

## Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas metode *blaCTX-M* gēnu noteikšanai *ESBL* producējošām enterobaktērijām

Jānis Meisters<sup>1</sup>, Juris Stefanovičs<sup>2</sup>, Arta Olga Balode<sup>3</sup>,  
Reinis Rugājs<sup>3</sup>, Uga Dumpis<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Rīgas Stradiņa universitāte, Tālākizglītības fakultāte, Latvija

<sup>2</sup>Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Apvienotā laboratorija, Latvija

<sup>3</sup>Rīgas Stradiņa universitāte, Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Latvija

<sup>4</sup>Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca, Infekciju slimību un  
hospitālās epidemioloģijas dienests, Latvija

**Ievads.** Pēdējo gadu laikā pieaug karbapenēmu rezistentu, bet karbapenemāžu negatīvo paplašināta spektra beta laktamāzi (*extended spectrum beta lactamase* – *ESBL*) producējošo enterobaktēriju, tostarp *Klebsiella pneumoniae* un *Escherichia coli*, ierosināto infekciju skaits. *ESBL* ir enzīmi, kas nosaka rezistenci pret trešās paaudzes cefalosporīniem, monobaktāmiem un nereti kombinējas ar rezistenci pret citām antibiotiku grupām.

Visbiežākais *ESBL* producējošo baktēriju rezistences mehānisms ir enzīma cefotaksimāzes (*CTX-M*) producēšana, ko kodē *blaCTX-M* gēni. Filoģenētiski cefotaksimāzes dalās 5 grupās: *CTX-M-1*, *CTX-M-2*, *CTX-M-8*, *CTX-M-9* un *CTX-M-25*. Katram reģionam tā ir specifiska – Eiropā visbiežāk sastopama *CTX-M-1* grupa.

**Darba mērķis, materiāls un metodes.** Darba mērķis ir noteikt Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā (PSKUS) izdalīto *ESBL* producējošo, pret karbapenēmiem rezistentu un karbapenemāžu neproducējošo *Klebsiella pneumoniae* celmu iespējamās rezistences mehānismus.

Pētījumam tika izvēlēti un analizēti 22 *ESBL* producējoši, karbapenēmu rezistenti un karbapenemāzes neproducējoši *Klebsiella pneumoniae* celmi, kas izolēti no PSKUS stacionētiem pacientiem laikā no 2016. gada aprīļa līdz 2017. gada janvārim.

Antibiotikogramma, *ESBL* un karbapenemāžu produkcija tika noteikta atbilstoši PSKUS Apvienotās laboratorijas mikrobioloģijas nodaļas algoritmiem un aktuālajām Eiropas Antibakteriālās jutības testēšanas komitejas (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – *EUCAST*) standarta rekomendācijām. Ar polimerāzes ķēdes reakcijas metodi tika pierādīta visu analizēto *Klebsiella pneumoniae* celmu piederība *CTX-M* klasei. *CTX-M* tipa noteikšanai, izmantojot Kristofera Birketa (*Birkett et. al.*) aprakstītās praimeru sekvenču un zondes (sk. tālāk), tika adaptēta reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas (*RT-PKĀR*) metode.

Zondes: *CTX-M-1* grupas zonde; *CTX-M-2* grupas zonde; *CTX-M-9* grupas zonde; universāla *CTX-M* zonde jebkuras *CTX-M* grupas noteikšanai, izņemot *CTX-M-1* grupu.

Dezoksiribonukleīnskābes (*DNS*) izdalīšana veikta ar karsēšanas metodi 100 °C. *RT-PKĀR* tika veikta ar *RotorGeneQ* iekārtu, izmantojot *QuantiNova Probe PCR (Qiagen)* reaģentus, pēc programmas: polimerāzes aktivācija 2 minūtes 95 °C, kam seko 40 cikli uzstādījumā 5 sekundes 95 °C un 30 sekundes 60 °C ar amplifikācijas noteikšanu.

Kā sliekšnis, virs kura paraugi tika interpretēti kā pozitīvi, tika izvēlētas 0,05 relatīvās fluorescences vienības. Negatīvā kontrolē tika izmantots no klīniskā materiāla izdalīts *ESBL* neproducējošs *Klebsiella pneumoniae* celms. Pozitīvās kontrolēs tika izmantoti Pai un citu autoru (*Pai et al.*) iepriekš veiktā pētījumā izolētie un *CTX-M* grupas identificētie celmi (no mikroorganismu bankas): *Escherichia coli* – *CTX-M-9* grupa; *Klebsiella pneumoniae* – *CTX-M-1* grupa.

**Rezultāti.** Iegūtie rezultāti liecina, ka visas 22 pētījumā iekļautās *ESBL* producējošās karbapenēmu rezistentās *Klebsiella pneumoniae* pieder *CTX-M-1* grupai. 50% (n = 11) paraugu saņemti no reanimācijas nodaļā stacionētiem pacientiem, 32% (n = 7) – no plaušu slimību nodaļas un 18% (n = 4) – no citām nodaļām vairāk nekā 72 stundas pēc hospitalizācijas.

**Secinājumi.** Izstrādāto metodi iespējams izmantot enterobaktēriju *CTX-M* filoģenētisko grupu noteikšanai epidemioloģiskam monitoringam lokālā un nacionālā mērogā. Padziļinātai molekulāri epidemioloģiskai analīzei jānosaka *CTX-M* apakštips grupas ietvaros, veicot *blaCTX-M* gēnu sekvenēšanu.