaša spektra antibiotikām, it īpaši bioplēves attīstības agrīnā stadijā. Līdzīgi kā Psl, Pel ir svarīgs, lai iniciētu un uzturētu šūnu -šūnu mijiedarbību bioplēvēs, kā arī Pel aizsargā baktērijas pret noteiktām aminoglikozīdu grupas antibiotikām (Colvin *et al.*, 2012).

Eksopolisaharīda algināta pārprodukcija ir raksturīga lielākajai daļai CF pacientu klīnisko izolātu mukoīdā fenotipa. Pielāgojoties CF plaušu videi, algināts tiek pārmērīgi producēts un galvenokārt veido nobriedušu bioplēvju matricu, kas piešķir mukoīdu vai nemukoīdu fenotipu. Tas ir ļoti svarīgs bioplēves nobriešanā, struktūras stabilitātē un aizsardzībā, kā arī noturībā, aizsargājot *P. aeruginosa* šūnas pret fagocitozi, brīvajiem radikāļiem, kas izdalās no imūnšūnām, un ārstēšanā izmantotajām antibiotikām (Moradali *et al.*, 2015). Kā jau iepriekš minēts, *P. aeruginosa* biofilmā var būt gan mukoīdais, gan

nemukoīdas fenotips. Kamēr mukoīdās, alginātu hiperproducējošas šūnas nodrošina biofilmas izdzīvošanu, šūnām, kas nav mukoīdas, varētu būt aizsargājoša loma pret antibiotikām. Bioplēves šūnās var būt atšķirīgs jutīgums pret antibakteriāliem līdzekļiem atkarībā no vietas, kur katra atsevišķa baktēriju šūna atrodas vairākkārtējā bioplēves slānī (Malhotra *et al.*, 2018). Izolātiem, kas nav mukoīdi, ir lielāka spēja producēt β -laktamāzes, un tie ir pakļauti relatīvi augstākam antibiotiku selektīvajam spiedienam nekā mukoīdu tips. β -laktamāze, ko rada virsējais slānis bioplēvē, spēs inaktivēt β -laktāmu pirms nonākšanas dziļajos slāņos. Rezistence pret hinoloniem un aminoglikozīdiem bija ievērojami augstāka *P. aeruginosa* izolātos, kas nav mukoīdi nekā mukoīdos tipos (Owlia *et al.*, 2014).

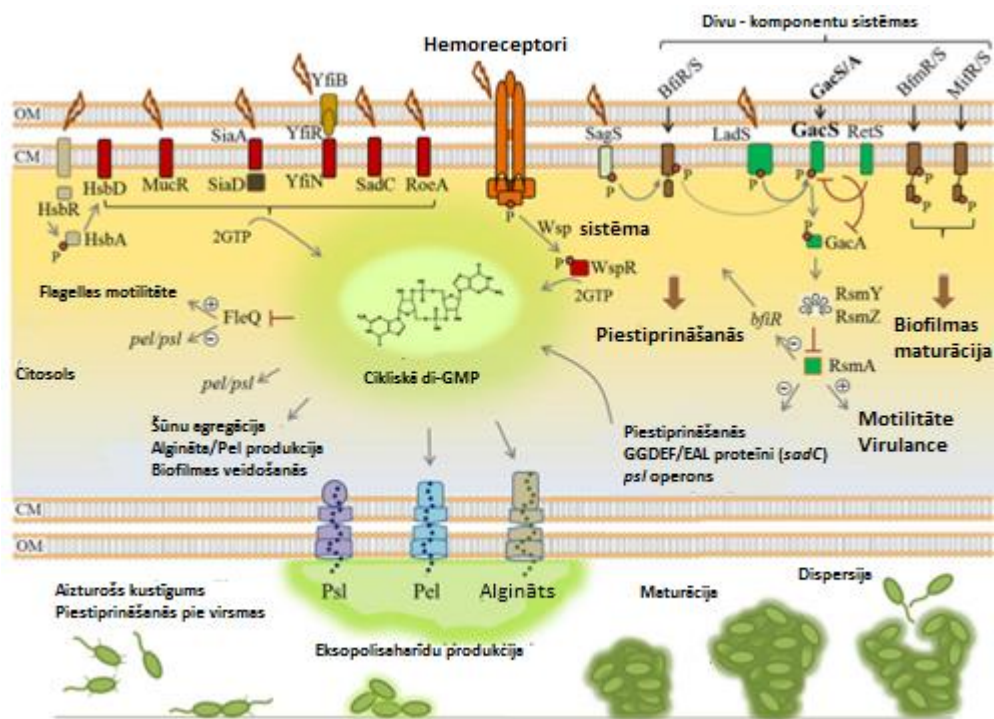
eDNS ir vēl viens svarīgs strukturāls komponents bioplēves attīstībā, un tam ir daudzveidīga loma bioplēves veidošanā, piemēram, izveidot matricā helātu kompleksu ar anjonu (DNS) un katjonu, piemēram, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} un Zn^{2+} , kas nodrošina barības vielu avotu bada laikā, veicinot šūnu motilitāti un kustību koordinēšanu, kā arī rezistences veidošanos pret antibiotikām (Wilton *et al.*, 2015).

Starp bioplēves veidojošām sastāvdaļām gan viciņa, gan IV tipa pili ir svarīgi bioplēves nobriešanas laikā, tomēr šos parasti neuzskata par biofilmas klasiskās matricas komponentiem. IV tipa pili ir svarīgi adhēzijai un veicina šūnu sākotnēju pieķeršanos virsmām bioplēves veidošanās agrīnā stadijā. Kopā ar eDNS, flagella un IV tipa pili mediē migrāciju, kas nepieciešama kātiņa un cepurītes izveidošanai nobriedušas bioplēves sēņu formas mikrokolonijās (Stempel *et al.*, 2013).

***P. aeruginosa* pāreja no kustīgas uz nekustīgu formu.** Pārejai no kustīguma uz nekustīgu formu nepieciešami regulatīvie tīkli transkripcijas, post-transkripcijas un pēctranslācijas līmenī, kas rezultējas ar simtiem gēnu koordinētu ekspresiju. Rezultātā tiek apstādīnāta uz viciņas balstīts kustīgums un virulences faktoru, piemēram, eksotoksīnu un proteāžu veidošanās, un vienlaikus tiek pozitīvi regulēta virsmas piestiprināšanās, EPS veidošanās un bioplēves nobriešana. Cikliskā-3'5'-diguānilskābe (cikliskā diGMP) ir galvenais signāls bioplēves veidošanās post-transkripcijas regulēšanā (Chang, 2018). Tas ir gandrīz visuresošs sekundārais mesendžeris, kas galvenokārt kontrolē kustīguma - nekustīguma slēdzi. Galvenais šo būtisko fenotipisko izmaiņu noteicējs ir cikliskā di-GMP līmenis šūnā – tā koncentrācijas paaugstināšanās izraisa bioplēves veidošanos, vienlaikus kavējot kustīgumu. Piemēram, cikliskais di-GMP ir būtisks alginātu polisaharīdu polimerizācijas aktivizēšanai. Cikliskais di-GMP saistās ar Alg44 proteīna PilZ domēnu un allosteriski aktivizē alginātu polimerizāciju, mijiedarbojoties ar Alg8 glikoziltransferāzi. Arī cikliskā di-GMP saistīšanās ar FleQ, transkripcijas galveno regulatoru, nomāc viciņas biosintēzi, vienlaikus palielinot *pel* un *psl* gēnu ekspresiju (Baraquet *et al.*, 2012). Paaugstināts

c-di-GMP līmenis izraisa arī divu efluksa sūkņu operonu *exAB-oprM* un *mexEF-oprN* transkripcijas aktivatora *BrlR* ekspresiju, kā rezultātā bioplēves veidošanās sākotnējā posmā rada rezistenci pret antibiotikām (Chang, 2018).

Bioplēves veidošanos konkrētā posmā regulē divu komponentu regulēšanas sistēmas. Šis tīkls sastāv no *BfiRS*, *BfmRS*, *MifRS* un *GacS / GacA* regulatīvajiem komponentiem (sk.1.8. att.). *GacS / GacA* divkomponentu sistēma ir galvenā daļa no divu komponentu regulēšanas sistēmas, kas satur *LadS / RetS / GacS / GacA / RsmA* proteīnus. Šis ceļš kontrolē daudzas fizioloģiskās reakcijas post-transkripcijas līmenī un ir iesaistīts gan kustīguma-nekustīguma, gan akūtas-hroniskas infekcijas pārejā, gan arī virulences faktoru producēšanā (Rasamiravaka *et al.*, 2015). No šī regulatīvā ceļa RNS saistošais proteīns *RsmA* negatīvi kontrolē bioplēves veidošanās ceļus, vienlaikus stimulējot T3SS, IV tipa pilus un citus virulences faktorus. *RsmA* saistās ar *psl* mRNS un kavē nepieciešamo proteīnu translāciju *Psl* polisaharīdu biosintēzei. Tas arī nomāc GGDEF / EAL kodējošo proteīnu produkciju, līdz ar to tas kavē cikliskā di-GMP līmeņa paaugstināšanos. *P. aeruginosa* stresa apstākļos šis ceļš rada nekodētas RNS (ncRNS), kas pazīstamas kā *RsmY* un *RsmZ*, un tās neitralizē *RsmA* represijas aktivitāti, tādējādi palielinot bioplēves veidošanos galvenokārt ar ciklisku di-GMP līmeņa pieaugumu, kas izraisa eksopolisaharīdu veidošanos (Pita *et al.*, 2018).



1.4. att. *P. aeruginosa* biofilmas veidošanās iesaistītie regulatīvie tīkli (Chang, 2018)

***P. aeruginosa* QS sistēma.** Kā jau iepriekš minēts, *P. aeruginosa* piemīt divas galvenās QS sistēmas (*las* un *rhl*). *Rhl* sistēma kontrolē ramnolipīdu producēšanu, un tiem ir vairākas funkcijas *P. aeruginosa* bioplēvju veidošanā: 1) tie ir iesaistīti mikrokoloniju veidošanā; 2) atvieglo trīsdimensiju sēņu formas struktūru veidošanos *P. aeruginosa* bioplēvē; 3) sekmē šūnu izkliedi no bioplēves (Rasamiravaka *et al.*, 2015). QS sistēmai ir saistība ar antibiotiku rezistences mehānismiem, piemēram, *P. aeruginosa las* sistēma pozitīvi saista *mexY* gēna ekspresiju, kas kodē iekšējās membrānas zāļu / H⁺ antiportera proteīnu MexY, kas ir MexxY –oprM kompleksa galvenā apakšvienība, kas pazīstams kā galvenais aminoglikozīdu rezistences veidotājs. CF celmi ar *lasR* funkciju zaudēšanas mutācijām bija vairāk rezistenti pret terapeitiskām antibiotikām, piemēram, tobramicīnu, ciprofloksacīnu un ceftazidīmu. Antibiotiku rezistence *lasR* mutantos tika attiecināta uz paaugstinātu β-laktamāzes aktivitāti, baktēriju metabolisma adaptāciju vai metabolisma maiņām (Wang *et al.*, 2018). Kā citu antibiotiku rezistences piemēru var minēt skābekļa trūkumu un zemu baktēriju šūnu metabolisma ātrumu bioplēves dziļākajos slāņos, kas izraisa rezistenci pret aminoglikozīdiem, fluorohinoloniem, β -laktāmiem, jo šīm antibiotikām ir nepieciešams aktīvs, no skābekļa atkarīgs uzņemšanas process caur citoplazmas membrānu. Kā arī *Pmr / arn* operona augšupregulēšanai ir nozīme *P. aeruginosa* bioplēvju rezistencei pret kolistīnu līdz ar MexAB-OprM izplūdes sūkņa aktivizēšanu. Efluksa sūkņi, kas tiek kodēti ar *mexCD-OprJ* un *muxABC oprB* gēniem tiek ekspresēti kolistīna klātbūtnes rezultātā. Kolistīnam nav efektivitāte pret metaboliski aktīvo perifēro subpopulāciju, bet ir efektīvs, lai likvidētu metaboliski neaktīvo subpopulāciju bioplēves dziļākajos slāņos (Ciofu and Tolker-Nielsen, 2019).

1.2.2. *A. baumannii* veidotās biofilmas

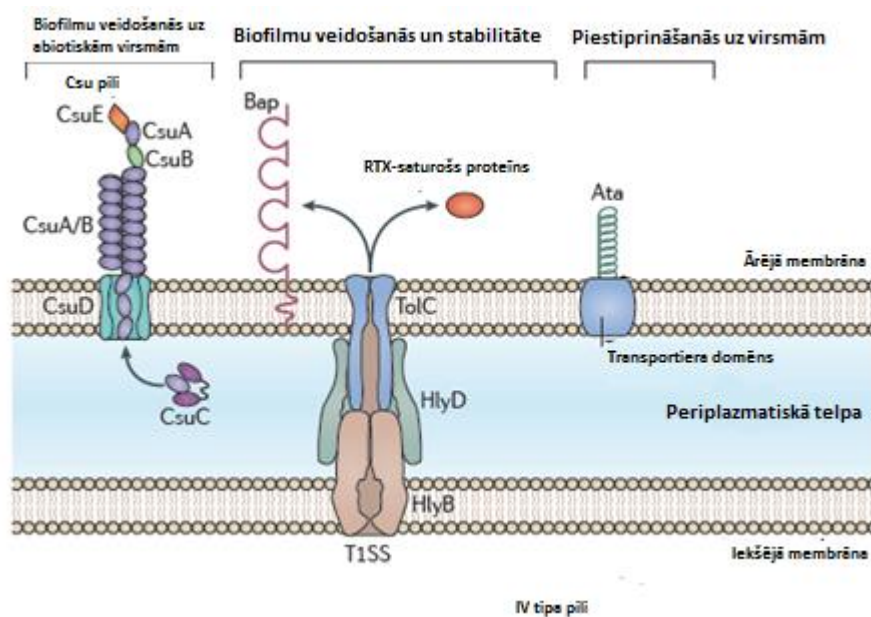
A.baumannii baktēriju šūnas veido bioplēves ādas un mīksto audu infekcijās, kā arī brūcēs un uz oklūzijas pārsējiem. *A. baumannii* bioplēvju kopienas tika novērotas arī uz abiotiskām virsmām, piemēram, uz polipropilēna, polistirola, titāna, nerūsējošā tērauda un polikarbonāta - termoplastiska materiāla, ko bieži izmanto medicīnas ierīču konstruēšanai. *A. baumannii* izolāti, kas iegūti no asinīm, urīna, krēpas, katetriem, cerebrospinaļa šķidrums, bronhoalveolārā skalošanas un apdegušas ādas, parāda vienlīdzīgu spēji producēt bioplēves. Bioplēves veidošanās ir vairāk saistīta ar MDR *A. baumannii* celmiem nevis ar jutīgiem celmiem (Harding *et al.*, 2018).

Biofilmu veidošanās fizikālo un ķīmisko izmaiņu ietekmē. Fizikālās un ķīmiskās izmaiņas vidē ietekmē *A. baumannii* bioplēvju veidošanos. Tādi faktori kā virsmas hidrofobitāte, temperatūra un skābekļa koncentrācija ietekmē bioplēves veidošanos *A. baumannii*. Piemēram, augsta temperatūra uzlabo šūnu hidrofobitāti un barības vielu

uzņemšanu, izraisa polisaharīdu veidošanos, kā rezultātā veidojas bioplēves. “*Chaperone – usher*” sistēmas produkcija ir augsta 28°C temperatūrā (Luo *et al.*, 2015).

Bioplēves veidošanā iesaistītie komponenti. *Csu* pili, kurus regulē BfmRS divkomponentu regulatīvā sistēma, ir ļoti svarīgi bioplēves veidošanai un uzturēšanai uz abiotiskām virsmām, ieskaitot polistirolu, bet nav nepieciešami saistībai ar biotiskām virsmām, piemēram, cilvēka epitēlija šūnām. Ir pierādīts, ka otra divkomponentu sistēma ar nosaukumu GacSA46 mēreni kontrolē *csu* gēna ekspresiju un tādējādi netieši rada bioplēves veidošanos. *Csu* pili ir izveidoti no četrām proteīnu apakšvienībām - *CsuA / B*, *CsuA*, *CsuB* un *CsuE*, izmantojot arhaisko (σ) šaperonu-ievadēju (CU “*Chaperone – usher*”) ceļu (Pakharukova *et al.*, 2018). *CsuA / B*, *CsuA* un *CsuB* pilīna apakšvienības tiek pārvietotas uz ārējās membrānas *CsuD* “ievadēju” ar *CsuC* šaperoniem. *CsuD* “ievadītājs” atvieglo *CsuA / B*, *CsuA* un *CsuB* monomēru polimerizāciju pilīna šķīdumā. Pilīna polimerizācija tiek ierosināta ar *CsuE* galu adhēziju un mazākajiem pilīniem *CsuA* un *CsuB* (Reena AAA *et al.*, 2017). *CsuE*, kas kodē pili galu adhēzīnu, deaktivizēšana izraisa pili produkcijas pārtraukšanu, kā arī bioplēves veidošanos (Harding *et al.*, 2018). *CsuA / B*ABCDE mediētie pili ir svarīgs posms sākotnējās bioplēves veidošanās stadijās, veicinot baktēriju šūnu adhēziju pie abiotiskām virsmām un ierosina mikrokoloniju veidošanos, kas notiek pirms pilnīgas bioplēves struktūru attīstības. BfmR inaktivācijas rezultātā tiek zaudēta *csu* operona ekspresija un attiecīgi tiek pārtraukta gan pili veidošanās, gan bioplēves veidošanās uz plastmasas (Reena AAA *et al.*, 2017).

Bap (ar bioplēvi saistītais proteīns), kas tiek sekretēts caur I tipa sekrēcijas sistēmu (T1SS), veicina *A. baumannii* bioplēves veidošanos un nogatavināšanu. Bap ir loma šūnu šūnu adhēzijā, un tas ir nepieciešams, lai attīstītu augstākas biofilmas kārtas struktūras uz medicīniski nozīmīgiem materiāliem, piemēram, polistirola un titāna. Daži *A. baumannii* celmi arī kodē Bap līdzīgus proteīnus, BLP1 un BLP2, kas koordinēti veicina nobriedušu bioplēvju veidošanos tādā pašā veidā kā BapAb (Reena AAA *et al.*, 2017). Ne tikai Bap tiek sekretēts caur T1SS, bet arī RTX-saturošs proteīns, kas arī ir iesaistīts bioplēves veidošanā un stabilitātē. T1SS sastāv no ārējās membrānas proteīna TolC, periplazmas adaptera proteīna, hemolizīna sekrēcijas proteīna D (HlyD) un iekšējās membrānas ATFāzes HlyB. *Acinetobacter* trimeriskā autotransportiera (Ata) Vc sekrēcijas sistēma sastāv transportiera domēna un N-gala proteīna (sk. 1.5. att.). Adhezīns veicina pielipšanu saimnieka ārpusšūnu un bazālās membrānas komponentiem (Longo *et al.*, 2014).



1.5. att. **Biofilmu veidošanās *A. baumannii*** (Longo *et al.*, 2014)

algC ir ar bioplēvēm saistīts gēns, kas mediē biofunkcionālā enzīma fosfomannomutāzes / fosfoglikomutāzes sintēzi, kas nepieciešams, lai bioplēves veidošanās laikā iegūtu eksopolisaharīdu alginātu un lipopolisaharīdu kodolu (Pakharukova *et al.*, 2018).

Efluksa sistēma AdeRS ir saistīta ar *A. baumannii* spēju producēt bioplēvi. AdeRS deaktivizēšana izraisa bioplēves veidošanās zudumu *A. baumannii* izolātā, jo tiek samazināta *adeABC*, *pill*, *com* un *pgaClike* gēnu ekspresija, kas ietekmē antibakteriālo līdzekļu rezistenci un virulences mijiedarbību. *adeAB* delēcija ietekmē *A. baumannii* spēju veidot bioplēves uz plastmasas. Tika novērots, ka pieaugošs mikrobcīdu daudzums atsevišķi vai kombinācijā izraisa rezistences-nodalījuma-sadalījuma grupas (RND) tipa efluksa sūkņa AdeABC *adeB* gēna ekspresijas un funkcijas modifikāciju, un līdz ar to arī bioplēves masas un dzīvotspējas iznīcināšanu (Richmond *et al.*, 2016). LysR tipa transkripcijas regulators regulē AdeFGH, un, pārmērīgi ekspresēts, nodrošina *A. baumannii* multizāļu rezistenci. *adeG* augšupregulēšana korelē ar bioplēves indukciju, īpaši, ja ārstē ar mazu devu antibakteriālo terapiju, piemēram, fluorohinolonu (He *et al.*, 2015). Efluksa sūkņa AdeIJK pārekspresija veicina samazinātu bioplēves veidošanos, kā arī rezistenci pret β -laktāmiem, hloramfenikolu, tetraciklīnu, eritromicīnu, linkozamīdiem, fluorohinoloniem, novobiocīnu, rifampīnu, trimetoprimu.

PgaABCD gēnu kopa kodē poli- (1-6) -nacetilglikozamīnu (PNAG), kas ir viena no vissvarīgākajām bioplēves veidošanās struktūrām gan gramnegatīvā, gan grampozitīvā mikroorganismā. *pgaB* ekspresija ir saistīta ar bioplēves veidošanās kapacitātes un biezuma palielināšanos (Da Cunda *et al.*, 2019).

Dzelzs koncentrācija un QS sistēma. Dzelzs koncentrācija vidē darbojas kā svarīgs vides signāls, kas inducē adhēzijas faktorus, tādējādi spēlējot kritisku lomu bioplēves veidošanā. Lielāka dzelzs koncentrācija ļauj palielināt rezistenci pret noteiktām antibiotikām, signalizējot vai mijiedarbojoties ar pašām antibiotikām, kā arī stimulē EPS veidošanos, nomācot ramnolipīdu veidošanos vai kavējot transkripcijas regulatoru, kas noved pie alginātu sintēzes (Da Cunda *et al.*, 2019).

A.baumannii un *P. aeruginosa* vienā un tajā pašā infekcijas vietā izmanto AHL balstītas QS sistēmas, kas koordinē biofilmu veidošanos un abu sugu koinfekciju, kā rezultātā palielinās infekcijas smagums. QS molekulas ir saistītas ar *bfmS* un *bfmR* gēnu ekspresijas augšupregulēšanu, tādējādi uzlabojot *A. baumannii* spēju veidot bioplēvi uz abiotiskām virsmām. *A.baumannii* ir QS sistēma, kas izmanto AbaR receptoru proteīnu un N- (3-hidroksidodekanoil) -homoserīna laktonu, tādējādi regulējot virulences faktorus, piemēram, bioplēves veidošanos un virsmas motilitāti (Pakharukova *et al.*, 2018).

1.3. Antibakteriālā terapija

A. baumannii izraisīto infekciju ārstēšanai kā pirmo izvēles antibakteriālo līdzekli lieto karbapenēmus -imipenēmu un meropenēmu. Infekciju ārstēšanai izmanto arī aminoglikozīdus (amikacīnu un tobramicīnu), fluorohinolonus (ciprofloksacīnu un levofloksacīnu), plaša spektra cefalosporīnus (ceftazidīmu, cefotaksīmu, ceftriaksonu, cefepimu) un β-laktāma grupas penicilīnu ar β-laktamāzes inhibitoru (ampicilīnu/sulbaktāmu, piperacilīnu/tazobaktāmu). Tie tiek lietoti ar nosacījumu, ka mikroorganismi ir jutīgi. Kā pēdējās izvēles antibakteriālo līdzekli lieto kolistīnu (Lee *et al.*, 2017).

P. aeruginosa izraisīto infekciju ārstēšanai izmanto β-laktāmus, piemēram, monobaktāmu (aztreonamu), karbapenēmus (imipenēmu, meropenēmu) penicilīnu - tikarcilīnu, β-laktāma grupas penicilīnu ar β-laktamāzes inhibitoru (piperacilīnu/tazobaktāmu), 3. un 4. paaudzes cefalosporīnus - attiecīgi ceftazidīmu un cefepimu. No aminoglikozīdiem lieto amikacīnu, tobramicīnu, un gentamicīnu, bet no fluorohinoloniem - ciprofloksacīnu, levofloksacīnu un ofloksacīnu (Wisplinghoff, 2017).

1.3.1. β -laktāma antibiotikas

Pie β-laktāma antibiotikām pieder: penicilīni, cefalosporīni, karbapenēmi, monobaktāms. Galvenais β-laktāma mērķis ir penicilīna saistošais proteīns (PSP). PSP ir enzīmi (t.i., transglikolāzes, transpeptidāzes un karboksipeptidāzes), kas katalizē peptidoglikāna veidošanos baktēriju šūnu sienās. Ar PSP, galvenokārt transpeptidāzi, saistās β-laktāma gredzens, kā rezultātā inhibē šūnas sienas sintēzi un līdz ar to izraisa šūnas bojāeju (Kapoor *et al.*, 2017).

1.3.2. Aminoglikozīdi

Aminoglikozīdi kavē olbaltumvielu sintēzi, ar lielu afinitāti saistoties ar 30S ribosomas A-vietu 16S ribosomālajā RNS, izraisot baktericīdu efektu (Kapoor *et al.*, 2017). Galvenās aminoglikozīdu blakusparādības ir ototoksicitāte, nefrotoksicitāte un neiromuskulārā blokāde. Aminoglikozīdi parasti netiek lietoti monoterapijā, izņemot pie *P. aeruginosa* izraisītā urīnceļu infekcijas. Lieto kopā ar citām antibiotikām, kā piemēram ar β -laktāmu grupas antibiotikām (Krause *et al.*, 2016).

1.3.3. Fluorohinoloni

Fluorohinoloni ir sintētisko antibakteriālo līdzekļu grupa, kas sākotnēji lielākoties tika izmantoti gramnegatīvo infekciju ārstēšanā, taču vēlāk tie tika modificēti, lai uzlabotu to farmakokinētiskās īpašības un paplašinātu antibakteriālo spektru, kļūstot efektīviem pret dažādiem gramnegatīviem un grampozitīviem patogēniem. Fluorohinoloni inhibē DNS girāzes un topoizomerāzes IV aktivitāti, kā rezultātā tiek bloķēta DNS replikācija, līdz ar to nodrošina baktericīdu efektu (Correia *et al.*, 2017).

1.3.4. Polimiksīns E (kolistīns)

Kolistīna aktivitātes mērķis ir ārējās membrānas komponents - lipopolisaharīds (LPS). Polimiksīniem ir spēcīgs pozitīvs lādiņš un hidrofobiska acilķēde, kas tiem piešķir augstu saistīšanās afinitāti ar LPS molekulām. Polimiksīni mijiedarbojas elektrostātiski ar šīm molekulām un konkurējoši izspiež divvērtīgos katjonus (Mg^{2+} un Ca^{2+}), izraisot membrānas traucējumus. Šī procesa rezultāts ir šūnas apvalka caurlaidības palielināšanās, šūnas satura noplūde un pēc tam šūnas nāve (Bialvaei and Samadi, 2015). Biežākās kolistīna terapijas blakusparādības ir nefrotoksicitāte un neirotoksicitāte. Nieru toksicitāte galvenokārt ietver akūtu tubulāru nekrozi, kas izpaužas kā samazināts kreatinīna klīrenss un paaugstināts urīnvielas un kreatinīna līmenis serumā. Neiroloģiskā toksicitāte ir saistīta ar reiboni, vājumu, sejas un perifēro parestēziju, vertigo, redzes traucējumiem, apjukumu, ataksiju un neiromuskulāru blokādi, kas var izraisīt elpošanas mazspēju vai apnoju (Spapen *et al.*, 2011).

1.4. Rezistences mehānismi

P. aeruginosa un *A. baumannii* ir novēroti šādi rezistences mehānisma veidi - enzīmu mediēta degradācija (β -laktamāzes), ģenētiskas manipulācijas (mutācijas, gēna ekspresijas regulēšana vai samazināšana) un efluksa sūkņi (Jiménez-Guerra *et al.*, 2018).

1.4.1. Rezistence pret aminoglikozīdiem

P. aeruginosa efluksa sūknis MexXY-OprM veido rezistenci pret aminoglikozīdiem. Papildu rezistences mehānismi *P. aeruginosa* ietver enzīmu producēšanu un mērķa mutācijas. Bieži sastopama aminoglikozīdus modificējošo enzīmu (acetil-transferāžu, nukleotidiltransferāžu un fosfotransferāžu) ekspresija, kas izraisa aminoglikozīdu rezistenci. 16S rRNS metilēšana nodrošina augsta līmeņa rezistenci pret visiem komerciāli pieejamiem aminoglikozīdiem, kas tiek izmantoti *P. aeruginosa* izraisīto infekciju ārstēšanai (Kapoor *et al.*, 2017). Specifisku nukleotīdu metilēšana 16S rRNS A-vietā novērš aminoglikozīdu saistīšanos ar to mērķa vietu. Līdz šim ir ziņots par vismaz sešiem atšķirīgiem gēniem (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA* un *npmA*), kas kodē to attiecīgos metilāzes enzīmus (Pang *et al.*, 2019).

A. baumannii ir identificēti visi aminoglikozīdus modificējošo enzīmu veidi (adenilāzes, acetiltransferāzes, metiltransferāzes un fosfotransferāzes). Pie aminoglikozīdu-N-acetiltransferāzēm pieder AAC(3)-Ia C, AAC(2')-Ib, AAC(6')-Ih, AAC(6')-31, un to kodējošais gēns ir *aac(6')-IId* (*integron*). Pie aminoglikozīdu O-nukleotidiltransferāzes pieder ANT(2'')-Ia, ANT(3'')-Ia. Pie aminoglikozīdu-O-fosfotransferāzes pieder APH(3')-Ib un APH(3')-Vi, un to kodējošie geni ir *strA* (*AbaR island*) un *strB* (*AbaR island*) (Ramirez and Tolmasky, 2010).

1.4.2. Rezistence pret fluorohinoloniem

Gan *P. aeruginosa*, gan *A. baumannii* galvenais rezistenci pret fluorohinoloniem nodrošina kodējošie gēni *gyrA* un *parC*, kas ir radušies *gyrA* (Ser-83→Leu) un *parC* (Ser-80→Ile) mutāciju rezultātā. Šīs mutācijas izraisa fenotipiskas izmaiņas DNS girāzē un topoizomerāzē IV, kā rezultātā tiek samazināta zāļu afinitāte. Fluorohinolonu rezistenci nodrošina arī zāļu ieplūdes un izplūdes sistēma, kas ir DNS hromosomāli kodēta mediē samazinātu OMP ekspresiju un palielinātu efluksa proteīnu ekspresiju, kā rezultātā notiek aktīva zāļu izvadīšana (Hirsch and Tam, 2010).

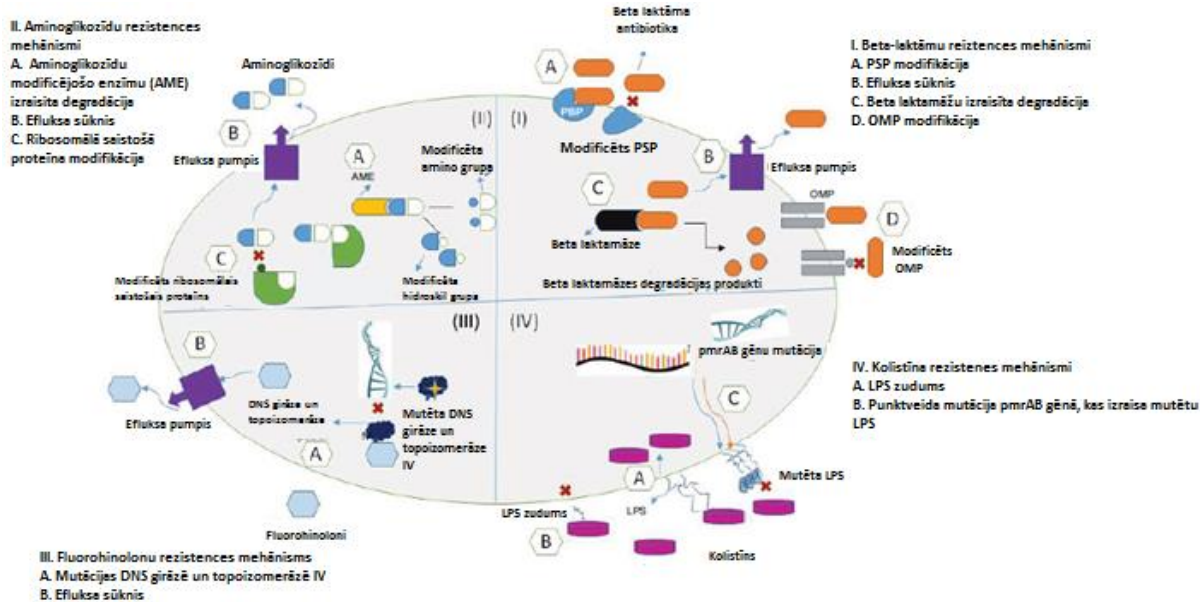
Kā jau iepriekš minēts, *P. aeruginosa* efluksa sūknis MexAB-OprM arī rada rezistenci pret fluorohinoloniem, kā arī MexEF-OprN (Hirsch and Tam, 2010).

A.baumannii ir identificēti arī plazmīdā kodēti fluorohinolonu rezistences determinanti *qnrA*, *qnrB* un *qnrS*, kas aizsargā DNS, kavējot fluorohinolonu saistīšanos ar DNS girāzi un topoizomerāzi (Yang *et al.*, 2016).

1.4.3. Rezistence pret kolistīnu

A.baumannii rezistences mehānismu pret kolistīnu kodē baktēriju hromosomu DNS. Ziņots par diviem galvenajiem mehānismiem. Pirmais mehānisms sastāv no mutācijām lipīda

A kodējošos gēnos (*lpxA*, *lpxC* un *lpxD*), kā rezultātā tiek zaudēts LPS, gramnegatīvo organismu ārējā daļa un sākotnējais kolistīna mērķis. Otrais mehānisms ietver divkomponentu *pmrAB* sistēmu, kas ir atbildes regulators un sensora kināze. Tas uztver vides apstākļus (pH, Mg^{2+} un Fe^{3+}) un, reaģējot uz to, regulē gēnu ekspresiju, kas iesaistīti lipīdu A sintēzē. Punktveida mutācijas *pmrA* un *pmrB* augšupregulē to gēnu ekspresiju, kā rezultātā tiek pārveidota ārējā membrāna (sk.1.6.att.) (Asif *et al.*, 2018).



1.6. att. Rezistences dažādi mehānismi *A. baumannii* 1) β -laktāmi; 2) aminoglikozīdi; 3) fluorhinoloni; 4) kolistīns (Asif *et al.*, 2018)

1.4.4. Rezistence pret β -laktāmiem

Rezistence pret β -laktāma antibiotikām notiek ar: 1) pastiprinātu β -laktamāžu producēšanu; 2) izmaiņām penicilīna saistošajos proteīnos; 3) izmaiņām ārējās membrānas porās, lai samazinātas caurlaidību; 4) antibiotiku izvadīšanu no šūnas caur efluksa sūkni (Kapoor *et al.*, 2017).

Ārējās membrānas proteīni un PSP modifikācija. Samazināta zāļu iekļūšana caur ārējās membrānas proteīniem (OMP) vai porīniem un penicilīnu saistošā proteīna (PSP) modifikācija izraisa rezistenci pret karbapenēmiem un citām β laktāma antibiotikām. Starp OMP, 43 kDa proteīns oprD un 29 kDa proteīns CarO ir visvairāk izpētītie porīni, kuru ekspresija ir samazināta un līdz ar to nodrošina rezistenci (Wisplinghoff, 2017). Ārējās membrānas proteīna (porīna) OprD zudums ir saistīts ar rezistenci pret imipenēmu un samazinātu jutību pret meropenēmu (Pachori *et al.*, 2019). Vairāki proteīni, piemēram, CarO,

OprD, DcaPlike, PstS, LysM un Omp33 tika iesaistīti bioplēves veidošanā *A. baumannii* un tā samazinātajai zāļu caurlaidībai. Tika ziņots, ka tādi OMP kā CarO un OmpA var mijiedarboties ar OXA-23, kas var izraisīt pastiprinātu rezistenci pret β laktāma antibiotikām (Sugawara and Nikaido, 2012).

Efluksa sūkņi. Ir identificētas sešas efluksa sūkņu grupas, kas ietver rezistences-nodalījuma-sadalījuma grupu (RND), mazu multirezistences superģimeni (*small multidrug resistance superfamily*), ATP saistošo kasešu (ABC) saimi (*ATP-binding cassette (ABC) family*), galveno veicinātāju superģimeni (*major facilitator superfamily*), multizāļu toksisko savienojumu ekstrūzijas saimi (*multidrug toxic compound extrusion family*) un nesen identificētu proteobaktēriju pretmikrobu savienojumu efluksa saimi (*proteobacterial antimicrobial compound efflux family*) (Lee *et al.*, 2017).

P. aeruginosa ekspresē divpadsmit RND ģimenes izplūdes sūkņus, no kuriem četri (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN un MexXY-OprM) veicina antibiotiku rezistenci. Piemēram, MexAB OprM sistēmai ir visplašākais substrāta specifiskums un tā veicina rezistenci pret makrolīdiem, aminoglikozīdiem, sulfonamīdiem, fluorhinoloniem, tetraciklīniem un daudziem β -laktāmiem. MexCD-OprJ spēj izsūknēt β -laktāmus (Pachori *et al.*, 2019).

A.baumannii ir trīs RND efluksa sūkņu veidi, un tie ir AdeABC, AdeFGH un AdeIJK. AdeABC (*Acinetobacter drug*) sūknis ir pirmais identificētais RND tipa efluksa sūknis, kurā AdeB darbojas kā antibakteriālo vielu transportētājs, AdeC kā OMP un AdeA kā periplazmiski savienojošais proteīns (Zhang *et al.*, 2018). AdeABC regulē AdeR-AdeS, ko kodē adeRS operons, un tas veicina antibiotiku rezistences iegūšanu, ja tas tiek pārmērīgi ekspresēts. AdeABC pārmērīga ekspresija lielā mērā veicina multizāļu rezistenci, samazinātu bioplēves veidošanos un mainītu membrānas sastāvu. Aminoglikozīdu, β -laktāmu, ieskaitot karbapenēmus, fluorhinolonu, tetraciklīnu, tigeiciklīnu, makrolīdu, hloramfenikolu un trimetoprima rezistenti fenotipi ir saistīti ar mutācijām adeRS operonā (Abdi *et al.*, 2020). AdeS pieder pie mazās multirezistences superģimenes efluksa sūkņa, kas mediē rezistenci pret karbapenēmiem, hloramfenikolu, ciprofloksacīnu, eritromicīnu, novobiocīnu (Wisplinghoff, 2017).

Galveno veicinātāju grupas efluksa sūkņi ir CraA, kas mediē rezistenci pret hloramfenikolu, AmvA / AedF, un Tet. Pie proteobaktēriju pretmikrobu savienojumu efluksa grupas pieder AceI, kas galvenokārt mediē rezistenci pret hlorheksidīnu. Pie vairāku zāļu toksisko savienojumu ekstrūzijas saimes pārstāvim ir AbeM efluksa sūknis, kas mediē rezistenci pret imipenēmu (Hassan *et al.*, 2018). *A.baumannii* uzrāda mainīgu jutību pret parasti izmantotajiem biocīdiem (hlorheksidīna diglukonātu, benzalkonija hlorīdu), un

mazāka jutība pret šiem biocīdiem, iespējams arī izraisa mazāku jutību pret dažiem pretmikrobu līdzekļiem (fluorohinoloniem, aminoglikozīdiem, karbapenēmiem un tetraciklīniem). Hlorheksidīna diglukonāta un benzalkonija hlorīda iedarbība ir saistīta ar pārmērīgu gēnu ekspresiju, kas kodē izplūdes sūkņus (AdeB un AmvA), un ar samazinātu gēnu ekspresiju, kas kodē porīnus (OmpA un CarO) (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015).

β –laktamāzes. β -laktamāzes var iedalīt četrās klasēs (A, B, C un D) pamatojoties uz to aminoskābju sekvencēm. A, C un D enzīmu klases hidrolizē β-laktāmus caur aktīvās vietas serīnu. Turpretī B klases β-laktamāzes ir metalloenzīmi, kuriem β-laktāma hidrolīzei nepieciešami divvērtīgi cinka joni (Kapoor *et al.*, 2017).

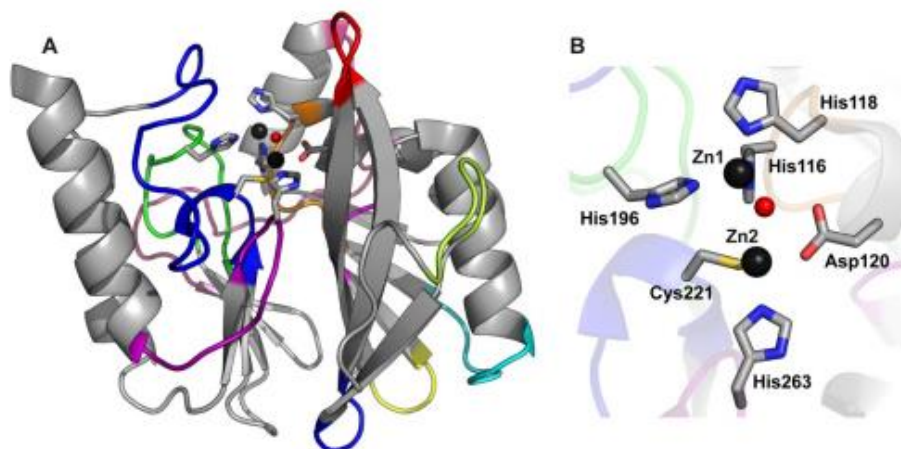
P. aeruginosa producē ļoti dažādas β-laktamāzes. *P. aeruginosa* producētā C klases β- laktamāze nomāc antipseudomonālos cefalosporīnus, β-laktāmu klasi. Daži *P. aeruginosa* izolāti producē paplašināta spektra β-laktamāzes (ESBL), kas nodrošina rezistenci pret lielāko daļu β-laktāma antibiotikām, ieskaitot penicilīnus, cefalosporīnus un aztreonāmu. ESBL galvenokārt ir A enzīmu klasē, lai gan OXA tipa ESBL, kas tika nosaukti par savām oksacilīna hidrolizēšanas spējām, pieder D enzīmu klasei un pirmoreiz tika identificēti *P. aeruginosa* izolātos (Pang *et al.*,2019). *P. aeruginosa* tika identificēti izolāti, kuros bija vairāki rezistences gēni vienlaikus sastopami, piemēram OXA-10 un TEM, OXA-10 un VIM, kā arī OXA-10, TEM un VIM (Neyestanaki *et al.*,2014). PSE-1 un PSE-4 rada rezisenci tikai pret penicilīniem. *P. aeruginosa* ir izplatīta hromosomāli kodētas cefalosporināzes (AmpC) pārmērīga ekspresija, kas rodas antibiotiku terapijas rezultātā līdz ar to rodas rezistence pret tikarcilīnu, piperacilīnu un trešās paaudzes cefalosporīniem.

Starp β -laktamāzēm *A. baumannii* viena no izplatītākajām ampC cefalosporināze, kuru kodē *bla* gēns un tas nodrošina rezistenci pret penicilīniem un šaura un paplašināta spektra cefalosporīniem. Pie citām β laktamāzēm pieder A klases β laktamāzes, piemēram, paplašināta spektra β laktamāzes (PER-1, Veb-1, CTX-M, TEM, SHV), D klases β laktamāzes, piemēram, OXA (Wisplinghoff, 2017).

1.4.4.1.Metallo- β –laktamāzes

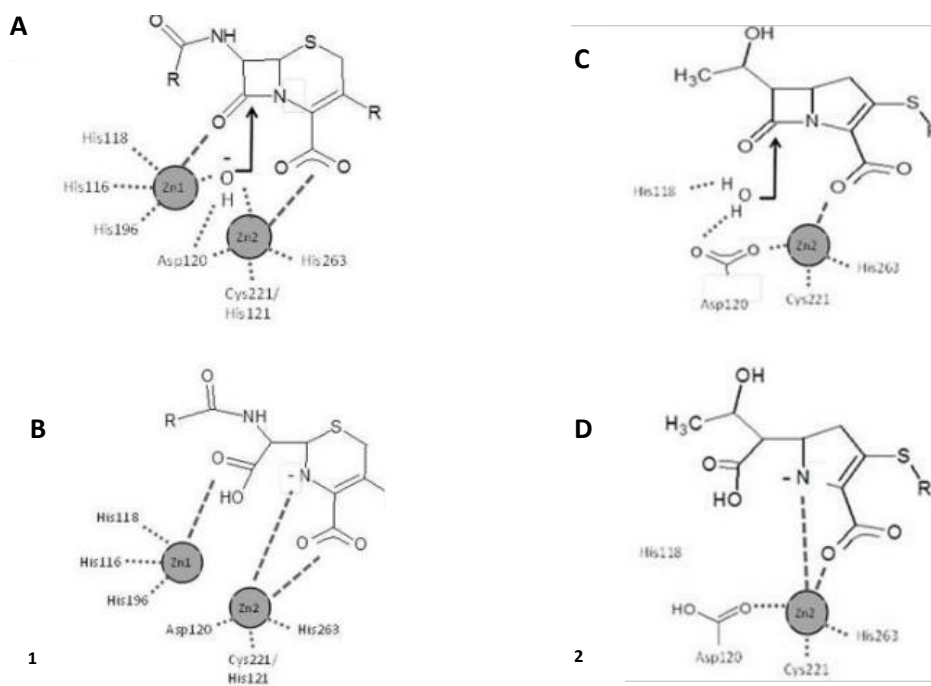
Kā jau iepriekš minēts, gan *P. aeruginosa*, gan *A. baumannii* producē metallo- β - laktamāzes (MBL), kurām ir svarīga loma ir karbapenemāžu producēšanai. (Guzel *et al.*,2018). B klases metallo-β-laktamāzēm (MBL) ir plašs substrātu spektrs un tās var katalizēt praktiski visu β-laktāma antibiotiku, izņemot monobaktāmu, hidrolīzi. Pret MBL nedarbojas tādi inhibitori, kā klavulānskābe, sulbaktāms, tazobaktāms, kas ir efektīvi pret serīna bāzes A klases β laktamāzēm. Metallo-β-laktamāzēm ir ļoti zema sekvences identitāte, dažos gadījumos tikai 10%, un tādējādi tie ir atšķirīgi proteīni, kuriem tomēr ir kopēja cinka

saistīšana aktīvajā vietā. Parastā sastatne ir $\alpha\beta / \beta\alpha$ “ sviestmaize” ar aktīvo vietu seklā rievā, kas izveidota divu $\alpha\beta$ domēnu saskarnē (sk.1.7.att.) (Meini *et al.*, 2014).



1.7. att. Metallo- β -laktamāzes struktūra (Meini *et al.*, 2014)

B klases β -laktamāzes (MBL) iedala trīs apakšklasēs. B1 apakšklase saista vienu cinka jonu (Zn1) ar trim His atlikumiem (H116, H118, H196) un otro cinka jonu (Zn2) ar trim dažādiem atlikumiem, īpaši ar Cys (D120, C221, H263). B2 apakšklasē β -laktamāzēm ir Zn1 saistīšanās vieta ar vienu mainītu atlikumu (N116, H118, H196), taču tās saglabā līdzīgu Zn2 vietu (D120, C221, H263) - otrā cinka saistīšanās B2 enzīmos kavē katalīzi. Apakšklasei B3 β -laktamāzēm ir daudzveidīga Zn1 saistīšanās vieta (H / Q116, H118, H196) un atšķirīga Zn2 saistīšanās vieta, kurai trūkst Cys atlikuma (D120, H121, H263) (Palzkill, 2013). B1 un B3 apakšklasēm ir plaša spektra substrāta profils, kas ietver penicilīnus, cefalosporīnus un karbapenēmus, savukārt B2 fermentiem ir šaurš profils, kas ietver tikai karbapenēmus, kas ir izskaidrojams ar to, ka aktīva ir tikai viena cinka forma; ar cinku, kas piesaistīts Zn2 vietā (sk 1.8. att.) (Mojica *et al.*,2016).



1.8. att. 1. Cefalosporīnu saistīšanas ar dicinkmetallo-β laktamāzes aktīvo vietu (apakšklases B1 un B3) shematisks attēls. Cinka joni ir iezīmēti, un mijiedarbība tiek parādīta ar pārtrauktām līnijām. A. Cefalosporīna substrāts saistās pie aktīvajām vietām un mijiedarbojas gan ar Zn1, gan ar Zn2 caur karbonilgrupas skābekli un karboksilgrupu. Saistītais hidroksīds tiek novietots tā, lai saistītos ar substrāta karbonilgrupas oglekļa atomu. B. Anjonu starpprodukts stabilizējies aktīvajā vietā ar Zn2 jonu

2. Karbapenēma substrāts un anjonu starpprodukts, kas saistās ar monocinkmetallo-β-laktamāzes aktīvo vietu (B2 apakšklase). C. Karbapenēms saistās ar monocinka aktīvo vietu. Aktīvās vietas ūdens molekula saistās ar Asp120 un His118, un tiek aktivizēts, lai saistītos ar karbapenēma karbonilgrupas oglekļa atomu. D. Anjonu starpprodukts stabilizējies aktīvajā vietā ar Zn2 jonu (Palzkill, 2013)

Klīniski nozīmīgās metallo-β-laktamāzes pieder B1 apakšklasei un tām ir aptuveni 23% aminoskābju secības identitāte. B1 β-laktamāzes satur lielāko skaitu klīniski nozīmīgo enzīmu pārstāvjus, ieskaitot VIM, IMP, un NDM, SPM, FIM (Mojica *et al.*, 2016).

IMP (imipenēmāzes) tipa MBL. IMP tika identificēts kā pirmā metallo-β-laktamāze, kas tika izolēta no *Pseudomonas aeruginosa* Japānā 1988. gadā. Kopumā IMP varianti rada 85% –99,6% no sekvences līdzības (80–99,6% sekvences identitāte) (Meini *et al.*, 2014). Plaši raksturoti četri IMP-1 dabiskie varianti (IMP-6, -25, -10 un -30). IMP-6 atšķiras no IMP-1 ar S262G mutāciju aktīvajā vietā, un IMP-25 atšķiras no IMP-6 ar papildu G235S mutāciju ASL10. IMP-1 novērots augstāks rezistences līmenis pret imipenēmu un vairākām citām

antibiotikām, savukārt IMP-6 ir augstāks rezistences līmenis pret meropenēmu un doripenēmu. IMP-25, kas varētu būt IMP-6 atvasinājums, rada vislielāko rezistenci pret meropenēmu. Ņemot vērā pieaugošo aktivitāšu attiecību starp šiem fermentiem, tiek pieņemts, ka IMP-6 ir sākotnējais enzīms, no kura IMP-1 un IMP 25 ir attīstījušies (Mojica *et al.*,2016). Pašlaik no *P. aeruginosa* ir identificēti 33 no 51 zināmajiem IMP variantiem (Hong *et al.*, 2015). *A.baumannii* ir identificēti 9 IMP varianti, piemēram, IMP-1,IMP-2,IMP-4,IMP-5, IMP-6,IMP-8,IMP-11, IMP-19, IMP-24 (Lee *et al.*, 2017).

VIM (Veronas integrīna kodētā) tipa MBL. VIM-1 tika identificēts 1999. gadā Itālijā *P. aeruginosa* klīniskajā izolātā, kas ir rezistents pret karbapenēmiem. VIM varianti satur secības līdzības no 81% līdz 99,6% (72.9% –99.6% secības identitāte, ieskaitot VIM-7, visatšķirīgāko variantu). Kopumā visiem VIM fermentiem ir plašs substrātu spektrs pret penicilīniem, cefalosporīniem un karbapenēmiem (Meini *et al.*,2014).

VIM-1 ir lielāka afinitāte pret cefuroksīmu, cefepīmu un cefpiromu, savukārt VIM-2 ir augstāka afinitāte pret penicilīnu G un ceftazidīmu. VIM-31 samazināta afinitāte pret ceftazidīmu, apmicilīnu, meropenēmu salīdzinot ar VIM-2. Samazināta aktivitāte pret plaša spektra cefalosporīniem, salīdzinot ar VIM-1,VIM-4, VIM-13, VIM-19, VIM-23, piemēram, cefepīmu. VIM-11 augstāka afinitāte pret ceftazidīmu, cefepīmu salīdzinot ar VIM-2. VIM-7 kopumā samazināta aktivitāte pret lielāko daļu cefalosporīnu (piemēram, cefalotīnu, ceftazidīmu, cefotaksīmu), salīdzinot ar VIM-2 (Mojica *et al.*,2016). 24 no 46 VIM variantiem ir identificēti *P. aeruginosa.*, un visizplatītākā MBL ir VIM-2 (Hong *et al.*, 2015). *A. baumannii* ir identificēti 5 varianti – VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-11 (Lee *et al.*, 2017).

NDM (New Delhi) tipa MBL. NDM-1 pirmo reizi tika identificēts 2008. gadā no *Klebsiella pneumoniae* un *Escherichia coli* celmiem, kas izolēti no pacienta, kurš ieguva infekciju Ņūdeli, Indijā. NDM-1 ir ļoti maza sekvenču identitāte ar citiem MBL. NDM-1 celmi ir īpaši bīstami, jo: (i) vairums šajās baktērijās konstatēto plazmīdu ir pārnesami, kas liecina par plašu horizontālo pārvešanu; ii) trūkst standartizēta fenotipiskā testa metallo-β-laktamāzes (MBL) noteikšana; (iii) trūkst efektīvu antibiotiku daudzu zāļu rezistentu NDM-1 ekspresējošu baktēriju ārstēšanai (Khan *et al.*, 2017). NDM-1 gēnu pārnēsā dažādas plazmīdas, kas satur arī vairākus rezistences gēnus, kas saistīti ar karbapenemāzēm, cefalosporināzēm, rezistenci pret makrolīdiem, rifampīnu un sulfametoksazolu - kombinācija, kas padara šos celmus multirezistentus (Mojica *et al.*,2016). Līdz ar to NDM-1 parāda plašu susbratāta profilu, kas spēj hidrolizēt penicilīnus, karbapenēmus un cefalosporīnus (ar zemāku aktivitāti pret cefoksitīnu un ceftazidīmu). Līdz šim izolētie NDM varianti nav tik dažādi kā VIM un IMP varianti, un tos atšķir tikai viena vai divas mutācijas.

NDM-4 ir neliela aktivitātes palielināšanās pret cefalosporīniem (cefazidīmu, cefalotīnu un cefotaksīmu) un karbapenēmiem (imipenēmu, meropenēmu) (Meini *et al.*, 2014). *P. aeruginosa* un *A. baumannii* ir identificēti 7 NDM varianti (no NDM-1 līdz NDM-7) (Hong *et al.*, 2015). NDM-1 un NDM-2 gēni atrodas vienā un tajā pašā saliktajā transposonā, kura nosaukums ir Tn125, un tas ir 10 099 bp garš un satur divas identiskas ievietošanas secības ISAbal25 kopijas, kas satur blaNDM-1 / -2 gēnus (Bonnin *et al.*, 2012).

SPM (Sao Paulo) tipa MBL. SPM-1 pirmo reizi Brazīlijā tika identificēts 1997. gadā no *P. aeruginosa* klīniskā izolāta, kas bija rezistents pret visām pieejamajām antibiotikām, izņemot kolistīnu. SPM ievērojami atšķiras no VIM un IMP, novērota augstāko aminoskābju identitāte ar IMP-1 35,5%. MDR *P. aeruginosa*, kas producē SPM-1, izplatīšanās tika demonstrēta atsevišķos Brazīlijas reģionos. *BlaSPM-1* gēns ir vai nu hromosomāli, vai plazmīdā kodēts. Par *blaSPM-1* gēnu ziņots *Pseudomonas* un *Acinetobacter* celmos, kas ir izolēti no dažādām Brazīlijas slimnīcām (Hong *et al.*, 2015).

FIM (Florences imipenēzes) tipa MBL. 2012. gadā Florencē (Itālijā) tika identificēts FIM-1 no MDR *P. aeruginosa*, kas uzrādīja vislielāko līdzību (40% aminoskābju identitāte) ar NDM tipa enzīmiem. FIM-1 ir plaša substrāta specifika, īpaši ar penicilīniem un karbapenēmiem (Jabalameili *et al.*, 2018).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

Maģistra darba pētnieciskās daļas izstrāde notika *Tuberkulozes un plaušu slimību centra* Mikobakterioloģijas laboratorijā laika periodā no 2019. gada septembra līdz 2020. gada martam. Darbam laboratorijā saņemta laboratorijas vadītājas dr. Norvaišas atļauja.

Kopumā tika izmantotas sešas metodes: baktēriju identificēšanai tika izmantota *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēma, kā arī genotipiskās izmeklēšanas metode, izmantojot *GenoType® BC gramnegative* testu; mikroorganismu jutības noteikšanai pret sešiem antibakteriālajiem līdzekļiem (amikacīnu, ceftazidīmu, imipenēmu, meropenēmu, ciprofloksacīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu) tika izmantota *Bauer –Kirby™* disku difūzijas tests, kā arī *E™* -tests, kā arī šie testi tika izmantoti, lai noteiktu metallo- β -laktamāžu producējošos paraugus, kas bija karbapenēmu rezistenti; tika veikta arī biofilmu veidojošu paraugu izpēte, izmantojot mikrotitru plates metodi, kas ir modificēta pēc *Christensen et al.*, 1987. No *Tuberkulozes un plaušu slimību centra* Mikobakterioloģijas laboratorijas pieejamās datu bāzes (LIS) tika iegūti dati – antibiogrammas - par *P. aeruginosa* un *A. baumannii* identificētajiem paraugiem noteiktajos laika periodos – 01.01.2017.-31.12.2017, kur *P. aeruginosa* tika identificēts 65 paraugos un *A. baumannii* 15 paraugos, kā arī iegūti dati par 01.01.2019.-31.12.2019, kur *P. aeruginosa* tika identificēts 75 paraugos un *A. baumannii* 20 paraugos. Izmantojot iepriekš minēto datu bāzi, tika pētīta un analizēta abu mikroorganismu jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem, kā arī tika izmantota fenotipēšanas metode. Dati tika apstrādāti ar *Microsoft Excel* 2016.

2.1. Materiāli

2.1.1. *P. aeruginosa* un *A. baumannii* izolāti

Darba izstrādē tika pētīti *P. aeruginosa* un *A. baumannii* izolāti, kas tika iegūti no pacientu elpceļiem, kā piemēram, no bronhu atsūknējumiem, krēpām, kā arī tika iegūts neliels paraugu skaits no brūcēm. Kā arī tika izmantoti 10 hemokultūras paraugi, lai, izmantojot *GenoType*® *BC gramnegative* testu, varētu identificēt baktērijas.

2.1.2. Antibakteriālie līdzekļi

Pētījumā tika izmantoti 6 antibakteriālie līdzekļi no trīs antibakteriālo līdzekļu grupām. No β -laktāmu grupas tika izmantoti: ureidopenicilīna klases kombinācija ar β -laktamāzes inhibitoru -piperacilīns/tazobaktāms, III paaudzes cefalosporīns-ceftazidīms, kā arī karbapenēmi –imipenēms un meropenēms. Kā arī tika izmantoti aminoglikozīdu grupas antibiotika – amikacīns, un fluorohinolonu antibiotiku grupas līdzeklis –ciprofloksacīns. Pētījumā izmantotie antibakteriālie līdzekļi, kas piesātināti uz filtrpapīra diskiem, un attiecīgi to koncentrācija apkopoti 2.1. tabulā.

2.1. tabula

Uz filtrpapīra diskiem piesātinātie antibakteriālie līdzekļi un to koncentrācija (μg), autores sastādīta tabula

Antibakteriālais līdzeklis	Koncentrācija (μg)
Amikacīns (AK)	30
Ceftazidīms (CAZ)	10
Ciprofloksacīns (CIP)	5
Imipenēms (IPM)	10
Meropenēms (MEM)	10
Piperacilīns/tazobaktāms (TZP)	100/10

2.1.3. Darbā izmantotās barotnes un reaģenti

Darba izstrādes laikā tika izvēlētas agaru saturošas barotnes. Barotnes un šķīdumi tiek autoklāvēti standartrežīmā, kas ir 20 minūtes 121°C temperatūrā, atmosfēras spiedienā 1,5 atm.

1. *Mueller -Hinton* agars, ražotājs *-Liofilchem* (Itālija)

Mueller -Hinton barotnes sastāvs - agars (17 g), liellopu gaļas ekstrakts (2 g), kazeīna hidrolizāts (17,5 g) un ciete (1,5g). Sausās barotnes sastāvdaļas tiek izšķīdinātas 1000 ml destilēta ūdens, pēc tam tiek izmantota karsēšanas metode, lai nodrošinātu barotnes pilnīgu izšķīdināšanu, kam pēc tam seko autoklāvēšana standartrežīmā. Barotnes pH ir $7,3 \pm 0,1$ 25°C temperatūrā. Barotnes saturošos petri trauciņus uzglabā 2°C-8°C temperatūras robežās. Barotni izmanto, lai noteiktu baktēriju jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem. Ciete, kas ir viena no šīs barotnes sastāvdaļām, nodrošina baktēriju izdalīto toksīnu absorbēšanu, lai tie neinterferē ar antibakteriālajiem līdzekļiem. Kā arī ciete regulē antibakteriālo līdzekļu izplatīšanās ātrumu agarā.

2. *MacConkey* agars, ražotājs *Biolife* (Itālija)

MacConkey barotnes sastāvs - agars (13,5 g), žults sāļi (5 g), laktozes monohidrāts (10 g), krāsvielas, kas ir neitrāli sarkanā (0,03g) un kristālvioletais (0,001g) kristālvioletais nātrija hlorīds (5 g), peptons(17 g), proteāzes peptons (3 g). Barotnes sastāvdaļas tiek izšķīdinātas 1000 ml destilēta ūdens, pēc tam tiek izmantota karsēšanas metode, lai nodrošinātu barotnes pilnīgu izšķīdināšanu, kam pēc tam seko autoklāvēšana standartrežīmā. Barotnes pH ir $7,1 \pm 0,2$ robežās 25°C temperatūrā. Barotni saturošos petri trauciņus uzglabā 2°C-8°C temperatūras robežās. *MacConkey* barotnes sastāvdaļas veicina baktēriju augšanu, un tāpēc šī barotne tiek lietota gramnegatīvo patogēnu izolēšanai.

3. Triptona sojas agars ar 5% aitas asins piedevu, ražotājs *-Oxoid* (Anglija)

Triptona sojas agara ar 5% aitas asins piedevu barotnes sastāvs –agars (15g), triptons (15g), nātrija hlorīds (5g), sojas peptons (5g) un aitas asinis (50ml). Sausās barotnes sastāvdaļas tiek izšķīdinātas 1000 ml destilēta ūdens, kam pēc tam seko karsēšanas metode, lai nodrošinātu barotnes pilnīgu izšķīdināšanu, kam pēc tam seko autoklāvēšana standartrežīmā. Kad barotnes šķīdums ir atdzisis 47°C-49°C temperatūras robežā, tiek pievienotas aitas asinis. Barotnes pH ir 7.5 ± 0.2 robežās 25°C temperatūrā. Barotni saturošos petri trauciņus uzglabā 2°C-8°C temperatūras robežās. Barotnes sastāvā ir baktērijām vajadzīgās barības vielas, kas ir labvēlīgas baktēriju augšanai.

4. 0,85% NaCl, ražotājs *-Biolife* (Itālija)

Lai pagatavotu 0,85% NaCl šķīdumu nepieciešams izšķīdināt 8,5g NaCl 1000 ml destilēta ūdens.

2.1.4. Trauki un aparatūra

2.2. tabula

Trauki un vienreizējās lietošanas materiāli, autores sastādīta tabula

Materiāla veids	Apraksts	Ražotājs
Autoklāvējamās pudeles	100 mL, 500 mL, 1000 mL	Boeco (Vācija)
Antibakteriālo līdzekļu diski	50 gab vienā iepakojumā	BioMérieux (Francija)
E-testa stripi	30 gab.iepakojumā	BioMérieux (Francija)
<i>Petri</i> trauki	Ø 10 cm	Anumbra (Čehija)
Plastmasas cilpas	Looplast	LP Italiana spa (Itālija)
Sterili vates kociņi	10 gab. iepakojumā	Deltalab (Spānija)
Eppendorf mikromēģenes (centrifūgas stobriņi)	1,5mL	Deltalab, Spānija
Kriobankas	Plastmasas stobriņi paraugu uzglabāšanai saldētavā	Copan, ASV
Pipešu uzgaļi	100µ L, 200µ L, 1000µ L	Finntip, Somija

2.3. tabula

Izmantotā aparatūra, tās modelis un ražotājs, autores sastādīta tabula

Nosaukums	Modelis un ražotājs
Autoklāvs	MLS-302011, Sanyo (Japāna)
Ledusskapis un saldētava	Indesit (Itālija)
Mikroskops	Leica (Vācija)
Termostats	Heraeus (Vācija)

Velkmes skapis	ESCO (Vācija)
Turbidimetrs	BioMérieux (Francija)
Vortekss	Vortex V-01/3, Labotek (Dānija)
<i>BBL™ Crystal™</i> identifikācijas sistēma	Beckton Dickinson (ASV)
Ultraskaņas vanna	Emag EMMI 30HC (Emag AG, Vācija)
PCR termocikleris	Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystems, ASV)
<i>Mikropipetes</i>	P1000, 200, 100, 10 (Gilson, Vācija)
Centrifūga	MLS- 302011 (Sanyo, Japāna)
<i>TwinCubator</i>	Bruker (Vācija)

2.2. Metodes

2.1. *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēma

BBL™ Crystal™ sistēma ir standartizēta metode, kuru izmanto aerobo glikozes fermentējošu vai arī glikozes nefermentējošu baktēriju identifikācijai. Sistēma sastāv no plastmasa trauka ar 30 iedobēm, kurās atrodas dažādi fluorogēni un hromogēni dehidrēti enzimatiskie un bioķīmiskie substrāti, piemēram, fermentācijas, oksidācijas, degradācijas, hidrolīzes reakcijām.

Iedobēs tiek pievienots baktēriju saturošs inokulāts, pēc tam to inkubē 18-20 stundas 35°-37°C temperatūrā. Inkubācijas laikā sausie substrāti tiek rehidrēti un tiek veicināta reakciju sākšanās, kā rezultātā no baktēriju metaboliskās darbības rodas krāsu maiņa iedobēs. Tiek izmantota *BBL™ Crystal™* gaismas kārbā (*Light Box*), kā arī krāsu karte, ar kuras palīdzību tiek izvērtēta katra testa aktivitāte. Testi atrodas 3 rindās un attiecīgi, ja tests ir pozitīvs, tiek piešķirtas vērtības- 1,2 vai 4. Ja tests ir negatīvs, tad tiek piešķirta vērtība-0. Krāsu kartē katra kolonnas kopējo vērtību saskaita, kā rezultātā tiek iegūts 10 ciparu profila skaitlis. Lai identificētu baktēriju, šis profila skaitlis tiek ievadīts speciālā *BBL™ Crystal™* ID sistēmas elektroniskajā datu bāzē.

2.2. *GenoType® BC gramnegative tests*

2.2.1. DNS ekstrakcija

DNS ekstrahēšanai no kultivētā materiāla:

1. Ar inokulācijas cilpu paņem uz barotnes audzētas baktērijas un suspendē apmēram 300 µl dejonizēta ūdens
2. Inkubē baktērijas 20 minūtes 95 ° C temperatūrā ūdens vannā.
3. Inkubē 15 minūtes ultraskaņas vannā.
4. Centrifugē 30 minūtes pie 14 000 apgr./min.

Tiek iegūts atdalīts DNS, ko tālāk izmanto polimerāzes ķēdes reakcijas veikšanai.

2.2.2. Amplifikācija

Amplifikācijas procesā rodas viena gēna daudzas kopijas, ko veic termostabila polimerāze (Taq). Amplifikācijā atkārtotajos ciklu sērijas ietver šablona denaturāciju, praimera uzkaršēšanu to sacietinot, kam seko uzkaršēto praimeru izplešanās. Vienā ciklā sintezētās saites kalpo kā šablons nākamajam, un ar katru nākamo ciklu DNS daudzums pieaug divas reizes.

Sagatavo amplifikācijas maisījumu (45 µl) sterilā telpā, kurā nav DNS. Lai sagatavotu 45 µL amplifikācijas maisījumu ir nepieciešams - 35µL PNM (praimeru nukleotīdu maisījums), 5 µl 10x polimerāzes inkubācijas buferis (satur 15 mM MgCl₂), 2 µl 25 mM

MgCl₂ šķīdums, 0,2 µl (1 U) termostabila DNS polimerāze, 3 µl dejonizēta ūdens. Lai iegūtu kopējo amplifikācijas maisījuma daudzumu, kas ir 50 µL, tad atsevišķā darba vietā pievieno 5 µl (20- 100ng DNS) pētāmā DNS šķīdumu maisījumam. Amplifikāciju veic speciālā termociklerī, uzstādot attiecīgo programmu, veikto ciklu skaits ir apkopots 2.4. tabulā

2.4.tabula

Amplifikācijā veikto ciklu skaits attiecīgajā temperatūrā (°C) un laikā, autores sastādīta tabula

Laiks (s)	Temperatūra (°C)	Ciklu skaits (n)
900	95	1
30	95	10
120	58	
25	95	20
40	53	
40	70	
480	70	1

2.2.3. Hibridizācija

Praimeru nukleotīdu maisījums (PNM) satur biotinilētus praimerus baktēriju hromosomas specifisko reģionu amplifikācijai. Membrānas sloksnes ir pārklātas ar īpašām zondēm komplimentāri amplifikācijā iegūtajām nukleīnskābēm. Pēc ķīmiskās denaturācijas vienpavedienu amplikoni saistās ar zondēm (hibridizācija). Komplementāru DNS virkņu ļoti specifisko saistīšanos nodrošina apstākļi, kurus ietekmē bufera sastāvs un noteiktas temperatūras kombinācijas. Tādējādi zondes ticami izšķir dažādas baktēriju sugas. Streptavidīna konjugētā sārmainā fosfatāze caur streptavidīna daļu saistās ar amplikonu biotīnu. Visbeidzot, sārmainā fosfatāze pārveido pievienoto substrātu krāsvielā, kas kļūst redzama uz membrānas sloksnēm kā krāsainas nogulsnes. Hibridizācijai izmanto *GenoType® BC gramnegative* testa komplektu.

Hibridizācija:

1. Izmanto *TwinCubator*, kas ir iestatīts 45°C temperatūrā
2. Katras izmantotās iedobes stūrī jāpievieno 20 µl denaturācijas šķīdums (satur < 2% NaOH <0,001% timolzilā krāsvirla)
3. Šķīdumam pievieno 20 µl amplikona un inkubē istabas temperatūrā 5 minūtes
4. Katrā iedobē pievieno 1 ml hibridizācijas buferi HYB (satur surfaktantus)
5. Katrā iedobē ievieto *GenoType® BC gramnegative* testa komplektā pievienoto sloksni. Sloksni pilnībā jānosedz ar šķīdumu
6. Ievieto plastmamas iedobi *TwinCubator* un inkubē 30 minūtes 45 ° C temperatūrā

7. Pilnībā noņem hibridizācijas buferi, izmantojot pipeti
8. Katrai sloksnei pievieno 1 ml STR mazgāšanas šķīdumu, kas satur 1,5% NaCl un surfaktantus, un inkubē 15 minūtes 45 ° C temperatūrā *TwinCubator*
9. Pilnīgi jānoņem STR mazgāšanas šķīdums
10. Katru sloksni vienu reizi mazgā ar 1 ml skalošanas šķīdumu (RIN), kas satur 1% NaCl, un 1 minūti ievieto *TwinCubator*. Pēc tam ir jāizlej RIN šķīdums
10. Katrai sloksnei pievieno 1 ml atšķaidīta konjugāta CON-D (satur 1% apstādinošo reaģentu) un inkubē 30 minūtes uz *TwinCubator*
11. Jāizņem šķīdums ar pipeti un katra sloksne divas reizes jamazgā 1 minūti ar 1 ml RIN, pēc tam vienu reizi ar 1 ml destilēta ūdens 1 minūti
12. Katrā sloksnē pievieno 1 ml atšķaidīta substrāta CON-C (satur streptavidīna konjugēto sārmaino fosfatāzi) un inkubē, sargājot no gaismas, nekratot. Atkarībā no testa apstākļiem (piemēram, istabas temperatūras) substrāta inkubācijas laiks, t.i., laiks, līdz joslas ir skaidri redzamas, var mainīties no 3 līdz 20 minūtēm
13. Reakcija jāaptur tiklīdz joslas ir skaidri redzamas, īsi divreiz izskalojot ar destilētu ūdeni

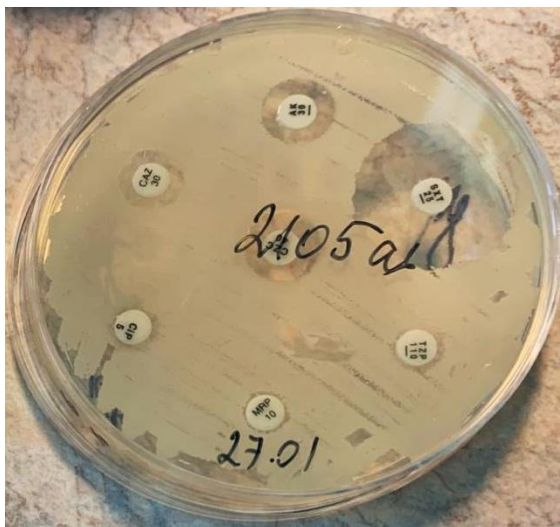
2.2.3. Bauer –Kirby™ disku difūzijas tests

Lai noteiktu mikroorganismu jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem kā vienu no metodēm var izmantot *Bauer –Kirby™* disku difūzijas testu (sk. 2.1.att.). Metodes pamatā ir baktērijas uzsēšana uz agara, pēc tam tiek pievienoti 6 mm papīra diski, kas ir piesātināti ar antibakteriālajiem līdzekļiem, kā rezultātā norisinās antibakteriālo līdzekļu difūzija agarā (Tankeshwar, 2013).

Lai veiktu baktērijas uzsēšanu uz agara, ir nepieciešams pagatavot inokulātu, kas tiek gatavots laminārā. Izmanto uz neselektīvas agara plates 18-24 stundas augušas baktēriju kolonijas – ar plastmasas cilpu paņem divas vai trīs neliela izmēra baktēriju kolonijas un tās suspendē fizioloģiskajā šķīdumā. Suspensijai tiek noteikta duļķainība, izmantojot turbidimetru, un tai ir jāatbilst 0,5 *McFarland* standartam. Šis standarts nodrošina optisko blīvumu, kas ir pielīdzināms ar baktērijas suspensijas $1,5 \times 10^8$ koloniju veidojošo vienību blīvumu (KVV / ml).

Ar inokulātu piesūcināto vates kociņu tiek blīvi vilktas svītras uz *Mueller -Hinton* agara plates, kas tiek darīts trīs reizes plati pagriežot 60° leņķī katru reizi. Izmantojot antibiotiku dispenseru, ar antibakteriālajiem līdzekļiem piesātinātie diski tiek uzlikti uz agara plates vienādā attālumā – vismaz 24 mm, lai nepārklātos inhibējošās zonas. Plates pēc tam tiek inkubētas termostatā 24 stundas un 36°C temperatūrā. Pēc inkubācijas, izmantojot lineālu, tiek mērīta inhibīcijas zonas, un vērtība tiek izteikta milimetros. Lai noteiktu baktērijas jutību

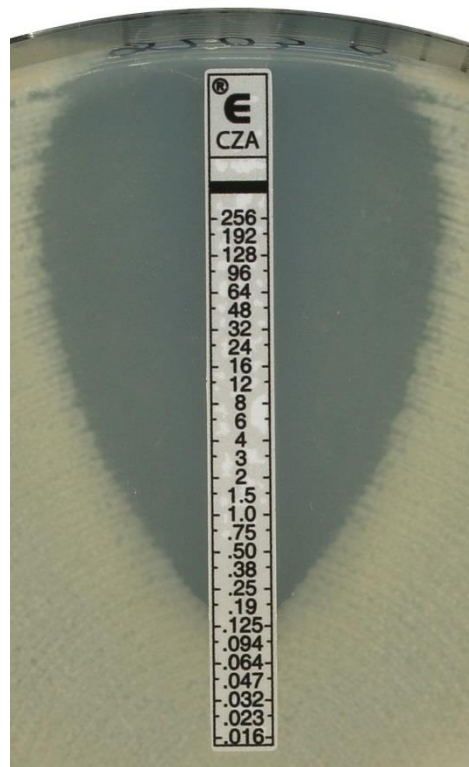
pret antibakteriālajiem līdzekļiem, izmanto tabulu, kurā ir apkopota informācija par antibakteriālo līdzekļu inhibējošās zonas lielumu milimetros, pēc kā var interpretēt datus vai mikroorganisms ir jutīgs (S), vidēji jutīgs (I) vai rezistents (R) pret izmantoto antibakteriālo līdzekli.



2.1. att. *Bauer –Kirby*TM disku difūzijas tests, autores foto

2.2.4. ETM-tests

Epsilometra testu (ETM-testu) definē kā eksponenciālā gradienta metodi, ar ko nosaka mikroorganismu jutību pret kādu konkrētu antibakteriālo līdzekli. Ar šo metodi iegūst MIK vērtību, t.i., noteiktas antibiotikas minimālo inhibējošo koncentrāciju $\mu\text{g} / \text{ml}$, kas noteiktos eksperimentālos apstākļos kavē konkrētas baktērijas augšanu. Lai veiktu ETM-testu, izmanto plānu, inertu un neporainu plastmasas sloksni. Vienai sloksnes pusei ir MIK nolāšanās skala $\mu\text{g} / \text{ml}$ un divu vai trīs burtu kods, lai apzīmētu antibiotikas identitāti. Iepriekš dozēts antibiotikas eksponenciālais gradients, žāvēts un stabilizēts, tiek imobilizēts uz otras sloksnes virsmas ar koncentrācijas maksimumu uz sloksnes augšdaļas un minimālo koncentrāciju pie sloksnes apakšdaļas. Antibakteriālā līdzekļa gradients sastāv no 15 divkārtējās koncentrācijas atšķaidījumiem. Uz *Mueller –Hinton* barotnes, uz kura ir uzklāts inokulāts (pagatavošana un uzklāšana aprakstīta pie DDT metodes), ar pinceti tiek novietota E-testa sloksne ar “E galu” augšpusē, un notiek antibakteriālā līdzekļa difūzija agarā. Plati inkubē termostatā 18-24 h 37°C temperatūrā. MIK vērtību nosaka vietā, kur elipse šķērso skalu / ETM-testa sloksni (sk. 2.2.att.) (Tankeshwar,2015).



2.2. att. ETM-tests

Attēls no BioMérieux [tiešsaiste] –(atsauce 2020. gads).

Pieejams internetā: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/etest-ceftazidime-avibactam-cza-256>

2.2.5. Fenotipēšana izmantojot antibiogrammas

Lai sagrupētu baktērijas pēc to jutības pret antibakteriālajiem līdzekļiem, tika izmantota fenotipēšana. Lai noteiktu mikroorganismu fenotipus, tika izmantotas antibiogrammas, kurās ir apkopota informācija par klīnikas mikrobioloģijas laboratorijā izolēto mikroorganismu paraugu skaitu un to jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem noteiktā laikā periodā. Antibiogrammas datus veido disku difūzijas, ETM-testa rezultāti par mikroorganismu jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem. Pēc antibiogrammā apkopotajiem rezultātiem ir iespēja izvēlēties efektīvāko antibakteriālo līdzekli mikroorganismu izraisīto infekciju ārstēšanai, novērot mikroorganismu rezistenci - vai tai ir tendence palielināties/samazināties laika periodā (Joshi, 2010).

2.2.6. Biofilmas producēšanās noteikšana

Lai noteiktu *P. aeruginosa* un *A. baumannii* spēju veidot biofilmas, izmanto mikrotitru plates metodi, kas ir modificēta pēc *Christensen et al.*, 1987 metodes. Pagatavo *P. aeruginosa* un *A. baumannii* suspensiju, izmantojot baktēriju kolonijas, kas suspendētas dejonizētā ūdenī. Baktēriju suspensijas tiek inkubētas 10% triptikāzes sojas buljonā 37°C 24 stundas. Pēc tam tiek pagatavots atšķaidījums, izmantojot dejonizētu ūdeni attiecībā 1:100, un no kura ņem 200 µL, kas tiek tālāk inokulēts sterilā 96 lauciņu polistirēna mikrotitres plates trijos lauciņos. Vienā lauciņā ievieto sterilu triptikāzes sojas buljonu, kas tiek izmantota kā negatīva kontrole.

Mikrotitres plati inkubē 37°C temperatūrā 24 stundas. Kad ir pagājis inkubācijas periods, nolej no plates suspensiju un divreiz to pārskalo ar 0,9% NaCl šķīdumu. Kad plate ir pārskalota, to liek žāvēties 55°C temperatūrā 45 minūtes. Pēc žāvēšanas tiek izmantota 0,5% safranīna šķīdums, lai nokrāsotu mikrotitru plates lauciņus. 10 minūtes pēc uzliktā 0,5% safranīna šķīduma mikrotitru plate tiek pārskalota ar 0,9% NaCl šķīdumu. *P. aeruginosa* un *A. baumannii* paraugu spēja veidot biofilmas tiek izvērtīti vizuāli.

2.2.7. Datu statistiskā analīze

Datu apstrāde tika veikta ar datorprogrammu *Microsoft Excel* 2016. Dati, kuri tika iegūti aprēķinot procentuālās attiecības, tika apkopoti tabulu veidā, kā arī veidotas dažāda veida diagrammas vizuālai datu atspoguļošanai.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Globāli antibiotiku rezistence ir viena no nopietnākajām veselības problēmām. Pārmērīgas un nepareizas antibiotiku lietošanas rezultātā rodas antibiotiku rezistence, un ar vien mazāk paliek efektīvu antibiotiku, ko var lietot izraisīto infekciju ārstēšanā. Antibiotiku rezidences dēļ ir lielākas medicīniskās izmaksas, ilgstoša uzturēšanās slimnīcā un palielināts mirstības līmenis. *P. aeruginosa* un *A. baumannii* izraisa dažādas infekcijas, kā piemēram, sepsi, pneimoniju (ar ventilatoru-saistītā), urīnceļu, ādas un mīksto audu, ar katetru saistītās infekcijas. Abi patogēni ir plaši izplatīti ar veselības aprūpi saistītajās iestādēs. Dažādi to virulances faktori, antibiotiku rezidences mehānismi un biofilmu veidošana nodrošina adaptēšanos vidē un izdzīvošanu. Visā pasaulē, tajā skaitā arī Latvijā, antibiotiku rezistence tikai pieaug.

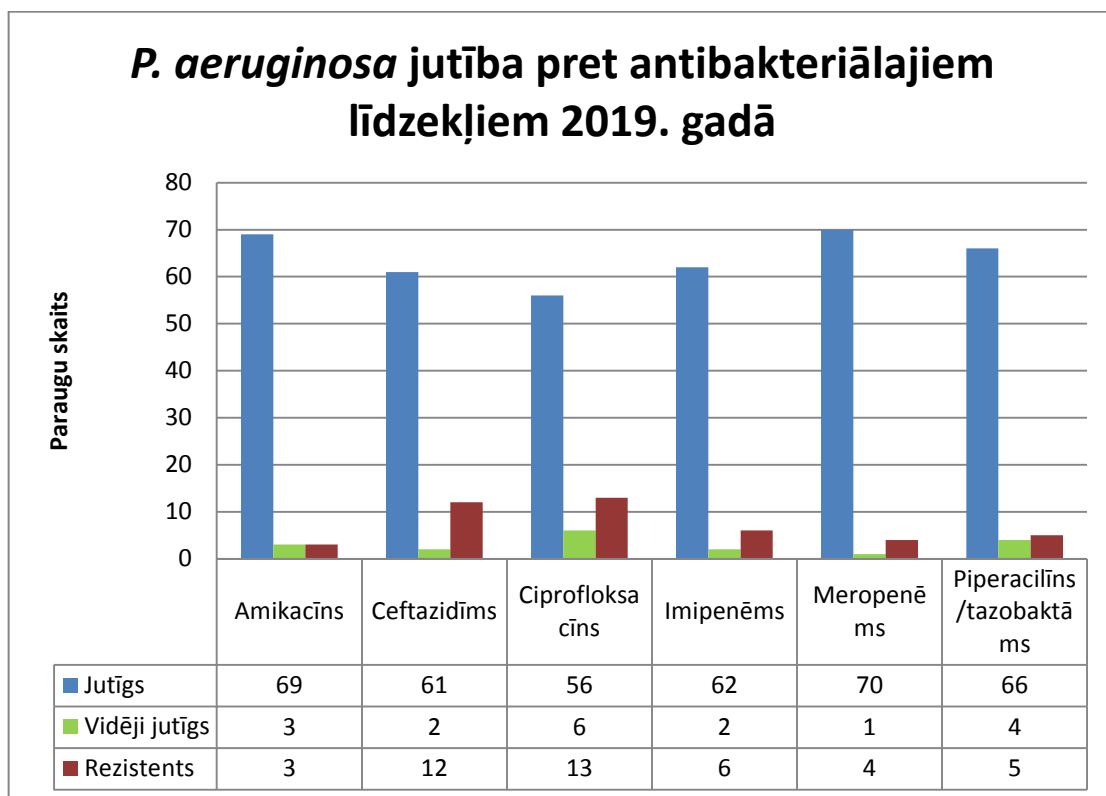
3.1. *P. aeruginosa* un *A. baumannii* jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem 2019. gadā

2019. gadā kopumā no 3992 elpceļu izolātiem 75 bija *P. aeruginosa*, kas ir 1,88%. 2019. gadā *P. aeruginosa* paraugiem tika pētīta jutība pret sešiem antibakteriālajiem līdzekļiem, kas pieder pie aminoglikozīdu klases (amikacīns), β - laktāma grupas cefalosporīnu klases (III paaudzes cefalosporīns-ceftazidīms), fluorohinolonu klases (ciprofloksacīns), β - laktāma grupas karbapenēmu klases (imipenēms, meropenēms), β -laktāma grupas ureidopenicilīna klases kombinācijā ar β -laktamāzes inhibitoru (piperacilīns/tazobaktāms). 2019. gadā vidējā jutības vērtība pret antibakteriālajiem līdzekļiem bija 86,32%. *P. aeruginosa* paraugiem vislielākā jutība tika novērota pret meropenēmu, kas ir 93,33%. *P. aeruginosa* paraugu jutība pret amikacīnu, imipenēmu, piperacilīnu/tazobaktāmu ir virs vidējās jutības vērtības, kas ir 92% , 88,57%, 88% attiecīgi. Jutība pret ceftazidīmu un ciprofloksacīnu ir zem vidējās jutības vērtības, kas ir 81,33% un 74,67% attiecīgi.

Starp identificētajiem *P. aeruginosa* paraugiem, vislielākā vidējā jutība tika novērota pret ciprofloksacīnu, kas ir 8%. Vidējā jutība pret piperacilīnu/tazobaktāmu un amikacīnu tika novērota attiecīgi 5,33% un 4%. Zemākās vidējās jutības vērtības tika konstatētas pret imipenēmu, ceftazidīmu, meropenēmu, kas attiecīgi bija 2,67%, 2,86% un 1,33%.

2019. gadā starp *P. aeruginosa* paraugiem pret ciprofloksacīnu tika novērota vislielākā rezistence, kas ir 17,33%. Arī pret ceftazidīmu tika konstatēta salīdzinoši liela rezistence, kas ir 16%. Pret pārējiem antibakteriālajiem līdzekļiem tika novērota rezistence zem rezidences

vidējās vērtības, kas ir 9,65%. Pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu- tika novērota rezistence attiecīgi 8,57% un 5,34%. Pret piperacilīnu/tazobaktāmu tika novērota rezistence 6,67% un pret amikacīnu – 4%. *P. aeruginosa* eplceļu izolātu jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem ir apkopota 3.1. attēlā



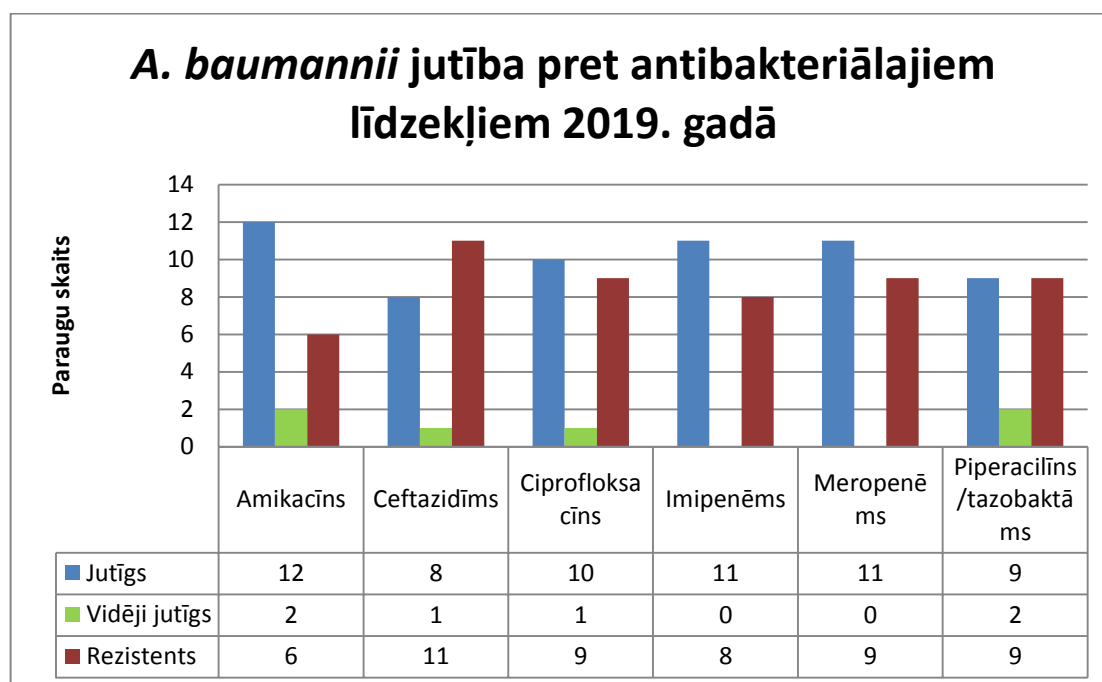
3.1. att. *P. aeruginosa* jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem 2019. gadā

2019. gadā kopumā no 3992 elpceļu izolātiem 20 bija *A. baumannii* izolāti, kas ir 0,50%. 2019. gadā *A. baumannii* jutība tika pētīta pret tiem pašiem antibakteriālajiem līdzekļiem kā pret *P. aeruginosa*. No 20 identificētajiem *A. baumannii* paraugiem, vislielākā jutība tika novērota pret amikacīnu, kas ir 60%. Antibakteriālie līdzekļi, kuriem jutība bija virs vidējās jutības vērtības (51,32%), bija pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu- jutība attiecīgi tika noteikta 57,89% un 55%, lai gan šī jutība ir virs vidējās jutības, šī β – laktāma grupas klase paliek neefektīvāka infekciju ārstēšanā. Jutība pret ciprofloksacīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu, ceftazidīmu tika novērota zem vidējās jutības vērtības, kas ir attiecīgi 50%, 45% un 40%.

No identificētajiem *A. baumannii* paraugiem vislielākā vidējā jutība tika noteikta pret amikacīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu, kas attiecīgi ir 10%. Gan pret ceftazidīmu, gan pret

ciprofloksacīnu tika noteikta vidējā jutība, kas ir 5%. Pret karbapenēmiem netika noteikta vidējā jutība.

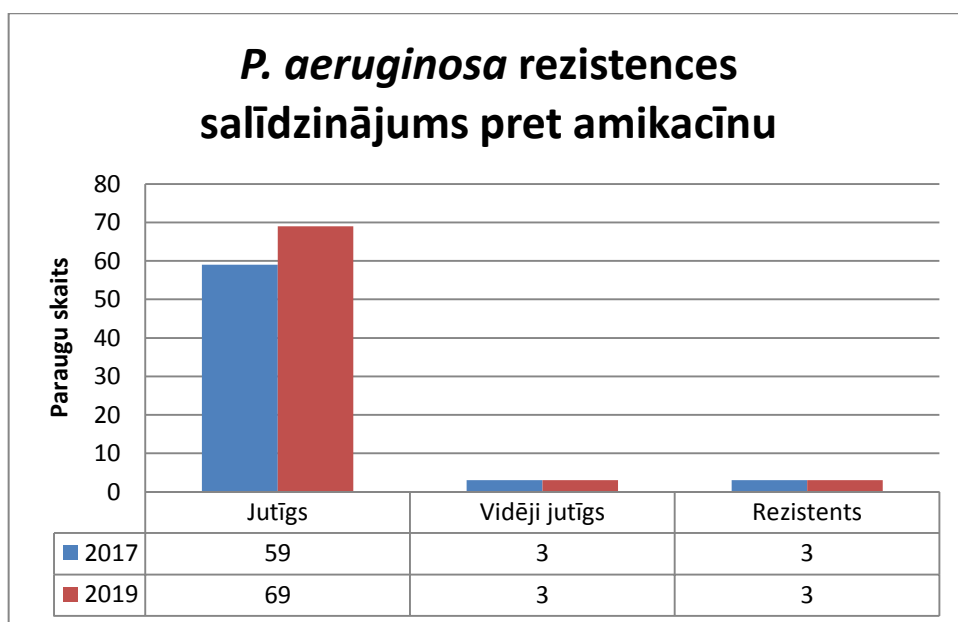
Apkopjot datus par identificēto *A. baumannii* 20 paraugu rezistenci, vislielākā rezistence tika noteikta pret ceftazidīmu, kas ir 55%. Rezistence pret karbapenēmiem - imipenēmu, meropenēmu - attiecīgi ir 42,11% un 45%. Rezistence gan pret ciprofloksacīnu, gan pret piperacilīnu/tazobaktāmu ir 45%, kas arī ir nedaudz virs vidējās rezistences vērtības - 43,67%. Vienīgais antibakteriālais līdzeklis, kura rādītājs ir zem vidējā rezistences vērtības ir amikacīns -30%. Dati par *A. baumannii* elpceļu izolātu jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem ir apkopoti 3.1.1. attēlā.



3.1.1. att. *A. baumannii* jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem 2019. gadā

3.2. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret amikacīnu starp 2017. un 2019. gadu

Pētot *P. aeruginosa* rezistences salīdzinājumu pret amikacīnu, kas pieder pie aminoglikozīdu antibiotikas grupas, tika iegūts, ka 2017. gadā jutīgi ir 59 paraugi (90,76%), vidēji jutīgi trīs paraugi (4,69%), bet rezistenti bija trīs paraugi (4,62%). 2019. gadā jutīgo paraugu skaits ir palielinājies, kas ir 69 (92%), vidēji jutīgi paraugi arī bija trīs (4%), kā arī rezistenti paraugi bija trīs (4%). Salīdzinot abus gadus, procentuāli šie dati ir līdzīgi. *P. aeruginosa* rezistence ir samazinājusies par 0,62%. Vidēji jutīgu paraugu skaits arī samazinājies par 0,62%, bet jutība ir palielinājusies par 1,24%. Dati apkopoti 3.2. attēlā.

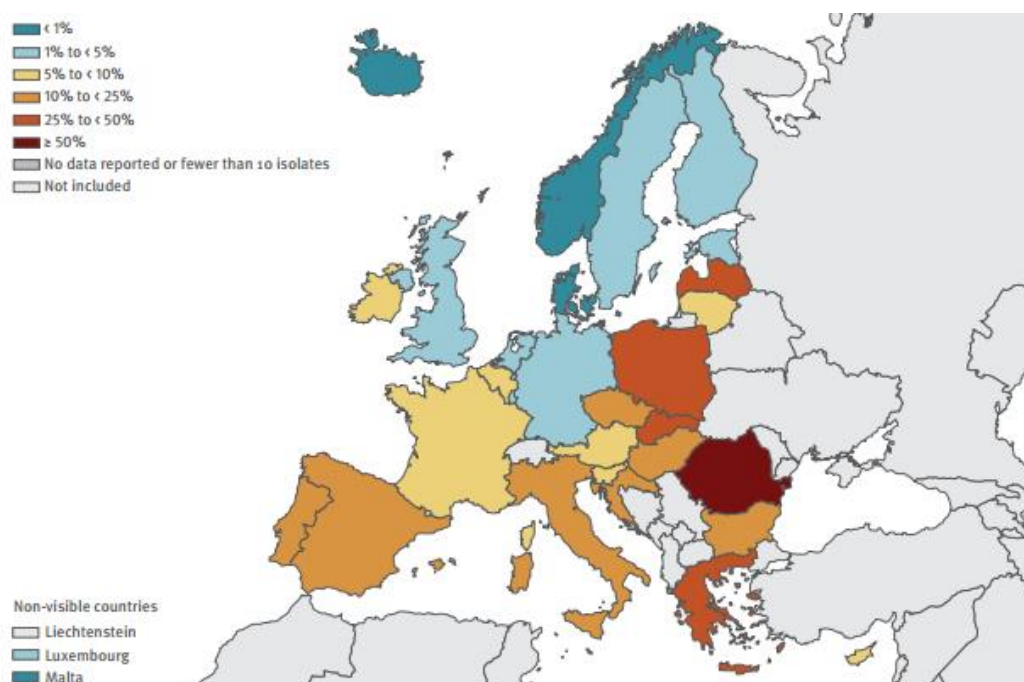


3.2. att. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret amikacīnu starp 2017. un 2019. gadu

Pēc EARS-net 2018. gadā publicētajiem datiem par *P. aeruginosa* invazīvo paraugu rezistenci pret aminoglikozīdiem var secināt, ka rezistence pret šo antibakteriālo līdzekli ir izplatīta problēma ES/EEZ valstīs. Vislielākā rezistence tika novērota Rumānijā – no 146 paraugiem 50,7% bija rezistenti, un tā ir vienīgā valsts, kas pārsniedz EARS-net noteikto $\geq 50\%$ rezistences robežas vērtību. Četrās valstīs – Slovākijā, Grieķijā, Polijā, kā arī Latvijā tika noteikta 25-50% rezistences robežas vērtība (sk. 3.2.1. att.). 2018. gadā Latvijā no 39 invazīvajiem paraugiem 28, 2% bija rezistenti. Salīdzinot laika periodu (2015.-2018. gadam) *P. aeruginosa* invazīvo paraugu skaits ir salīdzinoši ievērojami pieaudzis. Salīdzinot rezistences izmaiņas laika gaitā, 2015. gadā bija 11 paraugi un no tiem rezistenti bija 9,1% , bet 2018. gadā bija izolēti 39 paraugi un no tiem rezistenti bija 28,2%, kas nozīmē, ka rezistence ir palielinājusies par 19,1%. Salīdzinot 2018. gadu un 2017. gadu, kur no 14 paraugiem rezistenti bija 42,9%, rezistence ir samazinājusies par 14,7% (Surveillance report, 2019).

Pētījumā iegūtie rezultāti ir atšķirīgi par EARS-net rezultātiem, jo gan 2017. gadā, gan 2019. gadā pret amikacīnu tika novērota viena no lielākajām jutībām, kas ir attiecīgi 90,77% un 92% un līdz ar to rezistences rādītāji bija mazāki, kas ir attiecīgi 4,62% un 4%. Šie rezultāti varētu būt atšķirīgi, jo EARS-net pētījumā ir izmantoti tikai invazīvie paraugi (no asinīm, cerebrospinalā šķidrums), bet maģistra darba izstrādes laikā tika iegūti *P. aeruginosa* izolāti no elpceļiem. Salīdzinot rezistences izmaiņas laika posmā no 2016.-2019, tika secināts, ka pētījumā iegūtie dati par rezistences tendences izmaiņām ir līdzīgi par EARS-net

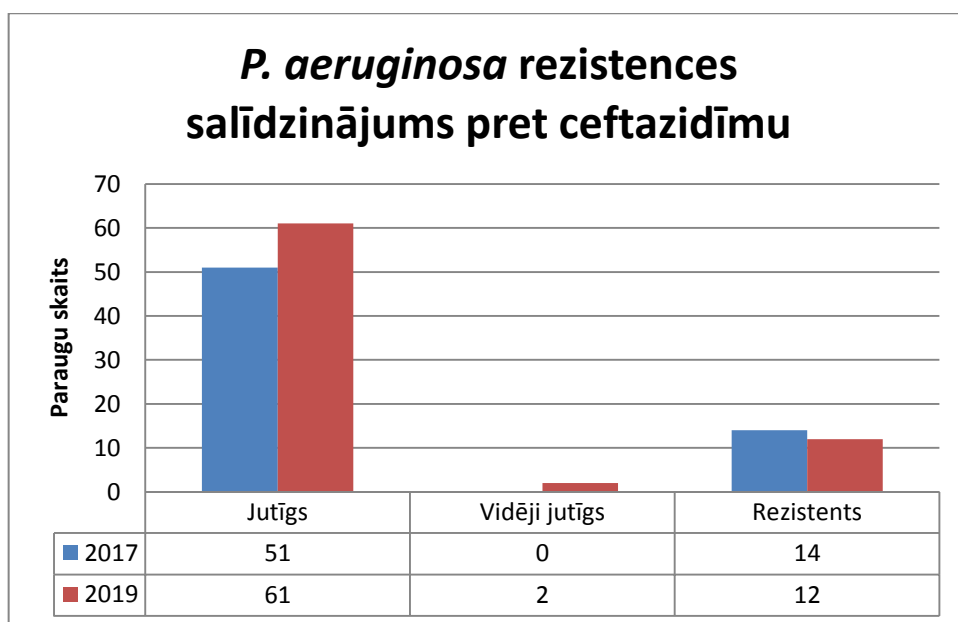
publicētājiem. Salīdzinot ar bakalaura darbā iegūtajiem datiem par 2016. gadu (Alksne, 2018), kur divi paraugi bija rezistenti (4,55%), un 2019. gadu, kurā trīs paraugi bija rezistenti (4%), rezistence ir samazinājusies par 0,55% . Salīdzinot 2019. gadu un 2017. gadu kur rezistentie paraugi bija 4,62%, rezistence ir samazinājusies par 0,62%. Salīdzinot 2017. gadā iegūtos datus gan no EARS-net, gan maģistra pētījuma izstrādes laikā, var secināt, ka 2017. gadā tika novēroti rezistentāki paraugi.



3.2.1. att. EARS-net informācija par *P. aeruginosa* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret aminoglikozīdiem ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

3.3. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ceftazidīmu starp 2017. un 2019. gadu

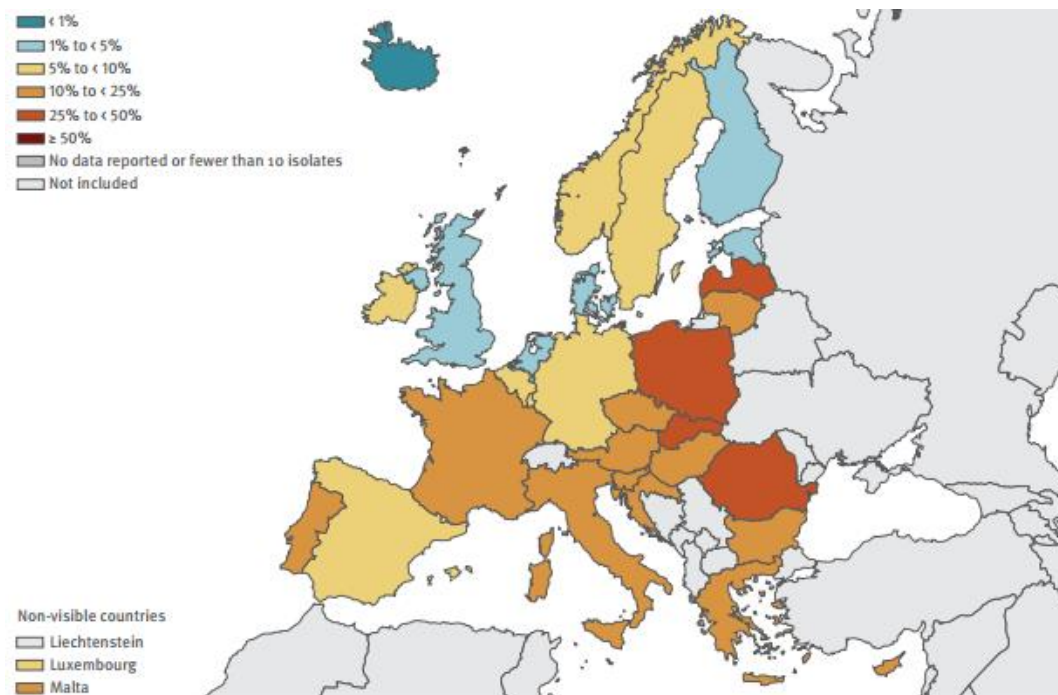
2017. gadā *P. aeruginosa* elpceļu izolāti pret ceftazidīmu bija jutīgi 51 (78,46%), nebija noteikts vidēji jutīgi paraugi, bet rezistenti bija 14 (21,54%). 2019. gadā 69 (81,33%) paraugi bija jutīgi pret ceftazidīmu, kā arī tika noteikti divi (2,67%) vidēji jutīgi paraugi, bet rezistenti bija 12 (16%). Salīdzinot abus gadus, *P. aeruginosa* paraugu jutība pret ceftazidīmu ir palielinājusies par 2,87%, bet rezistence samazinājusies par 5,54%. Palielinājies ir vidēji jutīgu *P. aeruginosa* paraugu skaits, kas ir par 2,67%. Dati apkopoti 3.3. attēlā.



3.3. att. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ceftazidīmu starp 2017. un 2019. gadu

Pēc 2018. gadā apkopotajiem EARS-net datiem, četrās valstīs – Rumānijā, Slovākijā, Polijā, kā arī Latvijā tika novērota *P. aeruginosa* invazīvo paraugu rezistence pret ceftazidīmu, kas ir 25 - <50% rezistences robežas vērtībā. Vislielākā rezistence tika novērota Rumānijā, kur no 152 paraugiem rezistenti bija 46,7%. Pēc tam seko Latvija, kur no 39 paraugiem rezistenti bija 33, 3% (sk.3.3.2. att.). Neviena valsts, kurā nebija noteikta *P. aeruginosa* rezistents paraugs pret ceftazidīmu bija Īslande. Salīdzinot Latvijā fiksētos datus par 2018. gadu un 2015. gadu, kur no 13 izolātiem 23, 1% bija rezistenti, rezistence ir palielinājusies par 10,2%. Salīdzinot 2018. gadu un 2017. gadu, kur no 14 paraugiem bija 42,9% rezistenti, rezistence ir samazinājusies par 9,6% (Surveillance report, 2019).

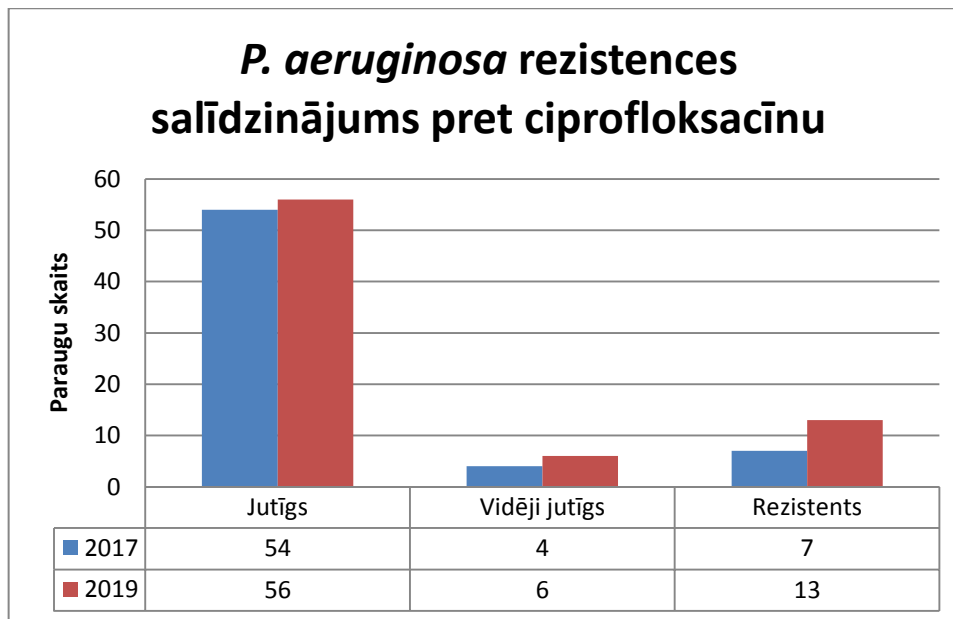
Pētījuma izstrādes ietvaros, tika iegūts, ka 2017. gadā rezistentie paraugi bija 21,54%, kas ir ievērojami mazāks rezistentu paraugu skaits, salīdzinot ar EARS-net datiem par 2017. gadu. Rezultāts, kas iegūts pētījuma laikā var būt atšķirīgi ar EARS-net, jo kā iepriekš minēts, pētījumā ir izmantoti izolāti no elpceļiem, bet EARS-net apkopoti rezultāti no invazīviem paraugiem. Pētījumā tika iegūti līdzīgi dati kā EARS-net par rezistences palielināšanos un samazināšanos tendenci. Salīdzinot bakalaurā iegūtos datus par 2016. gadu, kur rezistentie paraugi bija 5 (11,36%) (Alksne, 2018), un 2019. gadu, rezistence ir palielinājusies par 4,64%. Salīdzinot 2017. gadu un 2019. gadu, rezistence ir samazinājusies par 5,54%, kas ir pozitīva tendence, kas nozīmē, ka *P. aeruginosa* izolāti kļūst jutīgāki pret šo antibakteriālo līdzekli.



3.3.1. att. EARS-net informācija par *P. aeruginosa* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret ceftazidīmu ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

3.4. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ciprofloksacīnu starp 2017. un 2019. gadu

2017. gadā *P. aeruginosa* 54 paraugi no 65 bija jutīgi pret ciprofloksacīnu, kas ir 83,08%. Vidēji jutīgi bija četri paraugi (6,15%), bet rezistenti 7 paraugi (10,77%). 2019. gadā jutīgu paraugu skaits pret ciprofloksacīnu bija 56 (74, 67%), vidēji jutīgi bija 6 (8%). 2019. gadā ir palielinājies identificēto rezistentu paraugu skaits, kas ir 13 (17,33%). Salīdzinot abus gadus, *P. aeruginosa* jutība pret antibakteriālo līdzekli ciprofloksacīnu, kas pieder pie fluorohinolonu grupas, ir samazinājusies par 8,41%. Vidēju jutīgu paraugu skaits ir palielinājies par 1,85%, kā arī rezistentu paraugu skaits ir palielinājies, kas ir par 6,56%. Dati apkopoti 3.4. attēlā.

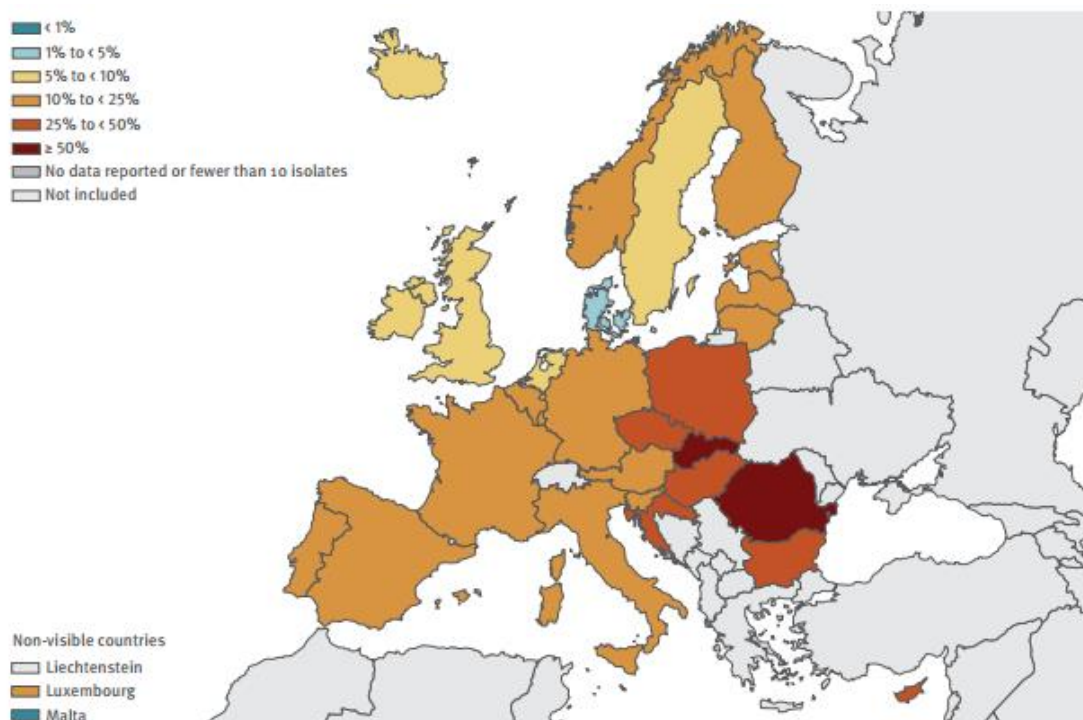


3.4. att. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ciprofloksacīnu starp 2017. un 2019. gadu

Pēc EARS-net apkopotajiem datiem, 2018. gadā ir divas valstis, kurās rezistence pret fluorohinoloniem pārsniedz $\geq 50\%$ robežu, un tās ir Slovākija, kur no 252 invazīvajiem paraugiem rezistenti bija 52,4%, un Rumānija – no 155 paraugiem 52,3% ir rezistenti. 2018. gadā Latvijā no 39 paraugiem rezistence pret fluorohinoloniem tika noteikta 23,1%, kas pieder pie 10%–<25% rezistences robežas (sk.3.4.1. att.). Salīdzinot 2015. gadu ar 2018. gadu, rezistence ir nemainīga, kas ir 23,1%. Salīdzinot 2018. gadu ar 2017. gadu, kurā no 14 paraugiem rezistenti bija 64,3%, rezistence ir samazinājusies par 41,2%, kas ir ievērojama vērtība, lai gan 2018. gadā tika noteikts lielāks paraugu skaits, un pārrēķinot rezistentu paraugu skaitu abos gados sanāk, ka gan 2017. gadā, gan 2018. gadā bija 9 rezistenti paraugi. Neviens rezistents fluorohinolona paraugs 2018. gadā nebija reģistrēts Maltā. Četrām valstīm, kā piemēram, Norvēģijai, Nīderlandei, Austrijai, Somijai, Lielbritānijai, rezistencei ir tendence palielināties (Surveillance report, 2019).

Salīdzinot ar pētījumā iegūtajiem datiem – 2019. gadā pret fluorohinolonu (ciprofloksacīnu) rezistence bija 17,33%, kas ir līdzīgi kā noteikts EARS- net datubāzē, un arī iekļaujas 10%–25% rezistences robežas vērtībā. Pētījumā iegūtie rezultāti neparāda, ka droši var apgalvot, ka rezistencei ir tendence tikai palielināties, jo izmantojot bakalaura izstrādes laikā iegūtos datus par 2016. gadu (Alksne, 2018), rezistence pret ciprofloksacīnu ir mainīga. Salīdzinot 2019. gadu ar 2017. gadu, kur rezistence ir 10,77%, gadu laikā tā ir palielinājusies par 6,56%, bet salīdzinot 2019. gadu ar 2016. gadu, kur rezistence bija novērota 18,18%, rezistence ir samazinājusies par 0,85%. Iegūtie rezultāti varētu būt saistīti ar to, ka

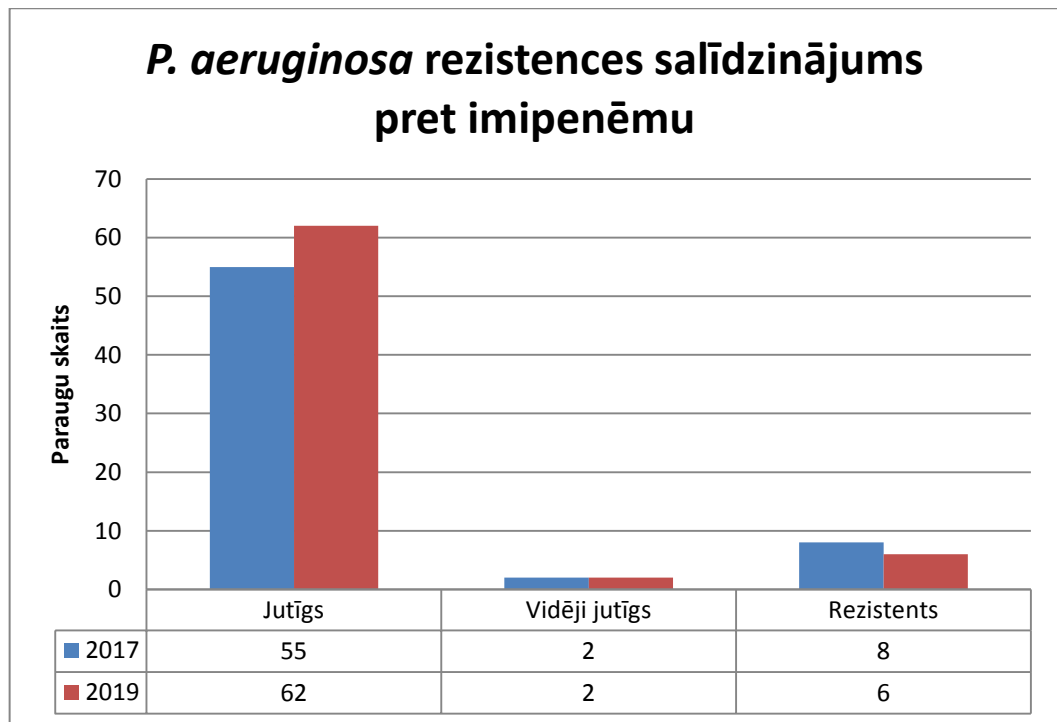
mikroorganisms šo gadu laikā ir ieguvis rezistences gēnus - *gyrA* un *parC*, kā rezultātā ciprofloksacīns kļuvis par mazāk efektīvu antibakteriālo līdzekli.



3.4.1. att. EARS-net informācija par *P. aeruginosa* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret fluorohinoloniem ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

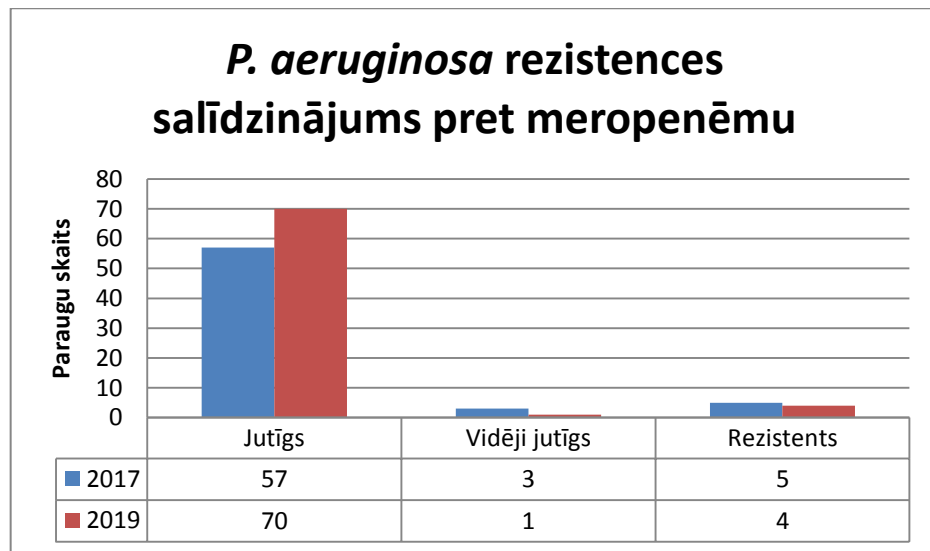
3.5. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret karbapenēmiem starp 2017. un 2019. gadu

P. aeruginosa 55 paraugi (84,61%) no 65 paraugiem 2017. gadā bija jutīgi pret karbapenēma klases antibiotiku – imipenēmu. Vidēji jutīgi bija 2 (3,08%), bet tika identificēti 8 (12,31%) rezistenti paraugi. Salīdzinot ar 2017. gadu, 2019. gadā *P. aeruginosa* jutīgu paraugu skaits bija lielāks, kas ir 62 (88,57%). Vidēji jutīgi paraugi bija divi (2,86%), rezistenti 6 (8,57%). Salīdzinot abus gadus, *P. aeruginosa* jutīgo paraugu skaits ir palielinājies par 3,96%, vidēji jutīgu paraugu skaits ir samazinājies par 0,22%, rezistentu paraugu skaits ir samazinājies par 3,74%. Dati apkopoti 3.5. attēlā. Salīdzinot ar bakalaura darba izstrādes laikā iegūtajiem datiem (Alksne, 2018), 2016. gadā, kur rezistentu paraugu skaits bija 6 (13,64%), tad rezistence pret imipenēmu četrus gadus laikā ir samazinājusies par 5,07%.



3.5. att. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret imipenēmu starp 2017. un 2019. gadu

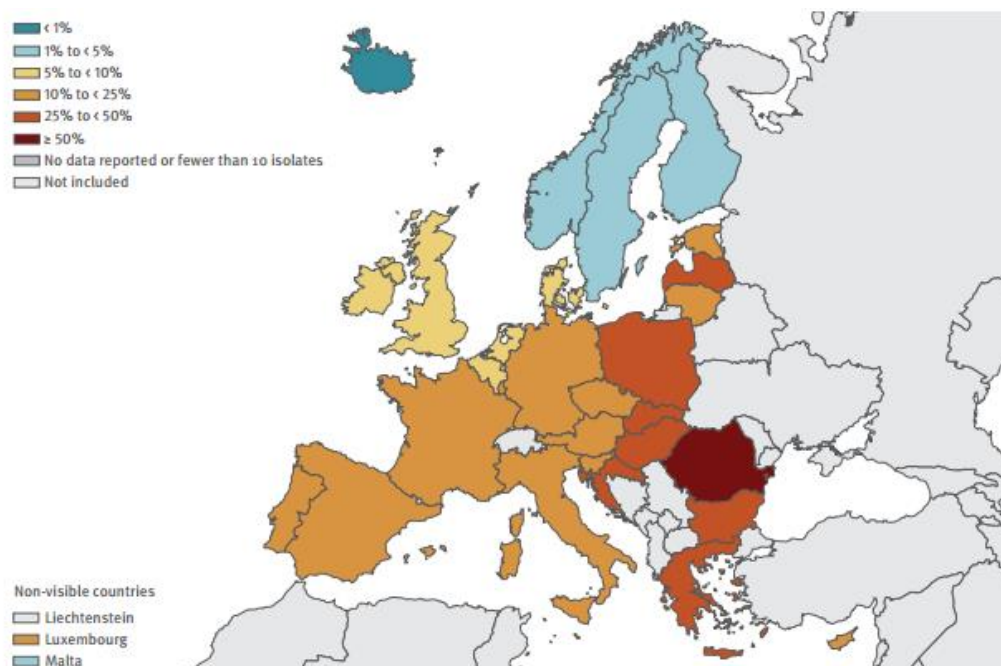
2017. gadā 57 no 75 *P. aeruginosa* paraugiem bija jutīgi pret otru karbapenēmu klases antibiotiku - meropenēmu, kas ir 87,69%. Vidēji jutīgu paraugu skaits bija trīs (4,62%), bet rezistenti bija pieci (7,69%). 2019. gadā tika identificēti 70 jutīgi paraugi pret meropenēmu, kas ir 93,33%. Vidēji jutīgi bija viens paraugs (1,33%), un rezistenti paraugi tika identificēti četri (5,34%). Salīdzinot abus gadus, jutība pret meropenēmu ir palielinājusies par 5,64%, vidēji jutīgu paraugu skaits ir samazinājies par 3,29%, rezistentu paraugu skaits ir samazinājies par 2,35%. Dati apkopoti 3.5.1. attēlā. Salīdzinot ar bakalaura darba izstrādes laikā iegūtajiem datiem (Alksne, 2018), 2016. gadā, kur rezistentu paraugu skaits bija 8 (18,18%), tad rezistence pret meropenēmu četrus gadus laikā ir samazinājusies par 12,84%.



3.5.1. att. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret meropenēmu starp 2017. un 2019. gadu

Pēc 2018. gadā publicētajiem EARS-net datiem par *P. aeruginosa* invazīvo paraugu rezistenci pret karbapenēmiem var secināt, ka karbapenēmu rezistentie paraugi ir izplatīti ES/EEZ. Vislielākā rezistence pret karbapenēmiem tika novērota Rumānijā, kur no 156 paraugiem 55,1% bija rezistents, un tā ir vienīgā valsts, kurai ir noteikta karbapenēmu rezistence $\geq 50\%$ rezistences robežā. 7 valstīs – Slovākijā, Grieķijā, Ungārijā, Polijā, Latvijā, Horvātijā, tika noteikta karbapenēmu rezistences robeža 25%-50% (sk.3.5.2 . att.). Valsts, kurā netika noteikts neviens karbapenēmu rezistents paraugs bija Īslande. Salīdzinot rezistences izmaiņas, Latvijā 2015. gadā no 13 paraugiem rezistenti bija 15,4%, bet 2018. gadā no 39 paraugiem rezistenti bija 28,2%, kas nozīmē, ka rezistence ir palielinājusies par 12,8%. Salīdzinot 2018. gadu un 2017. gadu, kurā no 14 paraugiem rezistenti bija 57,1 %, rezistence ir samazinājusies par 28,9%, kas ir ievērojama vērtība (Surveillance report, 2019).

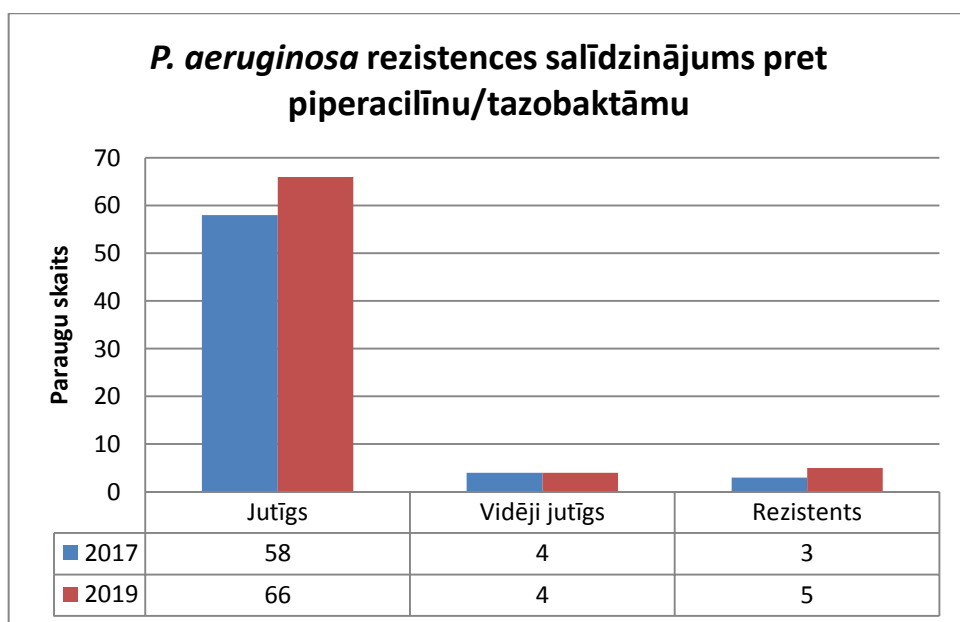
Maģistra darba izstrādes laikā tika iegūts, ka pret meropenēmu tika noteikta vislielākā jutība no visiem pētītajiem antibakteriālajiem līdzekļiem, kas ir 93,33%. Salīdzinot rezistences samazināšanos vai palielināšanos ar pētījumā iegūtajiem datiem un EARS-net apkopotajiem datiem, rezultāti atšķiras, jo pētījumā novērojama pozitīva tendence rezistencei pret karbapenēmiem tikai samazināties, kas nozīmē, ka *P. aeruginosa* MBL producējošo baktēriju skaits samazinās.



3.5.2. att. EARS-net informācija par *P. aeruginosa* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret karbapenēmiem ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

3.6. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret piperacilīnu/tazobaktāmu starp 2017. un 2019. gadu

Pret piperacilīnu/tazobaktāmu 2017. gadā tika identificēti 58 (89,23%) *P. aeruginosa* jutīgi paraugi, vidēji jutīgi bija četri (6,15%), rezistenti paraugi bija trīs (4,62%). 2019. gadā tika identificēti 66 jutīgi *P. aeruginosa* paraugi (88%). Tāpat kā 2017. gadā, arī 2019. gadā tika identificēti četri vidēji jutīgi paraugi (5,33%). *P. aeruginosa* rezistenti paraugi pret šo antibakteriālo līdzekli bija pieci, kas ir 6,67%. Salīdzinot abus gadus, iegūtie dati par *P. aeruginosa* paraugu jutību ir procentuāli līdzīgi, bet rezistence pret piperacilīnu/tazobaktāmu ir palielinājusies par 2,05%. Tā kā rezistence ir palielinājusies, tad jutība ir samazinājusies par 1,23%. Vidēji jutīgu paraugu skaits ir palielinājies par 2,05%. Dati apkopoti 3.6. attēlā.

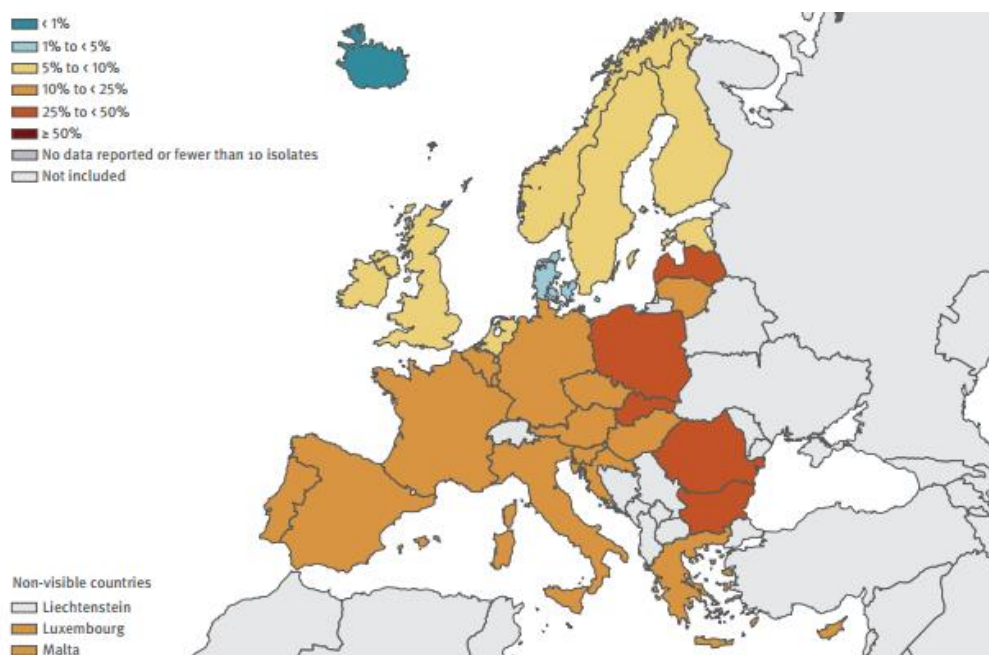


3.6. att. *P. aeruginosa* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret piperacilīnu/tazobaktāmu starp 2017. un 2019. gadu

Pēc 2018. gada EARS- net datiem rezistence pret piperacilīnu/tazobaktāmu Eiropā/Eiropas Ekonomikas zonu valstīs ir izplatīta, sasniedzot dažās valstīs, tajā skaitā Latvijā, 25%-50% rezistences robežas vērtību (sk.3.6.1. att.). Vislielākā rezistence ir novērojama pret šo antibakteriālo līdzekli Rumānijā – no 138 invazīvajiem paraugiem 49,3% bija rezistenti. Valstis, kurās tika novērota rezistence robežās no 25% līdz 50%, ir Polija, Slovākija, Bulgārija un, kā jau iepriekš pieminēts – Latvija. Valsts, kurā netika noteikts neviens rezistents paraugs bija Īslande. 2018. gadā Latvijā no 39 invazīvajiem paraugiem 35,9%. Salīdzinot 2015. gadu ar 2018. gadu, 2015. gadā no 13 paraugiem 23,1 % bija rezistenti, kas nozīmē, ka rezistence ir palielinājusies par 12,8%. 2017. gadā tika konstatēti 14 paraugi, no kuriem rezistenti bija 35,7%. Salīdzinot 2017. gadu ar 2018. gadu, identificēto *P. aeruginosa* paraugu skaits ir ievērojami palielinājies, kā arī rezistence ir nedaudz palielinājusies – par 0,2%. Ne tikai Latvijā ir novērota šī rezistences palielināšanās tendence, bet arī Francijā, Kiprā. Rezistences samazinājums tika novērots Lielbritānijā, Horvātijā, Vācijā, Itālijā (Surveillance report, 2019).

Pētījumā iegūtie dati atšķiras par EARS-net publicētajiem - tika novērots krietni mazāks rezistentu paraugu skaits, kas bija pieci paraugi. Līdzīgi, kā EARS-net apkopotajiem datiem, arī no elpceļu izolētiem paraugiem ir novērota rezistences palielināšanās laika gaitā – 2,05%, salīdzinot 2017. un 2019. gadu. Salīdzinot ar bakalaura darba izstrādes laikā 2016. gadā iegūtos datus (Alksne, 2018), kur divi paraugi bija rezistenti (4,55%), ar 2019. gadu, rezistence ir palielinājusies par 2,12%. Var secināt, ka no elpceļiem iegūtajiem *P. aeruginosa*

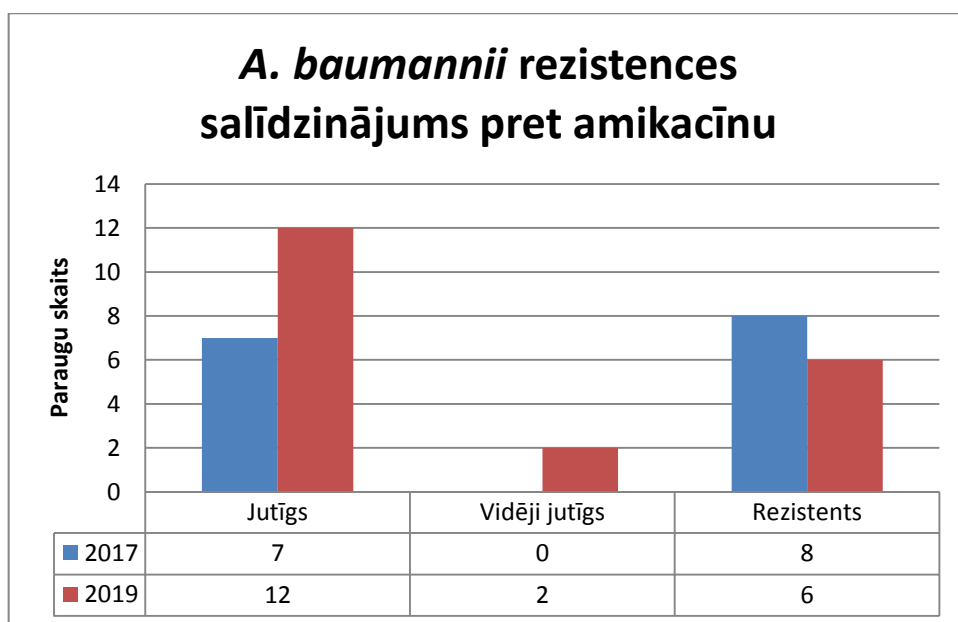
izolātiem rezistence ar katru gadu pieaug, kas nozīmē, ka patogēns kļūst mazāk efektīvs pret šo antibakteriālo līdzekli. Tas var būt izskaidrojams ar to, ka baktērijai ir izstrādāti rezistences mehānismi, kas ļauj tai izdzīvot zem antibiotiku izraisītajiem stresa apstākļiem.



3.6.1. att. EARS-net informācija par *P. aeruginosa* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret karbapenēmiem ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

3.7. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret amikacīnu starp 2017. un 2019. gadu

2017. gadā no 15 *A. baumannii* paraugiem 7 paraugi bija jutīgi pret amikacīnu, kas ir 47%. Rezistentu paraugu skaits bija nedaudz lielāks, kas ir 8 (53%), un netika konstatēts neviens vidēji jutīgs paraugs. 2019. gadā no 20 paraugiem 12 paraugi bija jutīgi (60%), divi paraugi vidēji jutīgi (10%), bet rezistentie paraugi pret šo antibakteriālo līdzekli bija 6 (30%). Salīdzinot abus gadus, jutīgo paraugu skaits ir palielinājies par 13%, vidēji jutīgo paraugu skaits ir palielinājies par 10%, bet rezistentu *A. baumannii* paraugu skaits ir samazinājies ievērojami, kas ir 23%. Dati apkopoti 3.7. attēlā.

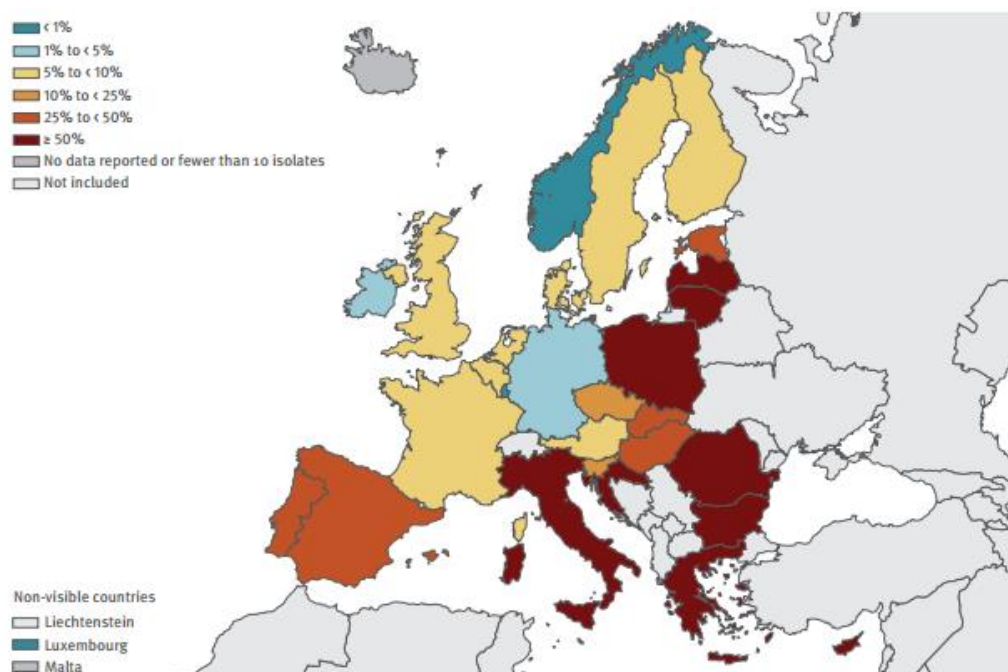


3.7. att. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret amikacīnu starp 2017. un 2019. gadu

Pēc 2018. gadā apkopotajiem EARS-net datiem par *A. baumannii* invazīvajiem paraugiem, kas ir rezistenti pret aminoglikozīdiem, var secināt, ka aminoglikozīdu rezistence ES/EEZ ir plaši izplatīta. 9 valstīs – Horvātijā, Lietuvā, Grieķijā, Rumānijā, Itālijā, Kiprā, Bulgārijā, Polijā, kā arī Latvijā ir novērota aminoglikozīdu rezistence, kas pārsniedz $\geq 50\%$ rezistences robežu vērtību (sk.3.7.1. att). Vislielākās rezistences vērtības tika noteiktas Horvātijā, Lietuvā, Grieķijā, Rumānijā, kas ir attiecīgi 91,5%, 85,1%, 81,6% un 80%. Latvijā rezistence tika novērota no 48 invazīvajiem paraugiem 60,4%. Salīdzinot 2015. gadu, kurā no 61 parauga rezistenti bija 59%, ar 2018. gadu, kur no 48 paraugiem rezistenti bija 60,4%, rezistence ir palielinājusies par 1,4%. No 2015. gada līdz 2017. gadam aminoglikozīdu rezistence ar katru gadu tikai palielinājās, bet salīdzinot 2018. gadu ar 2017, kurā no 33 paraugiem bija rezistenti 78,8%, rezistence samazinājās par 18,4%. Valstis, kurās netika noteikta rezistence ir Norvēģija un Luksemburga (Surveillance report, 2019).

Maģistra darba izstrādes laikā iegūtie rezultāti par aminoglikozīdu (amikacīna) rezistenci ir novērota pozitīva tendence. Ja 2017. gadā rezistentu paraugu skaits bija 53%, kas ir līdzīgi EARS-net datiem, jo atbilst rezistences robežas vērtībai $\geq 50\%$, tad 2019. gadā šie rezistentie paraugi bija 30%. Rezistences šo gadu laikā ir ievērojami samazinājusies, kas ir par 23%. Salīdzinot ar bakalaura darba izstrādes laikā iegūtajiem datiem (Alksne, 2018), 2016. gadā rezistentie paraugi bija 36%, un salīdzinot ar 2019. gadu – rezistence ir samazinājusies par 6%. Rezistentu paraugu samazināšanās var būt izskaidrojama ar to, ka tiek ievērotas procedūru vadlīnijas, tiek ievērota personāla higiēnas prasības, infekciju ārstēšanai tiek

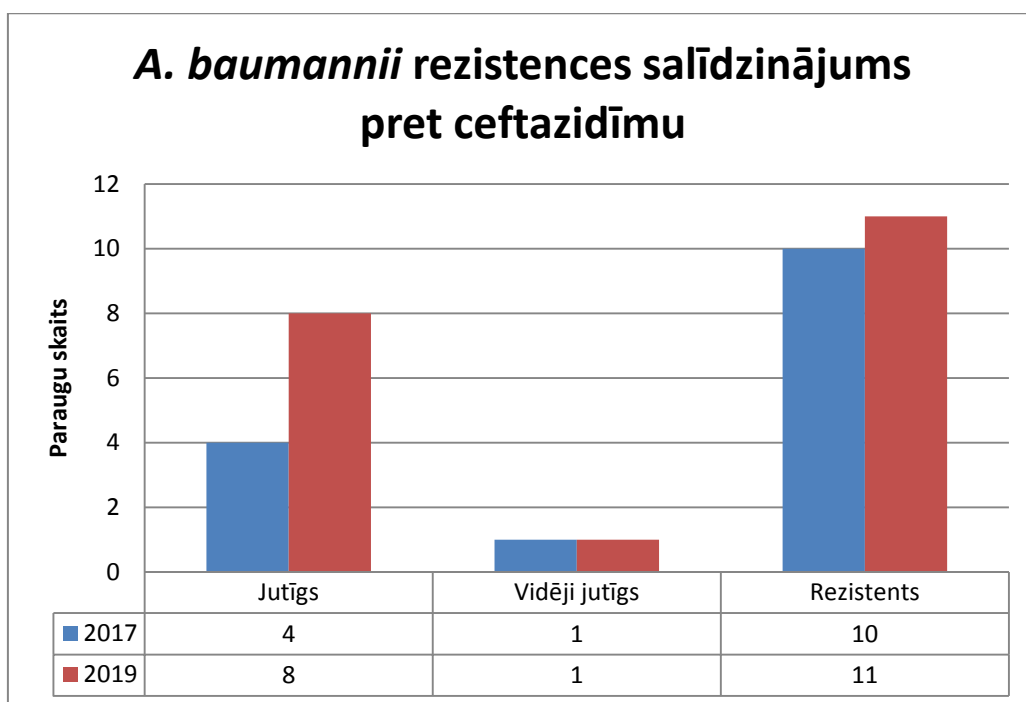
izvēlētas atbilstošas antibiotikas, kā arī baktērijas nav ieguvušas gēnus, kas kodē aminoglikozīdus modificējošos enzīmus (adenilāzes, acetiltransferāzes, metiltransferāzes un fosfotransferāzes).



3.7.1. att. EARS-net informācija par *A. baumannii* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret karbapenēmiem ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

3.8. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ceftazidīmu starp 2017. un 2019. gadu

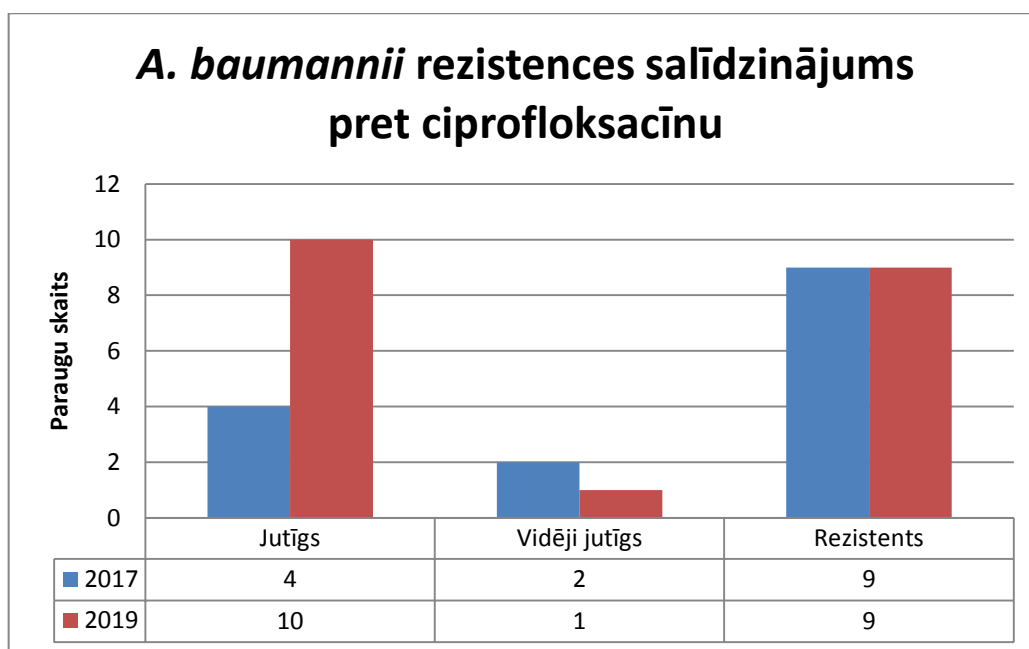
2017. gadā četri *A. baumannii* paraugi bija jutīgi pret ceftazidīmu (26,66%), kas ir zems rādītājs. Vidēji jutīgi paraugi bija viens (6,67%), bet rezistenti *A. baumannii* paraugi bija 10, kas ir 66,67%. Tāpat kā 2017. gadā, arī 2019. gadā jutīgu paraugu bija mazāk nekā rezistentu. 8 no 20 *A. baumannii* paraugiem bija jutīgi, kas ir 40%, bet rezistenti bija 11, kas ir 55%. Vidēji jutīgi paraugi bija viens (5%). Salīdzinot abus gadus, *A. baumannii* jutība pret ceftazidīmu ir palielinājusies par 13,34%, bet rezistence samazinājusies par 11,67%. Vidēji jutīgu paraugu skaits ir samazinājies par 1,67%. Dati apkopoti 3.8. attēlā. Salīdzinot ar bakalaura laikā iegūtajiem datiem (Alksne, 2018), 2016. gadā, kur 5 paraugi bija rezistenti (35,71%), rezistence četrus gadus laikā ir palielinājusies par 19,29%, kas ir ievērojami. Rezistences palielināšanās var izskaidrot ar to, ka baktērijai ir ieguvusi vairākus rezistences gēnus, kā piemēram, AmpC, paplašināta spektra β laktamāzes (GES un CTX-M), kā arī MBL - IMP, VIM, SPM.



3.8. att. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ceftazidīmu starp 2017. un 2019. gadu

3.9. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ciprofloksacīnu starp 2017. un 2019. gadu

2017. gadā no 15 *A. baumannii* paraugiem jutīgi bija tikai četri (26,67%). Tika konstatēts, ka rezistentu paraugu skaits ir lielāks, kas ir 9 (60%). Vidēji jutīgu paraugu skaits ir divi (13,33%). 2019. gadā pret ciprofloksacīnu jutīgi *A. baumannii* paraugi bija vairāk nekā rezistentie, kas bija 10 paraugi (50%), bet rezistentie paraugi bija 9 (45%). Vidēji jutīgs paraugs bija viens (5%). Salīdzinot abus gadus, *A. baumannii* jutība pret ciprofloksacīnu ir ievērojami palielinājusies – par 18,33%. Apkopojot iegūtos datus, rezistence ir samazinājusies par 15%. Vidēji jutīgu paraugu skaits ir samazinājies par 8,33%. Dati apkopoti 3.9. attēlā.

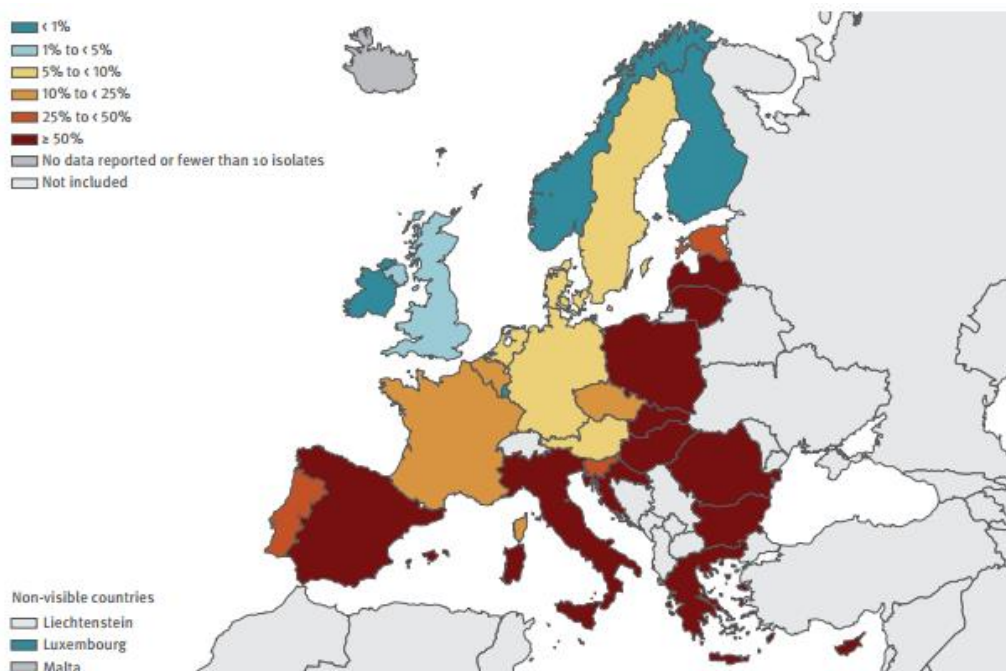


3.9. att. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret ciprofloksacīnu starp 2017. un 2019. gadu

Pēc 2018. gada apkopotajiem EARS-net datiem par *Acinetobacter baumannii* invazīvajiem paraugiem, var secināt, ka fluorohinolonu rezistence ir plaši izplatīta ES/EEZ. No 30 ES/EEZ valstīm 12 valstīs, Horvātijā, Lietuvā, Grieķijā, Kiprā, Rumānijā, Itālijā, Bulgārijā, Polijā, Ungārijā, Spānijā, Slovākijā, kā arī Latvijā ir novērota rezistence pret fluorohinoloniem $\geq 50\%$ rezistences robežā (sk 3.9.1. att.). Vislielākā rezistence tika fiksēta Horvātijā, kur no 155 paraugiem 96,1% bija rezistenti. Latvijā no 47 paraugiem rezistenti bija 80,9%, un tā ir 8. valsts, kurā tika konstatēts šis rezistentu paraugu skaits, kas nozīmē, ka pret fluorohinoloniem ir plaši izplatījusies rezistence, un tie nav vairs tik efektīvi antibakteriālie līdzekļi *A. baumannii* izraisīto infekciju ārstēšanai. Valstīs, kurās netika identificēti rezistenti paraugi, bija Īrija, Somija, Norvēģija, Luksemburga. Salīdzinot datus Latvijā par 2015. gadu, kur no 60 paraugiem 78,3% bija rezistenti, ar 2018. gadu, rezistence ir palielinājusies par 2,6%. Salīdzinot 2018. gadu ar 2017. gadu, kur no 33 paraugiem rezistenti bija 81,8%, rezistence ir samazinājusies par 0,9% (Surveillance report, 2019) .

Pētījuma laikā tika iegūts, ka gan 2017. gadā, kur rezistentu paraugu skaits pret fluorohinolonu (ciprofloksacīnu) bija 60%, gan 2019. gadā, kur rezistentu paraugu skaits bija 45%, rezistences vērtība ir zemāka nekā EARS-net apkopotajos datos, kur rezistences vērtība ir virs 80%. Rezistences izmaiņas laika posmā, parāda, ka rezistence ir samazinājusies par 10%, salīdzinot 2017. gadu ar 2019. gadu. Salīdzinot maģistrā iegūtos datus ar bakalaura darba izstrādes laikā iegūtajiem (Alksne, 2018), 2016. gadā rezistentie paraugi bija 42,86%,

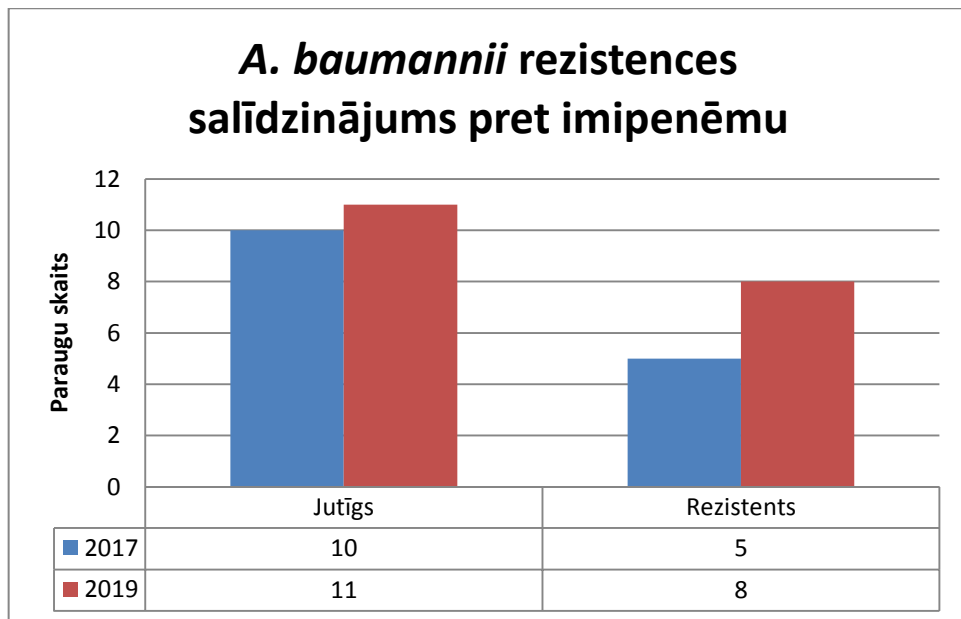
kas nozīmē, ka rezistence četru gadu laikā ir palielinājusies par 7,14%. Šie dati ir līdzīgi, kā EARS-net, jo rezistence no elpceļu iegūtajiem izolātiem pakāpeniski palielinās, ar novērotu rezistences samazināšanos laika posmā.



3.9.1. att. EARS-net informācija par *A. baumannii* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret fluorohinoloniem ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

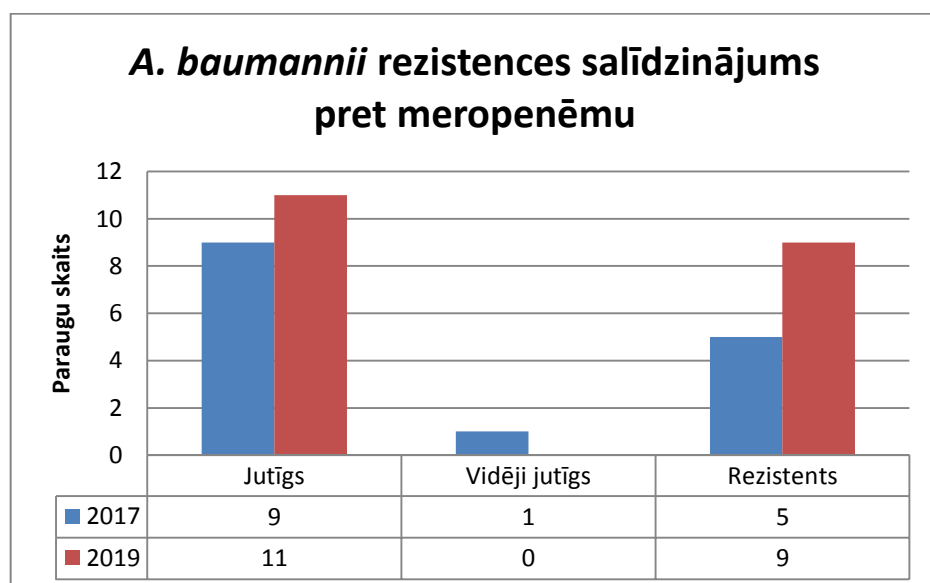
3.10. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret karbapenēmiem starp 2017. un 2019. gadu

2017. gadā jutīgi *A. baumannii* paraugi pret imipenēmu bija 10, kas 66,67%, bet rezistenti 5, kas ir 33,33%. 2019. gadā *A. baumannii* 11 paraugi bija jutīgi, kas ir 57,89%, bet rezistenti 8, kas ir 42,11%. Salīdzinot abus gadus, netika novērots neviens vidēji jutīgs paraugs. *A. baumannii* paraugu rezistence pret imipenēmu ir palielinājusies par 8,78%. Dati apkopoti 3.10. attēlā.



3.10. att. A. baumannii elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret imipenēmu starp 2017. un 2019. gadu

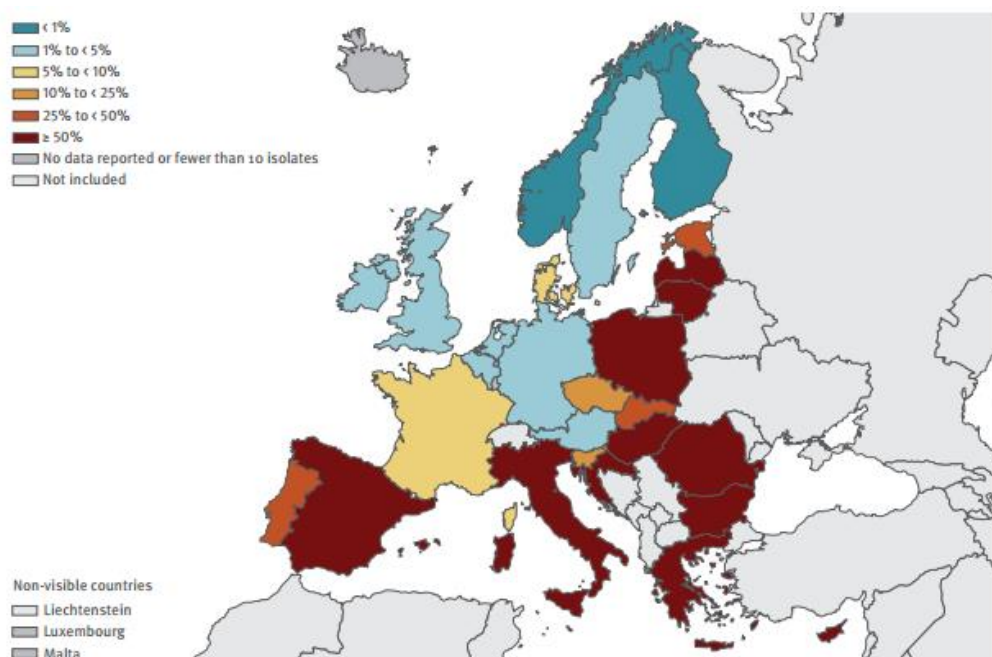
No 15 identificētajiem *A. baumannii* paraugiem 2017. gadā jutīgi pret meropenēmu bija 9 (60%), vidēji jutīgs paraugs bija viens (6,67%), un rezistenti bija 5 paraugi (33,33%). Apkopojot 2019. gadā iegūtos datus, *A. baumannii* jutīgo paraugu skaits pret meropenēmu bija nedaudz lielāks par rezistentu paraugu skaitu, kas ir 11 (55%). *A. baumannii* rezistentu paraugu skaits bija 9 (45%). Netika novērots neviens vidēji jutīgs paraugs. Salīdzinot abus gadus, *A. baumannii* jutība pret meropenēmu ir samazinājusies par 5%, bet rezistence ir palielinājusies par 11,67%. Dati apkopoti 3.10.1. attēlā.



3.10.1. att. A. baumannii elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret meropenēmu starp 2017. un 2019. gadu

Apkopojot EARS- net pieejamos datus par 2018. gada *A. baumannii* invazīvo paraugu rezistenci pret karbapenēmiem, var secināt, ka tā ir izplatīta ES/EEZ valstīs. 11 no 30 ES/EEZ valstīm, tas pārsniedz $\geq 50\%$ rezistences robežas vērtību. Horvātijā un Grieķijā karbapenēmu rezistence ir konstatēta 94,5% un 92,4% attiecīgi. Valstis, kurās vēl ir novērota šī $\geq 50\%$ rezistence, ir Lietuva, Rumānija, Kipra, Itālija, Latvija, Bulgārija, Polija, Ungārija, Spānija (sk. 3.9.3. att.). Latvijā šī karbapenēmu rezistence no 51 parauga bija konstatēta 78,4%. Salīdzinot 2015. gadu, kur no 61 parauga 68,9% bija rezistenti, ar 2018. gadu, rezistence ir palielinājusies par 9,5%. Salīdzinot 2018. gadu ar 2017. gadu, kur no 34 paraugiem rezistenti bija 79,4%, rezistence ir samazinājusies par 1%. Rezistences samazinājums irniecīgs, jo tāpat karbapenēmu rezistentie paraugi ir procentuāli daudz, un četru gadu laikā šī rezistence pieaug (Surveillance report, 2019).

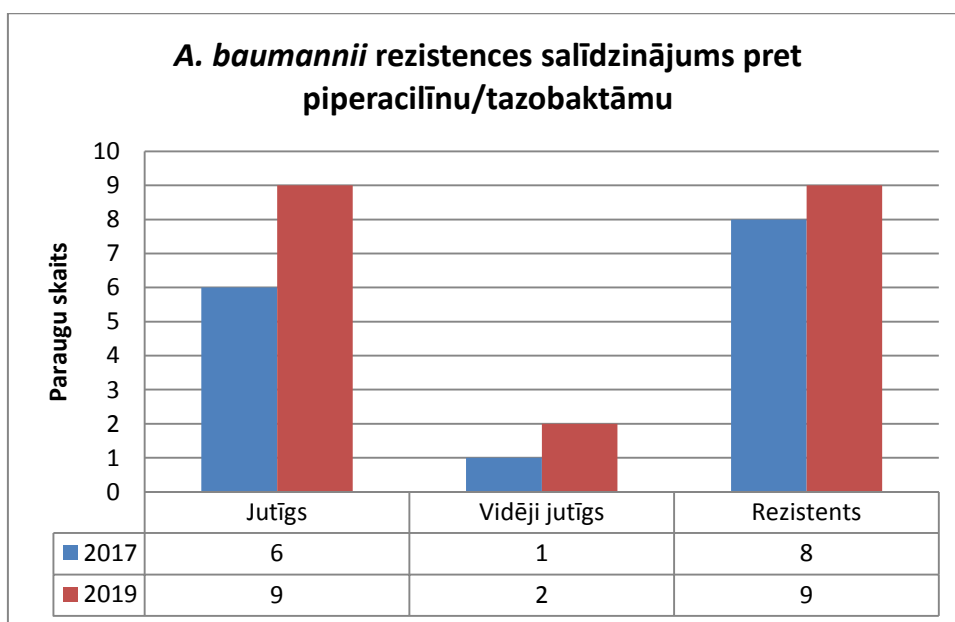
Apkopojot pētījumā iegūtos datus par karbapenēmu rezistentajiem paraugiem, 2017. gadā un 2019. gadā rezistence pret meropenēmu bija attiecīgi 33,33% un 45%, kas pieder pie EARS-net noteiktā 25%-50% rezistences robežas. Salīdzinot četru gadu laikā rezistences izmaiņas ar bakalaura darbā iegūtajiem datiem (Alksne, 2018), 2016. gadā rezistenti paraugi pret meropenēmu bija 28,57%, kas nozīmē, ka rezistencei ir pozitīva tendence palielināties, jo, salīdzinot 2016. gadu ar 2019. gadu, tā ir palielinājusies ievērojami, kas ir 16,43%. Apkopojot pētījumā iegūtos datus par rezistenci pret imipenēmu, 2017. gadā rezistence bija 33,33%, bet 2019. gadā jau tā ir palielinājusies - rezistentie paraugi bija 42,11%. Abas rezistentās vērtības pieder pie EARS-net noteiktās 25%-50% rezistences robežas. Salīdzinot ar 2016. gadu (Alksne, 2018), kur rezistentie paraugi pret imipenēmu bija tikpat daudz kā pret meropenēmu - 28,57%, rezistence četru gadu laikā ir palielinājusies arī ievērojami 13,54%. Pētījumā iegūtie dati atbilst arī EARS-net apkopotajiem datiem par rezistences tendenci palielināties laika gaitā. Karbapenēmu rezistentu paraugu palielināšanās ir saistīta ar *A. baumannii* spēju producēt MBL, kas arī apstiprinās, izstrādājot maģistra darbu, ņemot vērā, ka rezistence pret karbapenēmiem tikai pieaug.



3.10.1. att. EARS-net informācija par *A. baumannii* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar rezistenci pret karbapenēmiem ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

3.11. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret piperacilīnu/tazobaktāmu starp 2017. un 2019. gadu

Apkopojot datus par *A. baumannii* jutību pret piperacilīnu/tazobaktāmu 2017. gadā, tika iegūts, ka 6 no 15 *A. baumannii* paraugiem bija jutīga pret minēto antibakteriālo līdzekli, kas ir 40%. Rezistentu paraugu skaits bija lielāks par jutīgo paraugu skaitu, kas ir 8 (53,33%). Tika konstatēts viens vidēji jutīgs paraugs, kas ir 6,67%. 2019. gadā tika novērots vienāds skaits jutīgu un rezistentu paraugu skaits, kas ir 9 paraugi (45%). Vidēji jutīgi paraugi bija divi, kas ir 10%. Rezistence ir samazinājusies par 8,33%. Dati apkopoti 3.11. attēlā. Salīdzinot ar bakalaura darba izstrādes laikā iegūtajiem datiem (Alksne, 2018), 2016. gadā, kur četri paraugi (28,57%), var secināt, ka četru gadu laikā rezistence pret piperacilīnu/tazobaktāmu ir mainīga. Salīdzinot rezistences izmaiņas četru gadu laikā, tā ir palielinājusies par 16,43%.



3.11. att. *A. baumannii* elpceļu izolātu rezistences salīdzinājums pret piperacilīnu/tazobaktāmu starp 2017. un 2019. gadu

Apkopojot datus par *P. aeruginosa* un *A. baumannii* rezistences izmaiņām starp 2017. gadu un 2019. gadu pret 6 antibakteriālajiem līdzekļiem, var secināt, ka rezistencei pārsvarā ir tendence samazināties. Gan *P. aeruginosa*, gan *A. baumannii* paraugiem rezistences samazināšanās ir novērota pret četriem antibakteriālajiem līdzekļiem, kas nozīmē, ka abi patogēni ir kļuvuši jutīgāki. 2019. gadā tika novērota *A. baumannii* ievērojama rezistences palielināšanās pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu, kas nozīmē to, ka baktērijai ir izstrādāti rezistences mehānismi, kā piemēram metallo- β –laktamāzes, kas pēdējo gadu laikā tiek identificēts, kā viens no svarīgākajiem rezistences mehānismiem. Rezistences izmaiņas ir apkopotas 3.1. tabulā.

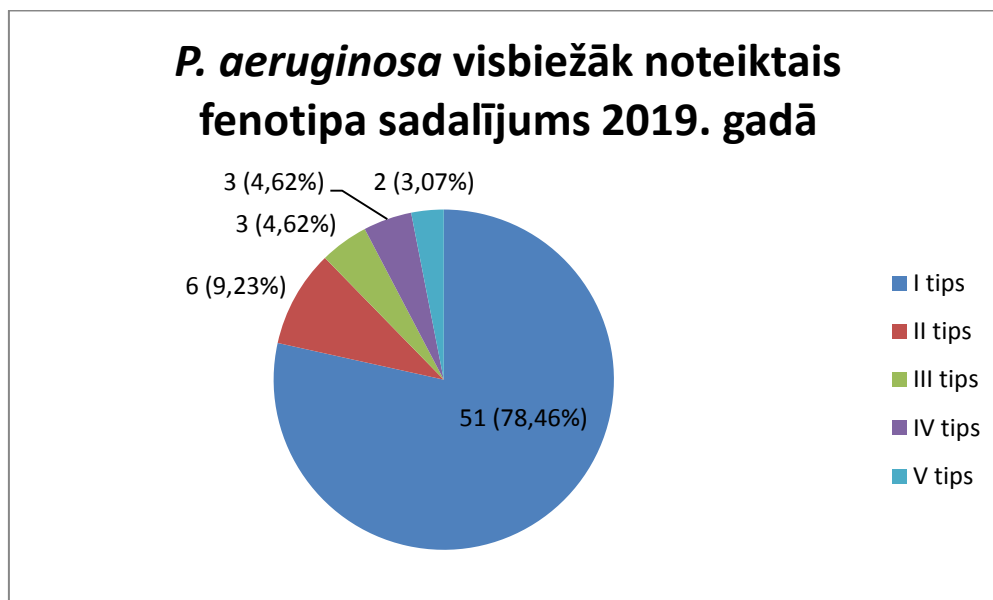
3.1. tabula.

P. aeruginosa un *A. baumannii* paraugu rezistences salīdzinājums % (↑palielināšanās/samazināšanās↓) starp 2017. un 2019. gadu, autores sastādīta tabula

	Ceftazidīms	Amikacīns	Ciprofloksacīns	Piperacilīns/ tazobaktāms	Imipenēms	Meropenēms
<i>P. aeruginosa</i>	↓ 5,54	↓ 0,62	↑ 6,56	↑ 2,05	↓ 3,74	↓ 2,35
<i>A.baumannii</i>	↓23	↓ 11,67	↓ 15,00	↓ 8,33	↑ 8,78	↑ 11,67

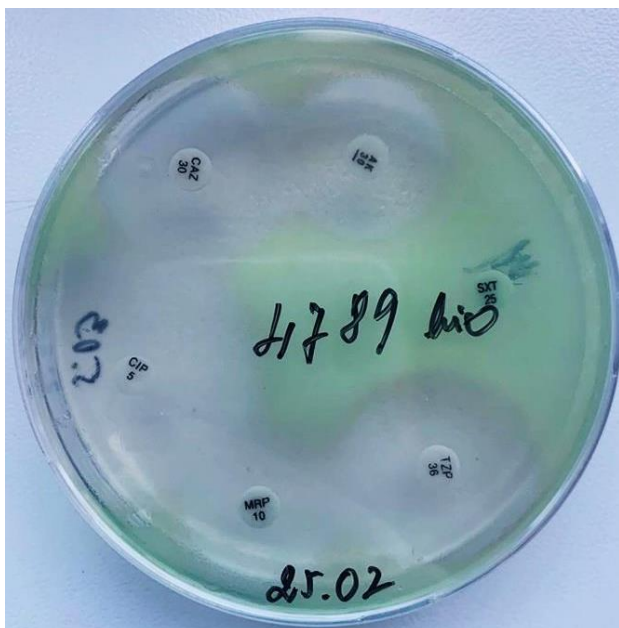
3.12. *P. aeruginosa* un *A. baumannii* elpceļu izolātu fenotipi

Maģistra izstrādes laikā, izmantojot antibiogrammu par paraugu jutību pret antibakteriāliem līdzekļiem, tika noteikti kopumā 14 dažādi *P. aeruginosa* fenotipi, un no tiem ir apkopoti visbiežāk sastopamie 3.12. attēlā.



3.12. att. *P. aeruginosa* visbiežāk noteiktais fenotipa sadalījums 2019. gadā

2019. gadā visbiežāk noteiktais fenotips bija I, kurā 51 (78,46%) *P. aeruginosa* paraugs bija jutīgs pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem. Pie II fenotipa pieder 6 (9,23%) paraugi, kas ir rezistenti pret ceftazidīmu un ciprofloksacīnu, bet ir jutīgi pret amikacīnu, ciprofloksacīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu, kā arī pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu. Pie III fenotipa pieder trīs paraugi (4,62%), kas ir rezistents tikai pret ciprofloksacīnu, bet pret pārējiem antibakteriālajiem līdzekļiem ir jutīgs. Pie IV fenotipa pieder trīs paraugi (4,62%), kas ir rezistents tikai pret ceftazidīmu, bet pret pārējiem antibakteriālajiem līdzekļiem tas ir jutīgs. Pie V fenotipa pieder divi paraugi (3,07%), kas ir rezistenti gan pret ceftazidīmu, gan pret ciprofloksacīnu, vidēji jutīgs gan pret meropenēmu, gan pret piperacilīnu/tazobaktāmu, un jutīgs gan pret amikacīnu, gan pret imipenēmu. Fenotipu raksturojums ir apkopots 3.2. tabulā. Maģistra izstrādes laikā tika iegūts arī fenotips, kas ir jutīgs pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem, izņemot trimetoprimu/sulfametoksazolu, kā arī tika novērots *P. aeruginosa* producētais pigments-pioverdīns. (sk. att. 3.12.1. att.).



3.12.1. att. *P. aeruginosa* jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem, kā arī producētais pigments pioverdīns, izmantojot MacConkey agaru, autores foto

3.2. tabula

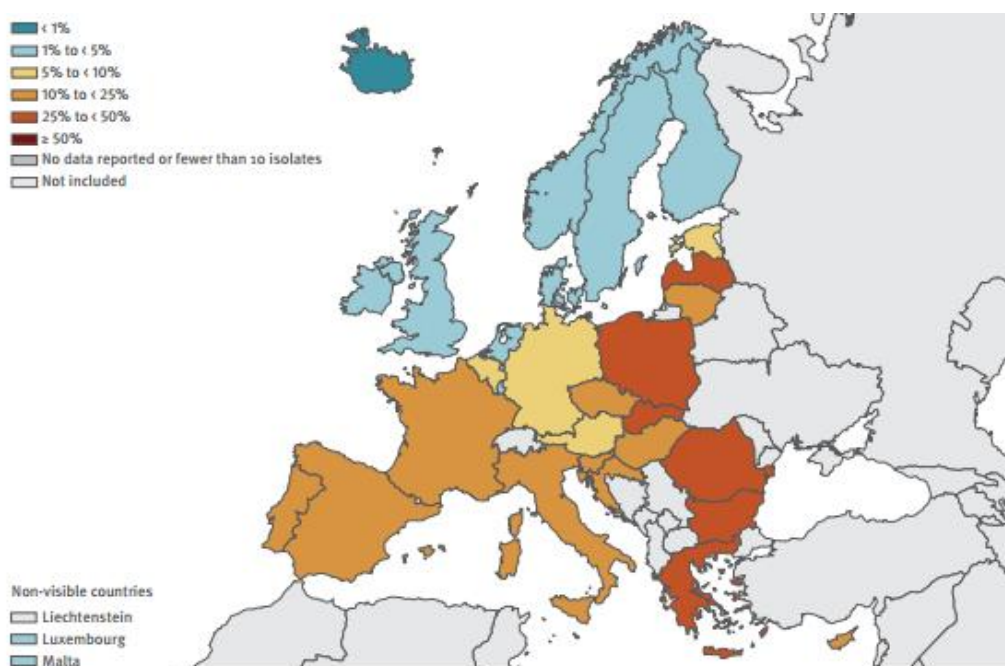
P. aeruginosa paraugu biežāk noteikti fenotipi, izmantojot antibiogrammu (n=65),
autores sastādīta tabula

	I(n=51)	II (n=6)	III (n=3)	IV (n=3)	V (n=2)
Amikacīns	S	S	S	S	S
Ceftazidīms	S	R	S	R	R
Ciprofloksacīns	S	R	R	S	R
Imipenēms	S	S	S	S	S
Meropenēms	S	S	S	S	R
Piperacilīns/tazobaktāms	S	S	S	R	I

Pēc 2018. gada EARS-net apkopotajiem datiem par *P. aeruginosa* invazīvo paraugu kombinētā rezistence pret vismaz trīs antibakteriālo grupu līdzekļiem – fluorhinoloniem, aminoglikozīdiem, β – laktāmiem (ceftazidīmu, karbapenēmēmēm, piperacilīnu/tazobaktāmu) ir izplatīta 29 no 30 ES/EEZ valstīs. Vienīgā valsts, kurā tā nav noteikta ir Īslande. Nevienā valstī netika, noteikta kombinētā rezistence, kas pieder pie EARS-net noteiktās $\geq 50\%$ rezistences robežas. 6 valstīs – Rumānijā, Slovākijā, Polijā, Grieķijā, Bulgārijā, kā arī Latvijā tika noteikta kombinētā rezistence, kas pieder pie EARS-net noteiktās noteiktās 25%–<50% rezistences robežas (sk 3.13.2. att.). Latvija ierindojas 3. vietā,

kurā procentuāli visvairāk tika noteikta kombinētās rezistences paraugi. Latvijā no 39 paraugiem kombinētā rezistence tika noteikta 30,8%. Salīdzinot rezistences izmaiņas gadu laikā, 2015. gadā, kur no 13 paraugiem kombinētā rezistence tika noteikta 15,4%, un 2018. gadā iegūtos datus, rezistence ir palielinājusies par 15,4%. Salīdzinot 2017. gadu, kur no 14 paraugiem 42,9 % bija noteikta kombinētā rezistence, ar 2018. gadu, rezistence ir samazinājusies par 12,1%. Kopumā četrus gadu laikā šī rezistence ir palielinājusies, it īpaši 2017. gadā, kur šīs rezistences palielinājums, salīdzinot ar citiem gadiem, ir ievērojams (Surveillance report, 2019).

Maģistra darba izstrādes laikā, no 75 *P. aeruginosa* kombinētā jutība – rezistence pret vismaz trīs antibakteriālo līdzekļu grupām- tika noteikta 7 paraugiem, kas ir 9,33%, un atbilst pēc EARS-net noteiktās 5%-<10% rezistences robežas vērtības. No šiem 7 paraugiem divi pieder pie V fenotipa, kas tika aprakstīts iepriekš. Pie kombinētās rezistences bieži var novērot rezistenci pret karbapenēmiem, kuru rada *P. aeruginosa* spēja producēt MBL. Pētījumā laikā tika iegūti divi paraugi, kas ir rezistenti pret četriem antibakteriālo grupu līdzekļiem un katrs pieder pie sava fenotipa. Pie VI pieder paraugs, kas ir rezistents pret ceftazidīmu, ciprofloksacīnu, karbapenēmiem- meropenēmu un imipenēmu, kā arī pret piperacilīnu/tazobaktāmu. Pie VII pieder paraugs, kas ir rezistents pret amikacīnu, ciprofloksacīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu, kā arī pret karbapenēmiem - imipenēmu un meropenēmu. Pētījumā arī tika vēl viens MDR karbapenēmu rezistents fenotips - VIII fenotips, kurā viens paraugs bija rezistents pret amikacīnu, ciprofloksacīnu, kā arī pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu. Salīdzinot pētījuma laikā iegūtos datus ar EARS-net datiem, kombinētās rezistences vērtība ievērojami atšķiras, kas varētu būt izskaidrojams ar to, ka pētījumā ir izmantoti *P. aeruginosa* paraugi, kas ir izolēti no elpceļiem un tie nav tik rezistenti kā invazīvie paraugi. Salīdzinot ar bakalaura laikā izstrādātā pētījuma (Alksne, 2018), kur 2017. gadā kombinētā rezistence tika noteikta 9,23%, kas nozīmē, ka kombinētā rezistence ir palielinājusies par 0,10%.



3.12.2. att. EARS-net informācija par *P. aeruginosa* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar kombinēto rezistenci (rezistence pret trīs un vairāk antibakteriālo līdzekļu grupām starp piperacilīnu/tazobaktāmu, ceftazidīmu, fluorohinoloniem, aminoglikozīdiem, karbapenēmiem) ES/EEZ valstīs 2018. gadā (Surveillance report, 2019)

Aptuveni 13% *P. aeruginosa* infekciju izraisa multirezistentie celmi. 2017. gadā multirezistentā *Pseudomonas aeruginosa* izraisīja aptuveni 32 600 infekcijas hospitalizētu pacientu vidū un apmēram 2700 nāves gadījumus Amerikas Savienotajās Valstīs (Centers for Disease Control and Prevention, 2017). MDR *P. aeruginosa* baktērijas pēdējos gados ir izraisījušas smagas infekcijas ar augstu mirstības līmeni ļoti ierobežotu ārstēšanas iespēju dēļ. Veselības aprūpes iestādēs pacienta MDR *P. aeruginosa* iegūšanas risks palielinās, uzturoties slimnīcā, visticamāk, pateicoties oportūnistiskā patogēna izplatībai no ārējiem avotiem, piemēram, no piesārņotām virsmām un medicīnas ierīcēm, kā arī no rezistentu celmu pārvešanu no viena pacienta uz citu.

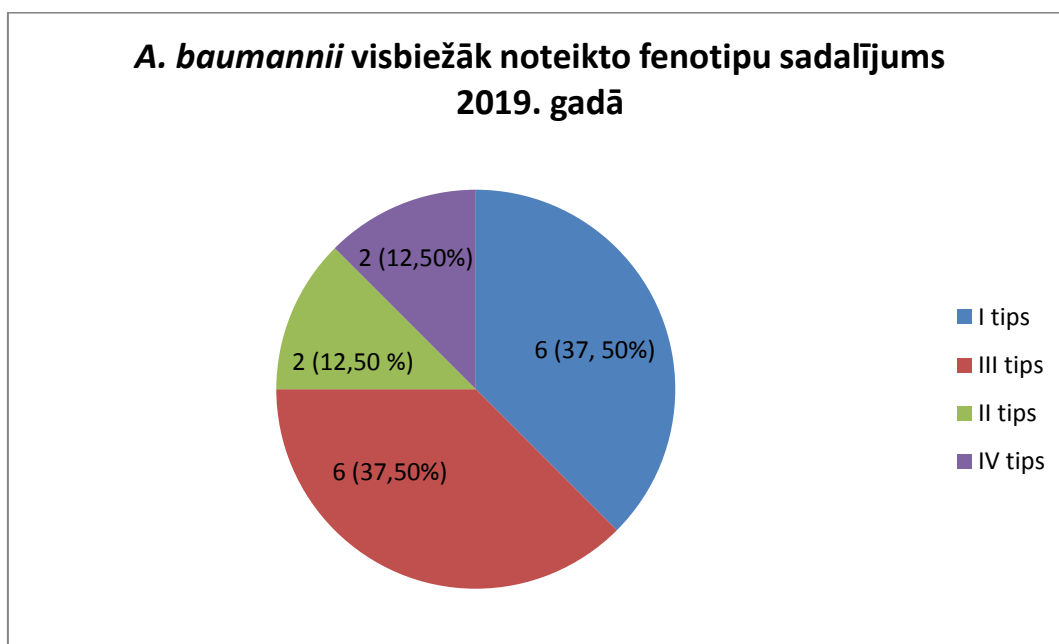
Kādā pētījumā, tika pētīti *Pseudomonas aeruginosa* izolāti, kas iegūti no elpceļiem. 1. klases integroni, kas tika atklāti 39 celmos (23,8%), bija saistīti ar aminoglikozīdu (*aadB*, *aadA1*, *aadA6*, *aacA4*, *aac (3) -I*) un karbapenēmu rezistences gēniem (*blaVIM-2*). *blaVIM-2* gēns tika atklāts 52,3% karbapenēmu rezistenots *P. aeruginosa* izolātos. Visi celmi ar MBL fenotipu bija rezistenti pret ≥ 3 antipseudomonālām antibiotikām, bet jutīgi pret kolistīnu. Turklāt visi no tiem bija rezistenti pret karbapenēmiem, savukārt pret aminoglikozīdiem (gentamicīnu un tobramicīnu) rezistence bija 95,6%, un pret fluorohinoloniem (ciprofloksacīns un levofloksacīns) rezistence attiecīgi bija 95,6% un 91,3% (Bellés *et al.*,

2018). Kas nozīmē, lai gan maģistra izstrādes laikā pētītie elpceļu izolāti neuzrādīja augstas rezistences vērtības, bet multizāļu rezistentie izolāti arī varētu saturēt šo gēnu kasešu satorošo 1. klases integronu, kas veicina multi zāļu rezistentu *P. aeruginosa* izplatību.

Kādā pētījumā no 217 *P. aeruginosa* izolātiem, kas iegūti no elpceļiem 159 (73,3%) un 141 (64,9%) bija attiecīgi rezistenti pret imipenēmu un meropenēmu. Ceftazidīma un tobramicīna rezistence tika noteikta 112 (51,6%) izolātos, un 96 (44,2%) paraugos tika novērota rezistence pret piperacilīnu/tazobaktāmu. Vismazākā rezistence bija pret amikacīnu 51 (23,5%). Rezistenci pret imipenēmu un meropenēmu izraisīja MBL gēni *blaVIM*, kas tika noteikts 53 paraugos (84,1%) un *blaIMP*, kas tika noteikts 48 paraugos (76,1%) (Li Y *et al.*, 2015). Salīdzinot ar maģistra iegūtajiem datiem, tieši pret meropenēmu ir konstatēta vislielākā jutība, kas varētu būt izskaidrojams ar to, ka iespējams šajos *P. aeruginosa* karbapenēmu jutīgajos izolātos netiek ekspresēti šie MBL gēni. Līdzīgi arī maģistra izstrādātajā darbā, rezistence pret amikacīnu bija viena no mazākajām, lai gan rezistences vērtība ievērojami atšķiras, kas nozīmē, ka Latvijā *P. aeruginosa* elpceļu izolāti ir jutīgāki pret antibakteriālajiem līdzekļiem, kā rezultātā ir iespēja iegūt efektīvu *P. aeruginosa* izraisīto infekciju ārstēšanu.

Kādā pētījumā tika pētīti 53 *P. aeruginosa* izolāti no elpceļiem, no kuriem 16 (30,2%) ir multizāļu rezistenti. Kopumā *P. aeruginosa* izolātu rezistence pret imipenēmu, ciprofloksacīnu, ceftolozānu / tazobaktāmu un ceftazidīmu / avibaktāmu bija attiecīgi 64,1%, 54,7%, 22,6% un 24,5%. Meropenēms bija nedaudz aktīvāks nekā imipenēms. Tika noskaidrots, ka *blaVIM-2* ir saistīts ne tikai ar rezistenci pret karbapenēmiem, bet arī pret ceftolozānu / tazobaktāmu un ceftazidīmu / avibaktāmu (Pérez A *et al.*, 2019). Arī maģistra laikā iegūtie dati par *P. aeruginosa* elpceļu jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem uzrādīja nedaudz lielāku jutību pret meropenēmu nekā pret imipenēmu. Salīdzinot pētījumus, MDR *P. aeruginosa* elpceļu izolāti ir plaši izplatīti Eiropā, kā jau iepriekš minēts, ka maģistra darba laikā kombinētā rezistence tika noteikta 9,23%, kas ir mazāk nekā dotajā pētījumā noteikts, bet salīdzinot rezistences izmaiņas gadu laikā, tā ir pieaugusi.

Maģistra darba izstrādes laikā, izmantojot antibiogrammas, tika noteikti kopumā 8 *A. baumannii* fenotipi. Pēc *A. baumannii* paraugu jutības pret antibakteriālajiem līdzekļiem tika apkopoti visbiežāk sastopamie fenotipi, kas apkopoti 3.12.3. attēlā.



3.12.3. att. *A. baumannii* visbiežāk noteiktais fenotipa sadalījums 2019. gadā

2019. gadā visbiežāk noteiktie *A. baumannii* fenotipi bija I (n=6) un III (n=6). I fenotips, kurā tika noteikti 6 paraugi (37,50%), bija jutīgi pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem, savukārt III fenotips, kurā arī tika noteikti 6 paraugi (37,50%), bija rezistenti pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem (sk. 3.12.4. att.). Pie II tipa, kurā tika noteikti divi paraugi (12,50%), pieder *A. baumannii* izolāti, kas ir rezistenti pret ceftazidīmu, bet pret pārējiem antibakteriāliem līdzekļiem ir jutīgi. Pie IV fenotipa pieder divi *A. baumannii* izolāti, kuriem ir noteikts, ka tie ir vidēji jutīgi pret amikacīnu, bet pret pārējiem pieciem izmantotajiem antibakteriālajiem līdzekļiem tie ir rezistenti. *A. baumannii* izolātu visbiežāk noteiktie fenotipi pēc antibiogrammām ir apkopoti 3.3. tabulā.

Pie V fenotipa pieder viens paraugs, kas ir jutīgs tikai pret amikacīnu, bet ir rezistents pret ceftazidīmu, ciprofloksacīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu, kā arī pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu. Pie VI pieder viens paraugs, kas ir vidēji jutīgs pret piperacilīnu/tazobaktāmu, bet pret pārējiem antibakteriālajiem līdzekļiem ir jutīgs. Pie VII pieder viens paraugs, kas ir vidēji jutīgs gan pret ciprofloksacīnu, gan pret piperacilīnu/tazobaktāmu. Pie VIII pieder viens paraugs, kas ir vidēji jutīgs pret ceftazidīmu, bet pret pārējiem antibakteriālajiem līdzekļiem tas ir jutīgs.



3.12.4. att. Multizāļu rezistents *A. baumannii* uz MacConkey agara, autores foto

3.3. tabula

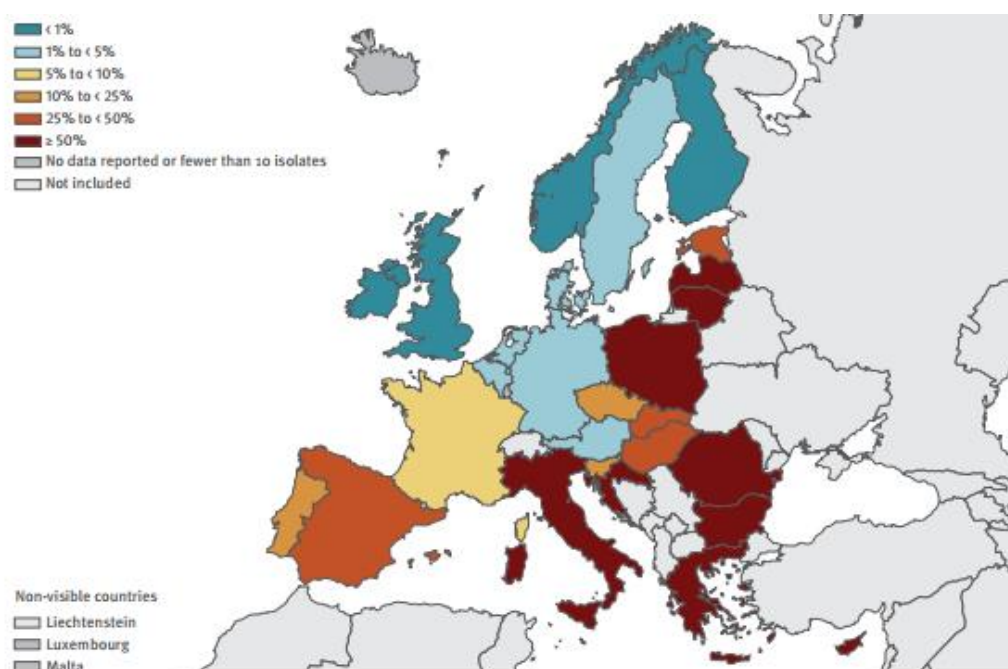
A. baumannii paraugu biežāk noteiktie fenotipi, izmantojot antibiogrammu (n=16),
 autores sastādīta tabula

	I(n=6)	II (n=2)	III (n=6)	IV (n=2)
Amikacīns	S	S	R	I
Ceftazidīms	S	R	R	R
Ciprofloksacīns	S	S	R	R
Imipenēms	S	S	R	R
Meropenēms	S	S	R	R
Piperacilīns/tazobaktāms	S	S	R	R

9 no 30 ES/EEZ valstīm ir noteikta *A. baumannii* kombinētā rezistence pret fluorohinolonu, aminoglikozīdu un karbapenēmu antibiotikām pēc EARS-net noteiktās $\geq 50\%$ rezistences robežā (sk.3.12.5 att.). Valstis, kurās ir noteikta šī robeža – Grieķija, Rumānija, Bulgārija, Lietuva, Kipra, Latvija, Itālija, Polija un Horvātija, kurā tika noteikta vislielākā kombinētā rezistence procentuāli, kas ir no 153 paraugiem 90,8% ir rezistenti. Valstis, kurās netika noteikta kombinētā rezistence ir Īrija, Somija, Norvēģija. Latvijā šī kombinētā rezistence tika noteikta no 44 paraugiem 56,8%. Salīdzinot rezistences izmaiņas, 2015. gadā, kur no 60 paraugiem 46,7% bija rezistenti, un 2018. gadu, kombinētā rezistence ir palielinājusies par 10,1%. Salīdzinot 2017. gadu, kur no 32 paraugiem rezistenti bija 75 %, un

2018. gadu, rezistence ir samazinājusies par 18,2 %. Pēc apkopotajiem datiem var secināt, ka četru gadu laikā kombinētā rezistence pieaug, bet pēdējo divu gadu laikā ir novērota pozitīva tendence – rezistence ievērojami samazinājās (Surveillance report, 2019).

Maģistra darba izstrādes laikā kombinētā rezistence tika noteikta 9 paraugiem, kas ir 45%, un pēc EARS-net datiem tas pieder 25% -<50% rezistences robežas vērtības. Salīdzinot ar EARS-net datiem, kombinētā rezistence paraugiem, kas iegūti no elpceļiem, ir noteikta mazāka rezistences vērtība nekā invazīvajiem paraugiem. Pie multi zāļu rezistentiem paraugiem pieder : 6 paraugi, kas ir rezistenti pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem un tie pieder pie III fenotipa, divi paraugi pieder pie IV fenotipa, kas ir vidēji jutīgi pret amikacīnu, bet pret pārējiem antibakteriālajiem līdzekļiem ir rezistenti, un pie V fenotipa pieder viens paraugs, kas ir jutīgs pret amikacīnu, bet pret pārējiem antibakteriālajiem līdzekļiem ir rezistents. Salīdzinot ar 2017. gadā bakalaura iegūtajiem datiem (Alksne, 2018), kur kombinētā rezistence no 15 paraugiem tika konstatēts 60% gadījumā. Kombinētā rezistence ir samazinājusies par 15%, kas ir pozitīva tendence. Faktori, kas ietekmē rezistentu patogēnu izplatīšanos un rašanos ir procedūru vadlīniju neievērošana, personāla higiēnas prasību neievērošana, kā arī nepareiza antibiotikas izvēle un to nepārdomāta lietošana.



3.12.2. att. EARS-net informācija par *A. baumannii* invazīvo izolātu procentuālo skaitu ar kombinēto rezistenci pret fluorohinoloniem, aminoglikozīdiem, karbapenēmiem ES/EEZ valstīs 2018. gadā, (Surveillance report, 2019)

MDR *A. baumannii* paraugi ir plaši aprakstīti arī citos pētījumos. Kā piemēram, kādā pētījumā *A. baumannii* izolāti bija rezistenti pret imipenēmu, meropenēmu, ceftazidīmu un cefepīmu - 95,7%, 95,7%, 96,4% un 97,1% attiecīgi. Izolātiem bija arī rezistenti pret ciprofloksacīnu, gentamicīnu, sulfametoksazolu / trimetoprimu, piperacilīnu / tazobaktāmu un amikacīnu (attiecīgi 93%, 85%, 89% un 95%). Kā arī tika pētīti 280 *A. baumannii* izolāti un to spēja producēt MBL. Pētīto gēnu MBL genotipu noteikšana bija pozitīva 266 izolātos (95%). MBL gēnos visbiežāk gēni bija IMP (95,7%), kam sekoja SIM un GIM (attiecīgi 47,1% un 42,9%), un to var saistīt ar rezistenci pret karbapenēmiem (Alkasaby and El Sayed Zaki, 2017). Kā arī citos pētījumos tiek aprakstīts, ka MBL producēšana *A. baumannii* svārstās no 49% līdz 99% (Fallah et al 2013), kas nozīmē, ka šie MBL gēni ir nozīmīgi rezistencē karbapenēmiem, kas izskaidro to augsto rezistences vērtību pret imipenēmu un meropenēmu. Arī maģistra izstrādes laikā tika iegūti dati, ka pret karbapenēmiem rezistence tikai pieaug, kas varētu būt izskaidrojams ar *A. baumannii* ir ieguvis MBL gēnus, kas noticis ar gēnu pārvešanu horizontālā ceļā. Kopumā pētījumā bija noteikti 9 paraugi no 20, kas ir karbapenēmu rezistenti, kas ir 45%. Salīdzinot ar 2017. gada laikā iegūtajiem datiem, kur karbapenēmu rezistentie paraugi bija 5 no 15, kas ir 33,33%, tad karbapenēmu rezistentu paraugu skaits ir palielinājies par 11,67%, kas nozīmē, ka MBL producējošo izolātu skaits tikai pieaug.

Arvien vairāk tiek ziņots par multirezistentiem un *New Delhi* metallo- β -laktamāzes 1 (NDM-1) producējošiem *Acinetobacter baumannii*. Kādā citā pētījumā ir iegūti *A. baumannii* izolāti no elpceļiem, un tiem ir konstatēts NDM-1, kā rezultātā izolāti bija rezistenti pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu (Bonnin *et al.*, 2012). Kas pierāda, ka Eiropā šis gēns ir izplatīts un iespējams, ka arī maģistrā pētītajiem elpceļu izolātiem varētu būt šis NDM-1 gēns.

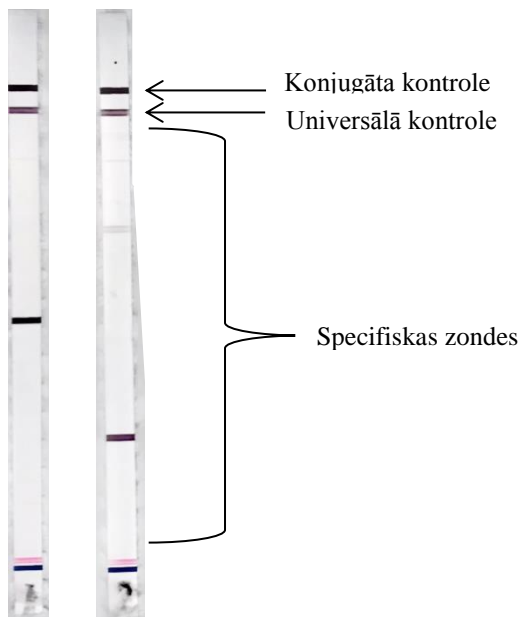
Kādā pētījumā tika pētīti 964 *A. baumannii* izolāti, kas galvenokārt tika iegūti no elpceļiem. Imipenēma rezistence tika novērota 389 (40,3%) (Kaur *et al.*, 2014), kas ir līdzīgi kā maģistra darba izstrādes laikā, kas bija 42,11%. Kā arī pētījumā tika noteikts, ka *A. baumannii* izolātiem MBL aktivitāte tika novērota 80,3%. *A. baumannii* MBL pozitīvajiem izolātiem bija lielāka rezistence pret antibakteriālajiem līdzekļiem, salīdzinot ar MBL negatīvajiem izolātiem. MBL pozitīviem *A. baumannii* izolātiem tika noteikta rezistence pret ceftazidīmu, cefepīmu, kas attiecīgi bija 98,72% un 97,12%. Kā arī pret amikacīnu, ciprofloksacīnu, piperacilīnu, kas attiecīgi bija 87,22%, 98,08% un 91,05% (Kaur *et al.*, 2014). Salīdzinot ar šo pētījumu, maģistra darba izstrādes laikā arī tika iegūti līdzīgi dati, ka

pret ceftazidīmu ir noteikta augsta rezistences vērtība, kas bija vislielākā no visiem izmantotajiem antibakteriālajiem līdzekļiem - 55%.

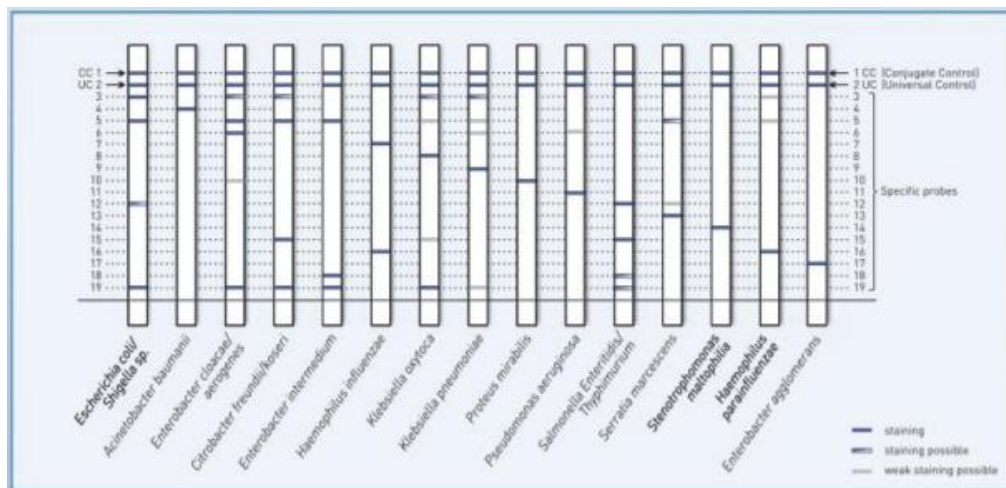
Kāda pētījuma rezultātos tika noteikts, ka 77 (90,58%) *A. baumannii* izolātu bija MDR. Kā arī tika noteikts, ka 34 izolātiem bija *intI 1*. 1. klases integrons bieži ir atbildīgs par tādu gēnu pārvešanu, kas satur MBL, un tika noteikts, ka *blaVIM* bija visizplatītākais gēns, kam seko *blaIMP*, *blaSPM* un *blaSIM*. Gēnu kasetes, kas vēl pieder pie *intI 1*, piemēram, *arr-2*, *cmlA-7*, *sul-1*, *GES-24*, *aacA31*, *bla_{OXA-21}*, *aadA-1*, *qacED-1*, kas nodrošina rezistenci pret rifampīnu, sulfonamīdiem, hloramfenikolu, β-laktāmiem, aminoglikozīdiem (Amin *et al.*, 2019). 1. klases integroni ir nozīmīgi, ļaujot *A. baumannii* genomam uztvert un uzkrāt daudzus antibiotiku rezistences gēnus. I klases integronu gēnu kasetes rada rezistenci pret visiem zināmajiem β-laktāmiem, visiem aminoglikozīdiem, ciprofloksacīnu, hloramfenikolu, trimetoprimu, streptotricīnu, rifampīnu, eritromicīnu, fosfomicīnu, linkomicīnu (Huang *et al.*, 2015). Šie rezultāti parāda, kā attīstās *A. baumannii* multizāļu rezistence. Kā jau iepriekš tika minēts, maģistra darba laikā MDR *A. baumannii* izolātu izplatība tika novērota 45%, un, ja pētītu sīkāk, iespējams varētu identificēt 1. klases integronu, kas rada rezistenci pret vairākiem antibakteriālajiem līdzekļiem, ņemot vērā, ka maģistra darba izstrādes laikā tika identificēti vairāki paraugi, kas ir rezistenti pret visiem izmantotajiem antibakteriālajiem līdzekļiem.

3.13. *GenoType*® *BC gramnegative* testa rezultāti

Maģistra darba izstrādes ietvaros patstāvīgi tika identificēti mikroorganismi, izmantojot *GenoType*® *BC gramnegative* testu. Kopumā tika analizēti 10 paraugi, kas ņemti no pozitīvām hemokultūrām. No 10 paraugiem pieci paraugi tika identificēti kā *P. aeruginosa*, trīs paraugi tika identificēti kā *A. baumannii*, viens paraugs tika identificēts kā *Proteus mirabilis*, un viens paraugs tika identificēts kā – *Haemophilus parainfluenzae* (sk. 3.13.att.). Ar šī testa palīdzību ir iespēja sešu stundu laikā precīzi identificēt mikroorganismu, izmantojot *GenoType*® *BC gramnegative* testa baktēriju sugu identifikācijas karti (sk. 3.13.1. att.). Salīdzinot datus ar veiktajiem *GenoType*® *BC gramnegative* testiem, 2015. gadā no 12 pozitīvām hemokultūrām *P. aeruginosa* tika identificēta 2 paraugos (Zandersone, 2015). Precīza un ātrā baktēriju sugu identificēšana ir nozīmīga ātrākai patogēnu izraisīto infekciju ārstēšanai ar attiecīgi efektīvākajiem antibakteriālajiem līdzekļiem.



3.13. att *GenoType*® *BC gramnegative* testā iegūtie rezultāti, autores foto



3.13.1. att. *GenoType*® *BC gramnegative* testa baktēriju sugu identifikācijas karte (Hain Lifescience GmbH, 2005)

3.14. Biofilmu veidošanās

Maģistra darbā izstrādes laikā tika pētīta *P. aeruginosa* un *A. baumannii* paraugu spēja veidot biofilmas. No 27 paraugiem tika pētīti 15 *P. aeruginosa* un 12 *A. baumannii* paraugi. Tika noteikts, ka 15 no *P. aeruginosa* izolātiem 9 veido biofilmas, kas ir 60%, un 6 paraugi neveidoja biofilmas, kas ir 40%. No 12 *A. baumannii* izolātiem 8 veidoja biofilmas, kas ir 66,67%, bet četri neveidoja, kas 33,33%. No 15 *P. aeruginosa* divi paraugi bija multizāļu rezistenti, kā arī karbapenēmu rezistenti, kas nozīmē, ka tie bija MBL producētāji, un šie paraugi veidoja biofilmas, kas ir 22,22% no biofilmu veidotājiem. *A. baumannii* multizāļu rezistenti paraugi bija 6, un no tiem biofilmas veidoja visi, kas ir 75% no biofilmas veidotājiem, kā arī visi bija karbapenēmu rezistenti, kas nozīmē, ka tie arī bija MBL producētāji. Dati apkopoti 3.3. tabulā.

3.3. tabula

***P. aeruginosa* un *A. baumannii* spēja veidot biofilmas (n=27), autores sastādīta tabula**

Biofilmu veidošana	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=15)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=12)
Veido	9	8
Neveido	6	4

Pētījumos tiek apstiprināta pozitīva korelācija starp bioplēves veidošanos un multizāļu rezistenci. No 72 *A. baumannii* izolātiem 65 paraugi bija multizāļu rezistenti paraugi, un no tiem 42 paraugi veidoja biofilmas (Badave *et al.*, 2015). Kā arī tika iegūti dati, ka no 100 *A. baumannii* izolātiem 32 paraugi bija multizāļu rezistenti un visi šie paraugi veidoja biofilmas. 98% izolātiem tika noteikti vairāk nekā četri ar biofilmu veidošanos saistīti gēni, kā piemēram, *csuE* un *pgaB* bija noteikti attiecīgi 100% un 98%. I klases integrons (67%) bija biežāk noteikts nekā II klases integrons (10%) (Zeighami *et al.*, 2019). Kā arī no 156 *A. baumannii* izolātiem, izmantojot mikrotitru plates metodi, 104 paraugiem tika noteikts mērena vai spēcīga bioplēves veidošanās, no kuriem 98 paraugi (94,23%) bija multizāļu rezistentie celmi (Babapour *et al.*, 2016). Bioplēves veidošanās ir vairāk saistīta ar multizāļu rezistentiem *A. baumannii* celmiem, kas arī maģistra darba izstrādes laikā apstiprinājās – 6 no 8 multizāļu rezistentiem paraugiem 75% veidoja biofilmas.

Kādā pētījumā tika pētīti 109 *P. aeruginosa* un *A. baumannii* izolāti, no kuriem 46 paraugi, kas ir 42%, veidoja bioplēves. Starp bioplēves producētājiem 57% *P. aeruginosa* un 73% *A. baumannii* bija multizāļu rezistenti, un šis rādītājs bija statistiski nozīmīgs salīdzinājumā ar biofilmas neproducētājiem. Bioplēves produkcija ir izteiktāka multizāļu rezistentiem *A. baumannii* paraugiem nekā *P. aeruginosa* (Gurung *et al.*, 2013). Salīdzinot ar maģistra darbā iegūtajiem datiem, kopumā no 27 paraugiem bioplēvju veidojošie paraugi ir 17 (62, 96%), kas ir vairāk nekā pētījumā minēts. Tāpat kā pētījumā, arī maģistra darba izstrādes laikā tika iegūts, ka tieši *A. baumannii* multizāļu rezistentiem paraugiem ir tendence visbiežāk veidot biofilmas nekā MDR *P. aeruginosa* izolātiem. Kādā pētījumā tika secināts, ka MBL producētāji bija ievērojami vairāk konstatēti bioplēves pozitīvajos izolātos (70,3%), salīdzinot ar biofilmas negatīvajiem celmiem (31,4%) (Heydari *et al.*, 2015). Kā arī citā pētījumā tika apstiprināts, ka baktēriju paraugi, kuriem tika noteikts, ka tie ir MBL producētāji, visi veidoja bioplēves (Perez *et al.*, 2012). Tā kā divi *P. aeruginosa* un 6 *A. baumannii* paraugi bija MDR, kā arī karbapenēmu rezistenti, kas nozīmē, ka tie ir MBL producētāji, un tie veidoja biofilmas, no tā var secināt, ka MBL pozitīvi korolē ar biofilmas veidošanos.

SECINĀJUMI

1. 2019. gadā no 75 identificētajiem *P. aeruginosa* izolātiem jutība pret meropenēmu bija vislielākā - 93,33% (n=70), bet pret ciprofloksacīnu tika novērota vislielākā rezistence, kas ir 17,33% (n=13).
2. 2019. gadā no 20 identificētajiem *A. baumannii* paraugiem, vislielākā jutība tika novērota pret amikacīnu, kas ir 60% (n= 12), bet vislielākā rezistence tika noteikta pret ceftazidīmu, kas ir 55% (n=11).
3. Salīdzinot rezistences izmaiņas starp 2017. gadu un 2019. gadu, *A. baumannii* novērota ievērojama rezistences palielināšanās pret karbapenēmiem – imipenēmu un meropenēmu, kas attiecīgi ir 8,78% un 11,67%, kas liecina par metallo-β-laktamāžu producēšanu. *P. aeruginosa* novērota rezistences palielināšanās pret ciprofloksacīnu, kas ir 6,56%. *P. aeruginosa* MBL producējošo baktēriju skaits samazinās, ņemot vērā, ka rezistence pret karbapenēmiem četrus gadus laikā ir tikai samazinājusies.
4. Veicot fenotipēšanu, 2019. gadā *P. aeruginosa* visbiežāk noteiktais fenotips bija I, kurā 51 (78,46%) *P. aeruginosa* paraugs bija jutīgs pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem. Kombinētā rezistence tika konstatēta 9,33 % gadījumā (n=6). Salīdzinot 2017. gadu un 2019. gadu, kombinētā rezistence ir palielinājusies par 0,10%.
5. Veicot fenotipēšanu, 2019. gadā visbiežāk noteiktie *A. baumannii* fenotipi bija I (n=6) un III (n=6). I fenotips, kurā tika noteikti 6 paraugi (37,50%), bija jutīgs pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem, savukārt III fenotips, kurā arī tika noteikti 6 paraugi (37,50%), bija rezistents pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem. Kombinētā rezistence tika konstatēta 45% (n=9). Salīdzinot 2017. gadu un 2019. gadu, kombinētā rezistence ir samazinājusies par 15%.
6. Tika noteikts, ka no 15 *P. aeruginosa* izolātiem 9 veido biofilmas, kas ir 60%, un no 12 *A. baumannii* izolātiem 8 veidoja biofilmas, kas ir 66,67%. Pastāv pozitīva korelācija starp MDR izolātiem, kas ir MBL producētāji, un bioplēves veidošanos.
7. Izmantojot *GenoType BC gramnegative* testu, var ātri un precīzi identificēt *P. aeruginosa* un *A. baumannii* celmus.

PATEICĪBA

Vēlos izteikt pateicību savai darba vadītājai Dr. med. Ivetai Līdumai, kura ir ieguldījusi savu laiku ne tikai palīdzot izstrādāt bakalaura darbu, bet arī maģistra darbu, kā arī palīdzējusi sagatavot tēzes “International Scientific Conference on Medicine 2020” konferencei.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Abdi SN, Ghotaslou R, Ganbarov K, et al. *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infect Drug Resist.* 2020;13:423–434. Published 2020 Feb 12. doi:10.2147/IDR.S228089
2. Ahmed SAKS, Rudden M, Smyth TJ, Dooley JSG, Marchant R, Banat IM. Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(8):3521–3535. doi:10.1007/s00253-019-09618-0
3. Alkasaby NM, El Sayed Zaki M. Molecular Study of *Acinetobacter baumannii* Isolates for Metallo- β -Lactamases and Extended-Spectrum- β -Lactamases Genes in Intensive Care Unit, Mansoura University Hospital, Egypt. *Int J Microbiol.* 2017;2017:3925868. doi:10.1155/2017/3925868
4. Alksne L. *P. aeruginosa* un *A. baumannii* jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem. Bakalaura darbs. Rīga: Latvijas Universitāte Medicīnas fakultāte, 2018. 77 lpp.
5. Amin M, Navidifar T, Saleh Shooshtari F, Goodarzi H. Association of the genes encoding Metallo- β -Lactamase with the presence of integrons among multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Drug Resist.* 2019;12:1171–1180. Published 2019 May 13. doi:10.2147/IDR.S196575
6. Anantharajah A, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(9):734–749. doi:10.1016/j.tips.2016.05.011
7. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1249–1260. Published 2018 Aug 21. doi:10.2147/IDR.S166750
8. Babapour E, Haddadi A, Mirnejad R, Angaji SA, Amirmozafari N. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 6, no. 6, pp. 528–533, 2016.
9. Badave GK, Kulkarni D. Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Challenge. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(1):DC08-DC10. doi:10.7860/JCDR/2015/11014.5398
10. Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, and Harwood CS. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene

- expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res.* (2012) 40, 7207–7218. doi: 10.1093/nar/gks384
11. Bellés A, Bueno J, Rojo-Bezares B, et al. Characterisation of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from lower tract respiratory infections in a Spanish hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(10):1847–1856. doi:10.1007/s10096-018-3318-3
 12. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med.* 2016;16(1):174. Published 2016 Dec 5. doi:10.1186/s12890-016-0339-5
 13. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin.* 2015;31(4):707–721. doi:10.1185/03007995.2015.1018989
 14. Centers for Disease Control and Prevention. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. 2017. [tiešsaiste] Pieejams internetā: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>
 15. Chang CY. Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2018;8:2671. Published 2018 Jan 9. doi:10.3389/fmicb.2017.02671
 16. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol.* 2019;10:913. Published 2019 May 3. doi:10.3389/fmicb.2019.00913
 17. Clark ST, Diaz Caballero J, Cheang M. Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa* population infecting an adult with cystic fibrosis. *Sci Rep.* 2015;5:10932. Published 2015 Jun 5.
 18. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, et al. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol.* 2012;14(8):1913–1928. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x
 19. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. *J Med Microbiol.* 2017;66(5):551–559. doi:10.1099/jmm.0.000475
 20. Da Cunda P, Iribarnegaray V, Papa-Ezdra R, Bado I, González MJ *et al.* Characterization of the Different Stages of Biofilm Formation and Antibiotic Susceptibility in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Strain. *Microb Drug Resist.* 2019 Dec 31. doi: 10.1089/mdr.2019.0145.

21. Eze EC, Chenia HY, El Zowalaty ME. Acinetobacter baumannii biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist.* 2018;11:2277–2299. Published 2018 Nov 15. doi:10.2147/IDR.S169894
22. Fallah, Fatemeh, et al. "Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1)." *Iran J Clin Infect Dis* 6.4 (2011): 171-77.
23. Fernández-Cuenca F, Tomás M, Caballero-Moyano FJ, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J *et al.* Reduced susceptibility to biocides in Acinetobacter baumannii: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Dec;70(12):3222-9. doi: 10.1093/jac/dkv262
24. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the Type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa. *Curr Protein Pept Sci.* 2012;13(8):831-842. doi:10.2174/138920312804871210.
25. Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa from intensive care unit. *Indian J Crit Care Med.* 2013;17(4):214-218. doi:10.4103/0972-5229.118416
26. Guzel M, Afsar Y, Akdogan D, Moncheva P, Hristova P, Erdem G. Evaluation of metallo-beta-lactamase production in multiple antibiotic-resistant Pseudomonas spp. and Acinetobacter baumannii strains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32.5. 2018: 1285-1290.
27. Hain Lifescience GmbH. GenoType BC grampositive and GenoType BC gramnegative. Species identification and detection of antibiotic resistances, 2005 [tiešsaiste]. Pieejams internetā: http://www.saixxtechnologies.com/PDF%20Hain/bc_flyer_engl.pdf
28. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, et al. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of Pseudomonas aeruginosa. *Toxins (Basel).* 2016;8(8):236. Published 2016 Aug 9. doi:10.3390/toxins8080236.
29. Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(2):91–102. doi:10.1038/nrmicro.2017.148.
30. Hassan KA, Liu Q, Elbourne LDH, et al. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in Gram-negative pathogens. *Res Microbiol.* 2018;169(7-8):450–454. doi:10.1016/j.resmic.2018.01.001

31. He X, Lu F, Yuan F, et al. Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(8):4817–4825. doi:10.1128/AAC.00877-15
32. Heydari S, Eftekhari F. Biofilm Formation and β -Lactamase Production in Burn Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(3):e15514. Published 2015 Mar 21. doi:10.5812/jjm.15514
33. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2010;10(4):441–451. doi:10.1586/erp.10.49
34. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* 2015 Jun;47(2):81-97. doi: 10.3947/ic.2015.47.2.81.
35. Jabalameli F, Taki E, Emaneini M, Beigverdi R. Prevalence of metallo- β -lactamase-encoding genes among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Iran. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2018;51(3):270–276. doi:10.1590/0037-8682-0044-2018
36. Jiménez-Guerra G, Heras-Cañas V, Gutiérrez-Soto M, et al. Urinary tract infection by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and therapeutic alternatives. *J Med Microbiol.* 2018;67(6):790–797. doi:10.1099/jmm.0.000742
37. Kang D, Kirienko DR, Webster P, Fisher AL, Kirienko NV. Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. *Virulence.* 2018;9(1):804-817. doi:10.1080/21505594.2018.1449508
38. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2017;33(3):300–305. doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15
39. Kaur A, Gupta V, Chhina D. Prevalence of metallo- β -lactamase-producing (MBL) *Acinetobacter* species in a tertiary care hospital. *Iran J Microbiol.* 2014;6(1):22–25.
40. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):101. Published 2017 Apr 27. doi:10.1186/s12866-017-1012-8

41. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(6):a027029. Published 2016 Jun 1. doi:10.1101/cshperspect.a027029
42. LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol.* 2012;Chapter 6:Unit-6E.1.. doi:10.1002/9780471729259.mc06e01s25
43. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):510–543. doi:10.1128/MMBR.00013-14
44. Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:55. Published 2017 Mar 13. doi:10.3389/fcimb.2017.00055
45. Li Y, Zhang X, Wang C, et al. Characterization by phenotypic and genotypic methods of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *Mol Med Rep.* 2015;11(1):494–498. doi:10.3892/mmr.2014.2685
46. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel).* 2012;12(3):2519–2538. doi:10.3390/s120302519
47. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* 2014 Apr;37(2):119-27.
48. Luo LM, Wu LJ, Xiao YL, et al. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 using non-native acyl-homoserine lactones. *BMC Microbiol.* 2015;15:62. Published 2015 Mar 7. doi:10.1186/s12866-015-0397-5
49. Malhotra S, Limoli DH, English AE, Parsek MR, Wozniak DJ. Mixed communities of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* exhibit enhanced resistance to host antimicrobials. *MBio* 9.2 (2018): e00275-18.
50. McConnell MJ, Pérez-Romero P, Lepe JA, et al. Positive Predictive Value of Leeds *Acinetobacter* Medium for Environmental Surveillance of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011;49(12):4416. doi:10.1128/JCM.05412-11.
51. Meini MR, Llarrull LI, Vila AJ. Evolution of Metallo- β -lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution. *Antibiotics (Basel).* 2014;3(3):285–316. doi:10.3390/antibiotics3030285

52. Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand?. *Curr Drug Targets.* 2016;17(9):1029–1050. doi:10.2174/1389450116666151001105622
53. Moradali MF, Donati I, Sims IM, Ghods S, Rehm BH. Alginate Polymerization and Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2015;6(3):e00453-15. Published 2015 May 12. doi:10.1128/mBio.00453-1515
54. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:39. Published 2017 Feb 15. doi:10.3389/fcimb.2017.00039
55. Morris FC, Dexter C, Kostoulias X, Uddin MI, Peleg AY. The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019;10:1601. Published 2019 Jul 17. doi:10.3389/fmicb.2019.01601
56. Neyestanaki DK, Mirsalehian A, Rezagholizadeh F, Jabalameli F, Taherikalani M, Emaneini M. Determination of extended spectrum beta- lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC- beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns.* 2014 Dec;40(8):1556-61. doi: 10.1016/j.burns.2014.02.010.
57. Nicol M, Alexandre S, Luizet JB, et al. Unsaturated Fatty Acids Affect Quorum Sensing Communication System and Inhibit Motility and Biofilm Formation of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):214. Published 2018 Jan 10. doi:10.3390/ijms19010214
58. Noori M, Karimi A, Fallah F, Hashemi A, Alimehr S, Goudarzi H, Aghamohammad S. High prevalence of metallo-beta-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* isolated from two hospitals of Tehran, Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases* 2.3; 2014
59. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Rodea GE, et al. Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from pediatric patients associated to biofilm formation. *Microbiol Res.* 2015;172:68-78. doi:10.1016/j.micres.2014.11.005
60. Owlia P, Nosrati R, Alaghebandan R, Lari AR. Antimicrobial susceptibility differences among mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *GMS Hyg Infect Control.* 2014;9(2):Doc13. Published 2014 Aug 19. doi:10.3205/dgkh000233

61. Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* 2019;6(2):109–119. Published 2019 Apr 17. doi:10.1016/j.gendis.2019.04.001
62. Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S, et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(21):5558–5563. doi:10.1073/pnas.1800961115
63. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1277:91–104. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x
64. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):177–192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
65. Pérez A, Gato E, Pérez-Llarena J, et al. High incidence of MDR and XDR *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(5):1244-1252.
66. Perez LR, Antunes AL, Freitas AL, Barth AL. When the resistance gets clingy: *Pseudomonas aeruginosa* harboring metallo- β -lactamase gene shows high ability to produce biofilm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(5):711-714. doi:10.1007/s10096-011-1363-2
67. Pita T, Feliciano JR, Leitão JH. Small Noncoding Regulatory RNAs from *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* Complex. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):3759. Published 2018 Nov 27. doi:10.3390/ijms19123759
68. RA, Poirel L, Naas T, et al. Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):E362–E365. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03928.x
69. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* vol. 13,6 (2010): 151-71. doi:10.1016/j.drup.2010.08.003
70. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int.* 2015;2015:759348. doi:10.1155/2015/759348

71. Reena AAA, Subramaniyan A, Kanungo R. Biofilm formation as a virulence factor of *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogen in critical care units. *Journal of Current Research in Scientific Medicine* 3.2 (2017): 74.
72. Richmond GE, Evans LP, Anderson MJ, et al. The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner [published correction appears in *MBio*. 2016;7(3). pii: e00852-16. doi: 10.1128/mBio.00852-16]. *mBio*. 2016;7(2):e00430-16. Published 2016 Apr 19. doi:10.1128/mBio.00430-16
73. Sawa T, Shimizu M, Moriyama K, Wiener-Kronish JP. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit Care*. 2014 Dec 13;18(6):668. doi: 10.1186/s13054-014-0668-9.
74. Somboro AM, Osei Sekyere J, Amoako DG, Essack SY, Bester LA. Diversity and Proliferation of Metallo- β -Lactamases: a Clarion Call for Clinically Effective Metallo- β -Lactamase Inhibitors. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Aug 31;84(18). pii: e00698-18. doi: 10.1128/AEM.00698-18
75. Spapen H, Jacobs R, Van Gorp V, Troubleyn J, Honoré PM. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):14. Published 2011 May 25. doi:10.1186/2110-5820-1-14
76. Stempel N, Neidig A, Nusser M, et al. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2013;8(12):e82240. Published 2013 Dec 13. doi:10.1371/journal.pone.0082240
77. Sugawara E, Nikaido H. OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2012;194(15):4089–4096. doi:10.1128/JB.00435-12
1. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018 [tiešsaiste] Pieejams: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>
78. Wang Y, Gao L, Rao X, et al. Characterization of lasR-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2018;8(1):13344. Published 2018 Sep 6. doi:10.1038/s41598-018-30813-y
2. WHO (World Health Organisation) WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017 [tiešsaiste] Pieejams internetā:

<https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

79. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(1):544–553. Published 2015 Nov 9. doi:10.1128/AAC.01650-15
80. Wisplinghoff H. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. *Infectious Diseases*. 2017;8: 1579-1599. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00181-7
81. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. *PLoS One*. 2013;8(4):e60225. doi:10.1371/journal.pone.0060225
82. Yang CH, Su PW, Moi SH, Chuang LY. Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-Phenotype Correlation. *Molecules*. 2019 May 14;24(10). pii: E1849. doi: 10.3390/molecules24101849.
83. Yang H, Hu L, Liu Y, Ye Y, Li J. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in China. *J Chemother*. 2016;28(5):443–445. doi:10.1179/1973947815Y.0000000017
84. Zandersone B. Klīniski nozīmīgo gram negatīvo baktēriju rezistence pret antibakteriālajiem līdzekļiem. Maģistra darbs. Rīga: Latvijas Universitāte Medicīnas fakultāte, 2015. 110 lpp.
85. Zeighami, H., Valadkhani, F., Shapouri, R. *et al.* Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. *BMC Infect Dis* 19, 629 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4272-0>
86. Zhang Y, Li Z, He X, et al. Overproduction of efflux pumps caused reduced susceptibility to carbapenem under consecutive imipenem-selected stress in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Drug Resist*. 2018;11:457–467. Published 2018 Mar 29. doi:10.2147/IDR.S151423

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs "Biofilmas un metallo- β – laktamāzes producēšanas noteikšana *Pseudomonas aeruginosa* un *Acinetobacter baumannii* baktēriju celmos"

izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Linda Alksne _____
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Dr. med. Iveta Līduma _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2020., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: docente, Kristīne Saleniece, dr.pharm. _____
(paraksts)