

LATVIJAS UNIVERSITĀTE



IVETA LĪDUMA

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS
VIRULENCES FAKTORI UN EPIDEMIOLOĢISKĀ NOZĪME

PROMOCIJAS DARBS

Doktora grāda iegūšanai Medicīnas nozarē
Apakšnozare: Mikrobioloģija un virusoloģija

Rīga, 2016

LATVIJAS UNIVERSITĀTE



Iveta Līduma

Staphylococcus epidermidis
virulences faktori un epidemioloģiskā nozīme

Promocijas darbs

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr.habil.med. profesore Aija Žileviča
Dr. biol. asoc. profesore Tatjana Tračevska

Rīga, 2016

Promocijas darbs izstrādāts **Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē**
laika posmā no **2010. gada līdz 2016. gadam**



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projekta „Kapacitātes stiprināšana starpnozaru pētījumos biodrošībā” 2009/0224/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAAA/055 ietvaros.

Darbs sastāv no trīs nodaļām, diskusijas, secinājumiem un 5 pielikumiem. Darba apjoms ir 111 lappuses, izmantota informācija no 164 literatūras avotiem.

Darba forma: disertācija **Medicīnas nozarē, Mikrobioloģijas un virusoloģijas apakšnozarē**

Darba zinātniskie vadītāji: Profesore Aija Žilēvica, LU Medicīnas fakultātē
asoc.profesore Tatjana Tračevska, LU Medicīnas fakultātē

Darba recenzenti:

Prof. Uga Dumpis, LU Medicīnas fakultātē,
Prof. Angelika Krūmiņa, Rīgas Stradiņa universitātē,
Prof. Mario Milco d'Elios, Florences Universitātē, Itālija

Promocijas darba aizstāvēšana notiks: 2016. gada 20. decembrī plkst. 12.00
Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas nozaru promocijas padomes atklātā sēdē

Latvijas Universitātes Mazajā aulā, Raiņa bulvārī 19

Ar promocijas darbu var iepazīties LU bibliotēkā, Rīgā, Raiņa bulvārī 19

LU medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs _____ /Valdis Pīrāgs/

promocijas padomes sekretāre _____ /Kristīne Saleniecel/

©Latvijas Universitāte, 2016
© Iveta Līduma, 2016

Anotācija

Koagulāzes negatīvie stafilokoki ir kļuvuši par nozīmīgiem hospitālo infekciju ierosinātājiem. Izplatītākais šīs grupas pārstāvis ir *Staphylococcus epidermidis*, par kura svarīgāko virulences faktoru tiek uzskatīta spēja veidot biofilmu. Lai diferencētu komensālos celmus no kolonizējošiem un invazīviem celmiem, pētījumā tika izmantotas gan fenotipiskās metodes, nosakot biofilmas veidošanu, antibiogrammu, bioķīmiskās īpašības, gan arī molekulārās bioloģijas izmeklēšanas metodes, nosakot potenciālos virulences marķierus - gēnus *aap/icaA* un *mecA*. *S.epidermidis* celmu tipēšanai tika pielietota MLST (multilokusu sekvenču tipēšana) metode.

Promocijas darba pētījuma rezultāti liecina, ka biofilmu veidošana vairāk raksturīga klīniskajiem izolātiem, statistiski ticami biežāk gēni *aap/icaA* bija noteikti klīniskajos *S.epidermidis* celmos. No veseliem cilvēkiem izdalīto *S.epidermidis* rezistence pret metecilīnu konstatēta 12,5% no analizētajiem izolātiem, klīniskie celmi visbiežāk bija rezistenti pret metecilīnu (97,8%). Kontaktlēcas, kā biomateriāls, ir lielisks *in vitro* modelis, lai pētītu baktēriju biofilmu veidošanos. Apkopojot pētījuma rezultātus, var secināt, ka uz silikonhidrogēla materiāla stafilokoki adherējas labāk kā uz hidrogēla lēcām. Lietojot *S.epidermidis icaA(+)* celmu, adhēzijas apjoms uz dažādu materiālu kontaktlēcu virsmas būtiski pieauga, salīdzinot ar adhēzijas apjomu, izmantojot *S.epidermidis icaA(-)* celmu.

MLST ir genotipēšanas metode, kas ļauj noteikt epidemioloģisku saikni starp baktēriju celmiem un izpētīt to mikroevolūciju. Pētījumā genotipēšana tika veikta *S.epidermidis* celmiem ar mērķi noteikt genotipu un tā izmaiņas atkarībā no lokalizācijas un cilvēka atrašanās ilguma stacionārā. Kopumā tika analizētas 12 *S.epidermidis* tīrkultūras un to 168 DNS sekvences, tika noteikti 9 dažādi sekvences tipi (ST). Neviens no atrastiem ST nepiederēja pie ST2 vai ST5 grupas, ko veido nozokomiālie *S.epidermidis* celmi. Pētījuma rezultāti ļauj secināt par *S.epidermidis* genotipisko dažādību uz cilvēka ādas un spēju iegūt metecilīnrezistenci īsa laika periodā, cilvēkam atrodoties hospitalajā vidē. Šis ir pirmais *S.epidermidis* genotipēšanas pielietojums Latvijā, un tā rezultāti norāda uz nepieciešamību pēc tālākiem molekulāri epidemioloģiskiem pētījumiem slimnīcās un sabiedrībā.

Atslēgvārdi: *S.epidermidis*, metecilīnrezistence, virulences faktori, genotipēšana

Abstract

Coagulase-negative staphylococci (CONS) have emerged as an important pathogens causing nosocomial infections. *Staphylococcus epidermidis* is the most common and leading species of CONS. The most important virulence factor is biofilm formation. In order to differentiate commensal strains from colonizing and invasive strains, phenotypical methods such as antibiogram and biochemical characteristics, molecular biology methods were used to detect potential virulence markers: genes *aap/icaA* and *mecA*. MLST (multilocus sequence typing) was used for genotyping *S.epidermidis* strains.

The present thesis results indicate that biofilm formation is more common in clinical isolates, the prevalence of both genes *aap/icaA* was significantly higher among clinical strains. *S.epidermidis* resistance to methicillin in isolates from healthy persons was (12.5%), however clinical isolates were more resistant (97.8%). As a biomaterial contact lenses are excellent model for *in-vitro* studying of *S.epidermidis* biofilm formation. Summarizing results of biofilm formation the following conclusion can be made: *S.epidermidis* adhere better on siliconhydrogel material than hydrogel lenses. Adhesion volume on surface increased significantly using *S.epidermidis icaA(+)* strain, compared to adhesion by using *S.epidermidis icaA(-)* strain.

In this study, MLST was used mostly on contaminating and colonizing strains of *S.epidermidis* with the aim to determine changes in strain genotypes depending on the localization and hospitalization time. From 12 *S. epidermidis* cultures and the corresponding 168 DNA sequences we revealed 9 different STs. None of the STs were related to the globally known clonal complexes of ST 2 or of ST 5 of nosocomial *S. epidermidis*. Results of the study are showing the genetic polymorphism of *S.epidermidis* on human skin and the ability to gain methicillin resistance after admission to hospital. This is a first attempt of *S. epidermidis* genotyping in Latvia, pointing at urgent need for further studies of *S. epidermidis* epidemiology in hospitals and community.

Key words: staphylococci, methicillin resistance, virulence factors, genotyping

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Aae - bifunkcionāls autolizīns un adhezīns
Aap - ar akumulāciju asociētais proteīns
ACME – arginīna kataboliskais mobilais elements
AFLP - amplificēto fragmento garuma polimorfisms
AIDS - iegūts imūndeficīta sindroms
AMPs – antimikrobiāli peptīdi
ATCC- *American Type Culture Collection*- references kultūru kolekcija
Bap – ar biofilmu asociētais proteīns
CA-MRSA – sabiedrībā iegūts meticilīnrezistentais *Staphylococcus aureus*
CC – klonālais komplekss
CNS - centrālā nervu sistēma
DDT – disku difūzijas tests
DLV – divkārša lokusa varianti
DNS – dezoksiribonukleīnskābe
e- DNS – ekstracelulārā dezoksiribonukleīnskābe
HA-MRSA – ar veselības aprūpi asociētais meticilīnrezistentais *S. aureus*
HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss
IS – insercijas sekvenca
ITN – intensīvās terapijas nodaļa
KONS - koagulāzes negatīvie stafilokoki
kvv – koloniju veidojošās vienības
McF – *Mac Farland* standarts
MGEs – mobilie ģenētiskie elementi
MLST – daudzlokusu sekvenēšanas tipēšana
MLVA - daudzlokusu variabla tandēma atkārtojumu analīze
MRSA - meticilīnrezistentie *Staphylococcus aureus*
MRSE - meticilīnrezistentie *Staphylococcus epidermidis*
MSSE – meticilīn jutīgie *Staphylococcus epidermidis*
MSCRAMM - mikrobu virsmas komponentu atpazīstošās adhēzijas matricas molekulas

PBP2 - penicilīnu saistošais proteīns 2
PCR – polimerāzes ķēdes reakcija
PFGE – pulsējošā lauka gēla elektroforēze
PIA – intercelulārs polisaharīdu adhezīns
PNAG – poli – N- acetilglukozamīns
PSMs – fenolā šķīstoši modulīni
RAPD - nejauši amplificētas polimorfiskas DNS analīzes
rep-PCR - uz atkārtotām sekvencēm balstīta polimerāzes ķēdes reakcija
RFLP - restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms
SCCmec – stafilokoku hromosomālā kasete mec
SdrF – kolagēnu saistošais virsmas proteīns
SdrG – fibrinogēnu saistošais virsmas proteīns
SLV – viena lokusa variants
ST – sekvences tips
TAE - Tris/Acetate/EDTA buferis
UCI – urīnceļu infekcijas
UV – ultravioletais starojums
TSA- triptikāzes sojas agārs
TSB - triptikāzes sojas buljons
VRSA - vankomicīna rezistentais *Staphylococcus aureus*

Saturs

Anotācija.....	3
Annotation	4
Darbā lietotie saīsinājumi	5
Ievads.....	10
Darba mērķis	10
Darba uzdevumi.....	11
Darba zinātniskā novitāte	13
1.Literatūras apskats	14
1.1. Stafilokoku vispārējs raksturojums	15
1.2. Koagulāzes negatīvie stafilokoki (KONS).....	16
1.3. Virulences faktori	17
1.4. Meticilīnrezistence	19
1.4.1. <i>SCCmec</i> kasetes molekulārā uzbūve	20
1.5. Biofilmas veidošanās mehānisms.....	22
1.6. Biofilmas veidošanās procesu regulācija.....	26
1.6.1. Quorum sensing process.....	26
1.6.2. Vides faktoru ietekme	27
1.7. Fenotipiskā un ģenētiskā mainība.....	28
1.8. KONS patogenitāte	29
1.8.1. Nozokomiālās infekcijas.....	30
1.8.2. Ar katetru lietošanu saistītās infekcijas	33
1.8.3. Protēžu infekcijas	34
1.8.4. Ar kontaktlēcu lietošanu saistītās acs infekcijas	35
1.9. <i>S.epidermidis</i> tipēšanas metodes	37
1.9.1 Fenotipēšanas metodes	37
1.9.2 Genotipēšanas metodes.....	38
2. Materiāli un metodes	43
2.1.Pētījuma apraksts.....	43
2.2.Izolātu kolekcijas un datu bāzes veidošana	44
2.3. Mikrobioloģiskās barotnes	44
2.4. <i>S.epidermidis</i> fenotipiskās izmeklēšanas metodes	45

2.4.1. Stafilokoku identifikācija.....	45
2.4.2. Antimikrobiālās jutības noteikšana	45
2.4.3. Hemolītiskās aktivitātes noteikšana.....	46
2.4.4. Biofilmas veidošanās noteikšana.....	47
2.4.5. <i>S. epidermidis</i> adhēzijas spēju noteikšana.....	48
2.5. Genotipiskās izmeklēšanas metodes.....	49
2.5.1. DNS izdalīšana	49
2.5.2. Polimerāzes ķēdes reakcija.....	50
2.5.3. PCR produktu kvalitatīva noteikšana ar agarozes gēla elektroforēzi.....	51
2.5.4. Rezultātu interpretācija.....	51
2.5.5. Datu statistiskās apstrādes metodes	52
2.5.6. MLST metode.....	53
2.5.7. Rezultātu apstrāde.....	55
3. Rezultāti	57
3.1. Koagulāzes negatīvo stafilokoku identifikācija	57
3.2. Fermentatīvā aktivitāte	58
3.3. Hemolītiskā aktivitāte	60
3.3.1. Saistības starp baktēriju meticilīnrezistenci un hemolīzi noteikšana.....	61
3.4. <i>S. epidermidis</i> jutības pret meticilīnu noteikšana ar disku difūzijas testu.....	63
3.5. <i>MecA</i> gēna noteikšana ar PCR metodi	63
3.6. Mikrotitru plates metodes rezultāti	64
3.7. Virulences gēnu noteikšana.....	65
3.8. <i>S. epidermidis</i> adhēzijas spēju noteikšana dažādu materiālu kontaktlēcās..	68
3.9. MLST genotipēšanas rezultāti	69
Diskusija	74
Secinājumi	83
Publikāciju saraksts par darbā izvēlēto tēmu	84
Publicētās tēzes un ziņojumi konferencēs	85
Pielikumi	87
Literatūras saraksts	96
Pateicības.....	111

Ievads

Koagulāzes negatīvie stafilokoki (KONS) ir cilvēka normālās mikrofloras pārstāvji, taču tiem piemīt spēja izraisīt oportūniskas infekcijas. Mūsdienu medicīnas progress ir radījis pieaugošu pacientu skaitu ar novājinātu imunitāti, kuri savukārt ir ļoti uzņēmīgi pret oportūnisko patogēnu izraisītajām infekcijām. Arī medicīnā izmantojamās ierīces, kas tiek plaši izmantotas, veido baktērijām piemērotu vidi virsmu kolonizācijai un sekojošai biofilmu veidošanai. Biofilmās esošie mikroorganismi ir pasargāti no antibakteriālajiem preparātiem un arī no cilvēka organisma aizsargspēkiem - fagocītiem un antivielām. Pamatojoties uz vairāku pētījumu apkopotajiem datiem, var secināt, ka pēdējo gadu laikā aizvien vairāk pieaug to nozokomiālo infekciju skaits, kuras ierosina KONS (Piette and Verschraegen, 2009). Stafilokoku īpatnība ir tā, ka tie labi adherējas pie dažādu polimēru virsmām un veido biofilmas, ar to arī ir izskaidrojama šo baktēriju spēja ierosināt polimērasociētās infekcijas (O’Gara and Humphreys, 2001, Jain and Agarwal, 2009, Arciola et al., 2012).

Staphylococcus epidermidis ir vadošais un izplatītākais KONS grupas pārstāvis. Šiem mikroorganismiem ir ļoti raksturīga klīnisko manifestāciju dažādība. Visbiežāk *S. epidermidis* izraisa katetru un protēžu infekcijas, bakterēmiju, kā arī brūču infekcijas un endoftalmītu (Hall Stoodley et al., 2004).

Laika gaitā *S. epidermidis* ir izveidojušies virulenti celmi, kuri izplatās slimnīcās. Svarīgs iemesls ir antibakteriālo līdzekļu un dezinfektantu plašais pielietojums klīnikās, kas veicina augstu selektīvo spiedienu, kā rezultātā selekcionējas aizvien jauni, bieži vien multirezistenti baktēriju celmi. Aptuveni 90% klīnisko *S. epidermidis* celmu ir rezistenti pret metecilīnu un ir rezistenti pret vairāku grupu antimikrobiālajiem līdzekļiem. Tā rezultātā ir apgrūtināta pacientu ārstēšana, ir ilgāks hospitalizācijas laiks un palielinās ārstēšanās izmaksas (Lim and Webb, 2005).

Koagulāzes negatīvo stafilokoku virulences pētījumi ir iesākti, taču līdz šim nav īsti formulēti kritēriji, kas ļautu atšķirt komensālos no klīniski svarīgiem virulentiem celmiem ar kolonizējošām un invazīvām īpašībām. Virulences faktoru izpēte un attiecīgo virulences gēnu noteikšana ir viens no veidiem, kā varētu diferencēt šos infekcijas izraisošos stafilokoku celmus (Vandecasteele et al., 2003).

Pasaulē zinātniskie pētījumi tiek veikti, izmantojot gan fenotipiskās, gan geno-

tipiskās KONS pazīmes.

No fenotipiskajām īpašībām visvairāk tiek pētītas ekstracelulāro polisaharīdu produkcija, hemolītiskā spēja, lecitināzes, lipāzes un citu eksofermentu aktivitāte. Taču iegūtie rezultāti nav devuši pārliecinošu informāciju par kritēriju specifitāti.

Mūsdienās plaši tiek lietotas arī molekulārās tipēšanas metodes, kuru pamatā tiek analizēts baktēriju ģenētiskais polimorfisms. Tas ļauj labāk izprast mikroorganismu evolūciju un populāciju izplatīšanos. *S. epidermidis* molekulārajai izpētei tiek lietota daudzlokusu sekvenču tipēšana (MLST) un arī pulsējošā lauka gēla elektroforēzes metode (PFGE). Ar MLST var noteikt izolēto mikroorganismu celmu epidemioloģisko saistību un raksturot tos pēc noteiktā (ST) sekvenču tipa (Miragaia et al., 2008).

S. epidermidis virulences potenciāla izpēte palīdz izprast iespējami patogēno celmu izplatību slimnīcās un sabiedrībā, kā arī dod iespēju prognozēt, vai normālās mikrofloras baktērijas varētu izraisīt nopietnas infekcijas pacientam hospitalizācijas gadījumā.

Promocijas darba aktualitāte balstīta apsvērumā, ka pētījumi Latvijā šajā jomā ir sākti nesen un informācija par *S. epidermidis* celmu virulences potenciālu ir ierobežota.

Darba hipotēze

No klīniskajiem paraugiem izolētajos *S. epidermidis* celmos ir konstatējami virulences faktori un tos kodējošie gēni, kas nav sastopami *S. epidermidis* celmos, kas izolēti no vesela cilvēka organisma. Šo virulences faktoru fenotipiskā un genotipiskā noteikšana, varētu atvieglot infekciju ierosinātāju diferencēšanu no kontaminantajiem celmiem.

Pētījuma mērķis

Noteikt un raksturot fenotipiskos un genotipiskos faktorus, kas diferencē klīniskos *S.epidermidis* celmus no kontroles grupas stafilokoku celmiem, kas izdalīti no vesela cilvēka organisma..

Pētījuma uzdevumi

1. Izmantojot *BBL™ Crystal™* baktēriju identifikācijas sistēmu, noteikt klīniski prevalējošās KONS sugas
2. Noteikt kontaminanto un klīnisko *S.epidermidis* celmu fenotipiskās pazīmes:
 - enzimātisko aktivitāti
 - hemolītisko aktivitāti dažādos asins agāros
 - biofilmu veidošanas spēju in vitro, izmantojot mikrotitru plates metodi
 - izdalīto KONS jutību pret antibakteriālajiem preparātiem, lietojot *Bauer-Kirby* metodi
3. Noteikt kontaminanto un klīnisko *S.epidermidis* celmu genotipiskās pazīmes:
 - apstiprināt stafilokoku meticilīna rezistenci, nosakot *mecA* gēnu
 - noteikt stafilokoku virulences faktoru gēnus – *aap* un *icaA*
 - raksturot celmus, lietojot multilokusu sekvenču tipēšanas metodi
4. Noteikt *icaA(+)* un *icaA(-)* *S. epidermidis* celmu spēju adherēt pie polimēriem, izmantojot kā modeli acs kontaktlēcas

Darba zinātniskā novitāte

Promocijas darba ietvaros attīstītas šādas novitātes:

1. Izstrādātas piecas genotipēšanas un virulences faktoru meklēšanas metodes *S.epidermidis* pētījumiem, kuri līdz šim Latvijā netika veikti.
2. Ieviesta MLST metode *S.epidermidis* genotipēšanai.
3. Izmantojot PCR tehnoloģijas, noteikti virulences faktori, - gēni *aap*, *icaA* un metecilīna (beta-laktāmu) rezistences gēns *mecA*
4. Izmantojot modificēto mikrotitru plates metodi, noteikta biofilmas veidošanās klīniskajiem un kontroles grupas *S.epidermidis* celmiem.
5. Izstrādāta metode *S.epidermidis* adhēzijas spēju noteikšanai uz kontaktlēcu virsmas, izmantojot *icaA* (+) un *icaA* (-) *S.epidermidis* celmus.
6. Izveidota koagulāzes negatīvo stafilokoku izolātu kolekcija un atbilstoša datu bāze, ieskaitot celmu jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem.

1.Literatūras apskats

1.1. Stafilokoku vispārējs raksturojums

Stafilokoki ir nekustīgi, fakultatīvi anaerobi, katalāzes pozitīvi un sporas neveidojoši mikroorganismi. Stafilokoki ir sfēriskas formas šūnas, kuru diametrs ir 0,5–1,5 μm, tie dalās vairākās plaknēs un no klīniskā materiāla sagatavotā iztriepē novietojas pa vienai, pāros vai grupās, kas atgādina vīnogu ķekaru (Bannerman and Peacock, 2004).

Aleksandrs Ogstons bija pirmais, kurš, pētot strutas no abscesa, 1881. gadā aprakstīja ķekarus veidojošos mikroorganismus. Viņš arī norādīja uz to patogenitāti, demonstrējot baktēriju izraisītos abscesus pelēm un jūrascūciņām. F.J.Rosenbahs 1884. gadā ieviesa *Staphylococcus* ģints nosaukumu un diferencēja stafilokoku sugas, pamatojoties uz koloniju krāsu. Oranži dzeltenīgie stafilokoki tika nosaukti *Staphylococcus aureus*, bet stafilokoki, kuri veidoja baltās krāsas kolonijas, tika nosaukti *Staphylococcus albus*, vēlāk tos pārdēvēja par *Staphylococcus epidermidis*. 1960.gadā stafilokoki tika iedalīti 6 apakšgrupās (biotipos), pamatojoties uz koagulāzes testu un spēju fermentēt ogļhidrātus (Kloos and Schleifer 1975, Madigan and Martinko 2006). Stafilokoki ir toleranti pret palielinātu sāls koncentrāciju un var augt, ja NaCl koncentrācija barotnē ir 10% un lielāka. Augšanas temperatūras intervāls svārstās no 10°C līdz 45°C. Stafilokokiem ir augsta bioķīmiska aktivitāte. Tiem piemīt saharolītiskās īpašības – mikroorganismi šķeļ laktozi, maltozi, glikozi, saharozi u.c., kā arī proteolītiskās īpašības – tie šķīdina želatīnu, sarecina pienu, reducē nitrātus nitrītos. (Tortora et al., 1989).

Stafilokoku šūnas sienas galvenā sastāvdaļa ir peptidoglikāns. Peptidoglikāns tiek uzskatīts par endotoksīnu, kurš stimulē endogēno pirogēnu sintēzi, aktivē komplementa un interleikīnu Il-1 sintēzi makrofāgos, kā arī veicina polimorfonukleāro leukocītu agregāciju. Peptidoglikāna slāni penetrē teihojskābes, tās ir fosfātus saturoši polimēri, kas regulē katjonu koncentrāciju šūnas sienā. Teihojskābju brīvie gali šūnas

virsmā darbojas kā receptori un saistās pie gļotādu fibronektīna (Prescott et al., 1999). *Staphylococcus spp.* producē penicilīnu saistošos proteīnus - PBP, kuri nodrošina peptidoglikāna slāņa veidošanos. Šo dabisko penicilīnu saistošo proteīnu bioloģiskā aktivitāte ir līdzīga serīnproteāzēm. Penicilīnu saistošos proteīnus var iedalīt divos tipos: pēc molekulārā lieluma un pēc aminoskābju secību salīdzinājuma. Zema molekulārā svara PBP, kas katalizē D-alanīna karboksipeptidāzes un endopeptidāzes reakcijas, un augsta molekulārā svara PBP, kas nosaka glikotransferāzes un transpeptidāzes aktivitāti. Bifunkcionāls ir proteīns PBP2, kas papildus transpeptidāzes aktivitātei darbojas arī kā transglikozilāze (Labischinski, 1997).

Penicilīns un citi beta-laktāmu antibakteriālie līdzekļi ir specifiski transpeptidāzes un D-alanīna karboksipeptidāzes reakciju inhibitori, jo to struktūra ir līdzīga baktēriju dabiskajiem substrātiem – šūnu peptīdiem. Beta-laktāmi, izveidojot kovalentu kompleksu ar serīnu, kas atrodas transpeptidāzes domēna enzimatiskajā daļā, pārtrauc peptidoglikāna saišu veidošanos starp peptīdu ķēdēm, kas noved pie šūnas bojāejas.

Virs šūnas sienas izvietots polisaharīdus saturošs gļotu slānis, kas *in vivo* var veidot mikrokapsulu un ir nozīmīgs virulences faktors ar antifagocitāro aktivitāti. *S.epidermidis* ir pierādīti vismaz trīs atšķirīgi kapsulārie polisaharīdu tipi, turpretī *S.aureus* mikroorganismiem ir novērojamas 11 dažādu seroloģisko tipu polisaharīdu kapsulas. Visbiežāk infekcijas ir saistītas ar 5. un 8. kapsulāro tipu, bet mazāk ar 3. un 6. kapsulāro tipu (Gillespie and Hawkey, 2006).

1.2. Koagulāzes negatīvie stafilokoki (KONS)

Stafilokoki tiek iedalīti divās grupās, pamatojoties uz to spēju producēt koagulāzi. Koagulāze ir enzīms, kuru stafilokoki producē eksponenciālajā augšanas fāzē. Koagulāzes producēšana tiek uzskatīta par vienu no stafilokoku virulences faktoriem. *S.aureus* un *S. intermedius* ir vienīgie koagulāzes pozitīvo stafilokoku sugu pārstāvji, kas ir svarīgi cilvēka patoloģijā (Cucarella C. et al., 2001).

Koagulāzes negatīvo stafilokoku (KONS) grupā ir ietvertas vairāk kā 40 sugas, no kurām apmēram 20 sastopamas cilvēkiem. KONS daudzums uz ādas var būt dažāds, sākot no 10^3 līdz 10^6 cm^2 , tomēr vairāk to ir mitrajās vietās – nāsīs, aksillās, perinejā (Vuong and Otto, 2002).

KONS pieder pie cilvēka normālās mikrofloras pārstāvjiem. Tie kolonizē ādu un gļotādas. Starp cilvēku un KONS pastāv komensālas jeb labvēlīgi neitrālas attiecības, šajā gadījumā cilvēks labvēlīgi ietekmē baktērijas, nodrošinot tai mītnes vietu uz ādas virsmas, taču pats cilvēks no šīm attiecībām labumu negūst. Tāpēc šos celmus sauc par komensāliem (Finch 1997, Ziebuhr et al., 2006).

KONS savstarpēji tiek diferencēti pēc jutības pret novobiocīnu. Novobiocīns ir hinolonu grupas antibakteriālais līdzeklis, kas grampozitīvajās baktērijās bloķē topoizomerāzes IV darbību. Topoizomerāze IV ir ferments, kas atbild par baktēriju DNS replikāciju, rekombināciju un reparāciju. Rezistence pret novobiocīnu ir skaidrojama gan ar mutācijām strukturālos gēnos, kas producē izmainītu enzīmu, gan ar mutācijām regulatorajos gēnos, kā rezultātā samazinās šūnapvalka caurlaidība un arī tiek veicināta antibakteriālo līdzekļu izvade no baktērijas.

Pret novobiocīnu rezistenti ir *S. epidermidis* un citas radniecīgas KONS sugu jeb t.s. *S. epidermidis* grupa. Ja tiek runāts par visu grupu, tad mēdz lietot terminu *S. epidermidis sensu lato*.

Nozīmīgākie pret novobiocīnu jutīgie koagulāzes negatīvie stafilokoki jeb *S. epidermidis* grupa:

- *Staphylococcus epidermidis (sensu stricto)*;
- *Staphylococcus haemolyticus*;
- *Staphylococcus hominis*;
- *Staphylococcus lugdunensis*;
- *Staphylococcus schlegelii*.

Pret novobiocīnu rezistentie koagulāzes negatīvie stafilokoki:

- *Staphylococcus saprophyticus*;
- *Staphylococcus xylosus*

Neskatoties uz to, ka no cilvēka ādas ir izolētas apmēram 20 stafilokoku sugas, *Staphylococcus epidermidis* sastāda vairāk kā pusi no rezidentiem stafilokokiem ar plašu izplatību uz visas ķermeņa ādas virsmas. (Ingraham and Ingraham, 1995).

S. epidermidis ir dominējošs starp klīniskajiem izolātiem un var būt vairāk kā 75% no identificētajiem KONS celmiem. Tas varētu būt saistīts ar sugas plašo izplatību uz ādas virsmas un arī iespējamiem virulences faktoriem, kuru nav citiem KONS. No citām klīniski nozīmīgām sugām ir jāatzīmē *S. saprophyticus*, kuri izraisa urīnceļu infekcijas jaunām sievietēm, kā arī *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* un

S. simulans, kas gan kā patogēni tiek daudz retāk izolēti.

S. lugdunensis ir sastopams kā invazīvo infekciju izraisītāji, tie izraisa endokardītu, osteomielītu un sepsi (Eiff et al., 2001, Gad, 2009 Barros et al., 2012).

1.3. Virulences faktori

Atšķirībā no *S.aureus* KONS neproducē daudz toksīnu vai degradējošu eksoenzīmu. Daži no *S.epidermidis* virulences faktoriem ir tikai nesen raksturoti. *S.epidermidis* δ -toksīns ir vienīgais toksīns ar hemolītisku aktivitāti. Tā sintēzi nosaka *hed* gēns, kas ir lokalizēts *agr* lokusā. *S.epidermidis* δ -toksīns ir 24-aminoskābju peptīds, kurš no *S. aureus* homologa atšķiras tikai ar vienu aminoskābes pozīciju. Zinātniskajā literatūrā ir aprakstīti gadījumi par *S.epidermidis* δ -toksīna izraisītu nekrotizējošu enterokolītu jaundzimušajiem. Fenolā šķīstošie modulīni (PSM) darbojas kā pirmsiekaisuma citolizīni. *S. epidermidis* baktērijās atrastie alfa un beta tipi ir daudz mazāk citolītiski par *S. aureus* baktērijās atrastajiem citolizīniem (Otto 2009, David and Daum 2010).

Ir zināmi daži ar virulenci saistīti *S. epidermidis* mobīlie ģenētiskie elementi (MGE). Piemēram: arginīna kataboliskais mobīlais elements (ACME). Pirmo reizi ACME tika aprakstīts pret meticilīnu rezistentajam *S.aureus* (MRSA) celmam USA300 (King et al., 2006).

ACME ir inkorporēts stafilokoku genomā tādā pašā lokalizācijā kā SCC *mec* un tiek mediēts ar tām pašām rekombināzēm. Pētījumos ir bijis aprakstīts, ka no *S.epidermidis* šie ģenētiskie elementi tiek nodoti *S. aureus* baktērijām. Ir maz zināms par ACME funkcionēšanu *S.epidermidis*, taču ir skaidrs, ka šo elementu klātbūtne paaugstina *S.epidermidis* celmu kolonizējošās īpašības un arī spējas izdzīvot uz ādas un gļotādām. ((Widerström et al., 2012).

Tādi *S.epidermidis* enzīmi, kā ekstracelulāra metaloproteāze un cisteīna proteāze, kam abām piemīt elastāzes aktivitāte, šķeļ dažādus saimnieka organisma proteīnus: IgA, IgM, sērums albumīnu, fibrinogēnu, fibronektīnu. Lipāzes un enzīmi, kas modificē taukskābes, sekmē ādas kolonizāciju Lipāzes kodējošie gēni *gehC* un *gehSE1*, izdalīti no celmiem *S.epidermidis* 9 un RP62A, ir sekvenēti un tie uzrāda augstu similaritāti. (Longshaw 2000, Chou and Shaw, 2001).

Tiek uzskatīts, ka galvenais *S. epidermidis* virulences faktors ir spēja veidot biofilmas. Biofilmai izveidojoties, tās iekšienē esošās baktēriju šūnas tiek pasargātas no

antibakteriālo līdzekļu un arī imūnsistēmas darbības (Vuong and Otto, 2002, Presterl et al., 2007). Tabulā ir attēloti svarīgākie un pašlaik izpētītie virulences faktori.

1. tabula. *S. epidermidis* virulences faktori (ar izmaiņām no Otto, 2009)

Virulences faktors	Gēns	Funkcijas
Biofilmas veidošanās: primārā saistīšanās ar abiotiskām virsmām		
AtlE	<i>atlE</i>	Bifunkcionāls autolizīns un adhezīns, kas ietekmē virsmas hidrofobās īpašības
Aae	<i>aae</i>	Bifunkcionāls autolizīns un adhezīns
Biofilmas veidošanās: primārā saistīšanās ar matricas proteīniem		
SdrF	<i>sdrF</i>	Saistīšanās ar proteīniem
SdrG	<i>sdrG</i>	Saistīšanās ar fibrionogēnu
SdrH	<i>sdrH</i>	Iespējama saistīšanas funkcija
AtlE un Aae	<i>atlE</i> un <i>aae</i>	Saistās ar vairākiem matricas proteīniem
Intercelulārā agregācija		
PNAG (jeb PIA)	<i>icaA, icaD, icaB, icaC</i>	Intercelulārs polisaharīdu adhezīns
Bap (ar biofilmu asociētais proteīns)	<i>bap (bhp)</i>	Intercelulārs proteīnu adhezīns
Aap (ar akumulāciju asociētais proteīns)	<i>Aap</i>	Intercelulāra proteīna adhezīna priekštecis, vajadzīga proteolītiska apstrādi tā aktivēšanai
Teihojskābes	Vairāki biosintēzes gēni	Biofilmas komponenti
Protektīvie eksopolimēri		
PNAG	<i>icaA, icaD, icaB, icaC</i>	Aizsargā no IgG, AMPs, fagocitozes un no komplementa
PGA	<i>capA, capB, capC, capD</i>	Aizsargā no AMPs un no fagocitozes
Rezistence pret AMPS		
SepA proteāze	<i>sepA</i>	Iesaistīts AMP degradācijā
Aps sistēma	<i>apsR, apsX</i>	Uzrāda AMPs un regulē AMP rezistences mehānismus
Toksīni		
PSMs	<i>Psmα, psmδ, psmϵ, hld, psmβ1, psmβ2</i>	Citolizīni

Par *S.epidermidis* virulences faktoru arī tiek uzskatīta lantibiotiku

producēšana. Lantibiotikas ir bakteriocīni, kurus producē *S.epidermidis* un citas grampozitīvās baktērijas, tādas kā *Bacillus subtilis* un *Lactobacillus spp.* Lantibiotikas, tādas kā: epidermīns, Pep5, epilancīns K7 un epicidīns 280 ir peptīdu antibakteriālās vielas, kas satur retas tioētera aminoskābes lantionīnu vai arī metilalantionīnu. Lantibiotiku producēšanai ir būtiska nozīme baktēriju izplatībai uz ādas un gļotādām, iznīcinot konkurējošos mikroorganismus, visbiežāk tas izpaužas pret citām grampozitīvām baktērijām, kas ir jutīgas pret lantibiotiku baktericīdo iedarbību (Götz et al., 2014).

1.4. Meticilīnrezistence

Rezistence pret antibakteriālajiem preparātiem starp KONS celmiem ir plaši izplatīta. Meticilīnrezistence hospitālajiem *S.epidermidis* celmiem ir pieaugusi no 30 % līdz pat 90% laika posmā no 1980. gada līdz mūsdienām. Starp veseliem cilvēkiem sabiedrībā cirkulē apmēram 12% pret meticilīnu rezistentu *S.epidermidis* (MRSE) celmu (Tračevska, tēzes LU, 2012).

KONS analīze pierāda, ka biežāk meticilīnrezistence ir sastopama *S. epidermidis*, kā arī *S.haemolyticus* celmos. *S.haemolyticus* ir salīdzinoši bieži sastopams bakterēmiju ierosinātājs, šīs sugas baktērijas visvieglāk no visiem KONS iegūst rezistenci pret vankomicīnu (Barros et al., 2012). Pret meticilīnu rezistentajiem KONS ir tādas pašas heterotipiskas izpausmes, kā pret meticilīnu rezistentajiem *S.aureus* (Balode, 2011).

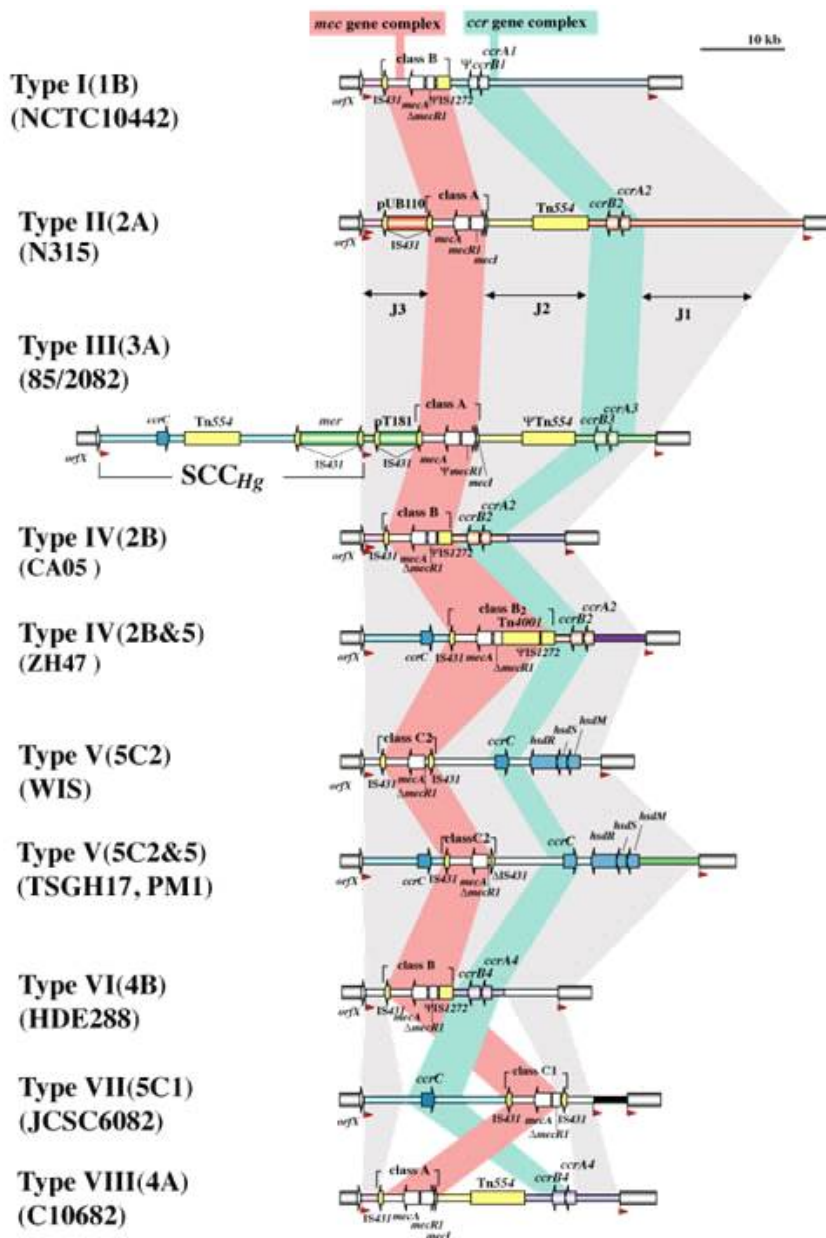
Klīniski visbūtiskākā meticilīna rezistences forma ir saistīta ar penicilīnu saistošā proteīna PBP2a producēšanu. Šo proteīnu sintēzi kodē *mecA* gēns. PBP2a ir raksturīga zema afinitāte pret β-laktāmu antibakteriālajiem līdzekļiem (Hartman and Tomasz 1984).

Tātad, meticilīnrezistentu stafilokoku galvenā atšķirība ir to rezistence pret visiem klasiskajiem beta laktāmu antibakteriālajiem līdzekļiem. Īpaši bieži pret meticilīnu rezistenti ir izolāti ar ST2 sekvenču tipu, kurš noteikts, izmantojot multilokusu sekvenču tipēšanas metodi (MLST). *S.epidermidis* celmi ar ST2 viegli genomā var integrēt kaseti *SCCmec* (Katayama et al., 2000, Ibrahim et al., 2008).

1.4.1. *SCC mec* kasetes molekulārā uzbūve

SCC mec kasete ir mobils ģenētiskais elements, tās lielums variē 21-67kb, kas satur *mecA* gēnu un regulatoros gēnus. *SCCmec* kasete var saturēt arī tādas ģenētiskās struktūras kā Tn554, pUB110, pT181, kas kodē rezistenci pret citiem antibakteriālajiem līdzekļiem, tādējādi izraisot baktēriju multirezistenci(Monsen et al., 2005).

Tiek izdalīti strukturāli atšķirīgi astoņi *SCCmec* tipi (*SCCmec* I-VIII) un apakštipi *SCCmec* tipiem ir kopīgas iezīmes, iekļaujot *mecA* gēnu un tā regulatorā reģiona daļas, *ccrA* un *ccrB* gēnus. Gēni *mecR1* un *mecI* kodē *mecA* regulatoros proteīnus, MecR1 ir signālproteīns ar penicilīnsaistošu domēnu un transmembrānu domēnu, MecI ir gēna *mecA* represorais proteīns. Gēni *ccrA* un *ccrB* kodē rekombināzes CcrA un CcrB. Šie fermenti ir atbildīgi par saita un orientācijas specifisku *SCCmec* integrāciju un izgriešanu (Okuma et al, 2002, Teruyo et al., 2009).



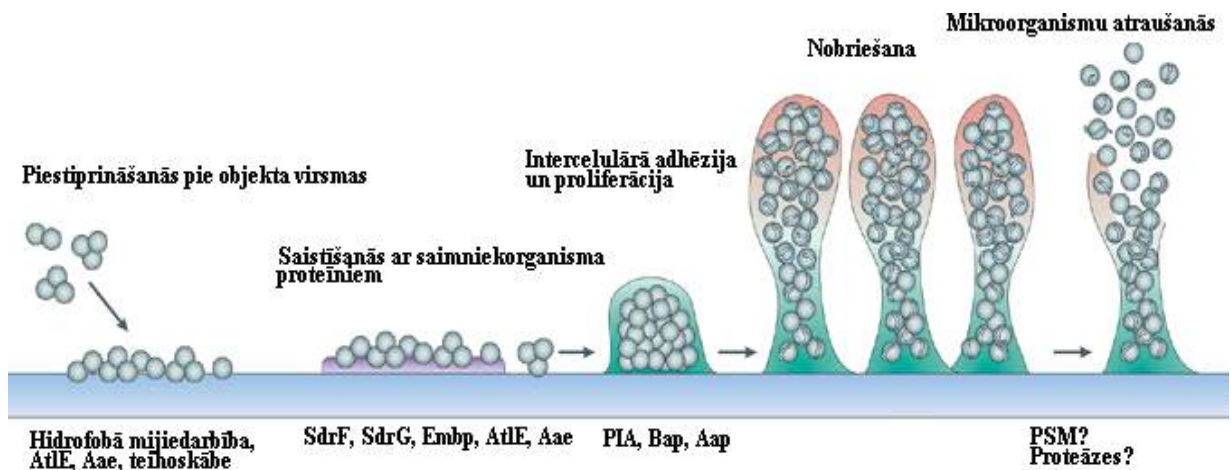
1.attēls. *SCC mec* kasešu tipi (ar izmaiņām no Teruyo et al., 2009)

Trīs salīdzinoši lieli *SCCmec* elementi (tipi I, II, III) ir raksturīgi izolātiem, kas iegūti no hospitalizētiem pacientiem. Pirmā tipa *SCCmec* kasetē *mecA* gēns ir vienīgais, kas nosaka rezistenci pret antibakteriālajiem līdzekļiem Mazākais, *SCCmec* IV kasetes tips, pirmo reizi tika identificēts sabiedrībā iegūtajos MRSA izolātos (CA-MRSA) Čikāgā un vēlāk konstatēts arī citos MRSA izolātos, citos ģeogrāfiskos reģionos. Arī *S. epidermidis* ir raksturīgs *SCCmec* IV tipa kasete un relatīvi mazo izmēru dēļ, baktērijas to var viegli nodot viena otrai (Barbier et al., 2010).

1.5. Biofilmas veidošanās mehānisms

Baktērijas, piesaistoties pie kādas virsmas un arī savstarpēji saistoties, veido biofilmas. Mikroorganismi, kas ir apvienojušies biofilmā, uzvedas kā daudzšūnu organisms. Šajā sakopojumā tiek novērota arī mikroorganismu savstarpēja komunikācija. Biofilmā ietvertajām baktērijām samazinās augšanas ātrums un arī gēnu transkripcija (Costerton et al., 1999,).

Biofilmas veidošanās procesu var iedalīt četros etapos: primārā adhēzija, agregācija un akumulācija, nobriešana un atdalīšanās (2.attēls). Visos šajos etapos ir iesaistīti proteīni, kā arī neproteīnu dabas polimēri u.c. (Heilmann et al., 1997, Otto 2009).



Nature Reviews | Microbiology

2.attēls. Biofilmas veidošanās process (ar izmaiņām no Otto, 2009)

Parasti *S.epidermidis* biofilma nesatur citu baktēriju sugu kolonijas, tas ir tāpēc, ka *S.epidermidis* spēj producēt bakteriocīnus, kas inhibē citu baktēriju sugu augšanu.

Biofilmas veidošanos raksturo kā daudzpakāpju procesu, kas sākas ar mikroorganismu migrāciju un piestiprināšanos pie virsmas, kuru sekmē nespecifiski spēki – elektrostatiskā mijiedarbība, van der Waals spēki, polimēru fizikāli ķīmiskās

īpašības (virsmas hidrofobisms), kā arī mikroorganismu virsmas hidrofobisms, nespecifiski adhezīni, pili, fimbrijas un glikokaliks (Donlan 2001, Fey et al., 2010).

Biofilmas veidošanās procesā planktoniskās baktērijas vispirms saistās pie svešķermeņa virsmas. Adhēzija var notikt pie biotiskas (cilvēka audi) un arī abiotiskas virsmas (asinsvadu katetri, protēzes, mākslīgās sirds vārstules u.c.). Adhēzija tiek nodrošināta ar elektrostatisko un hidrofobo mijiedarbību, un arī ar baktēriju virsmas adhezīniem, kā piemēram: teihojskābēm, Bhp, AtlE un Aae adhezīniem (Heilmann et al., 2003, Lasa and Penades 2006).

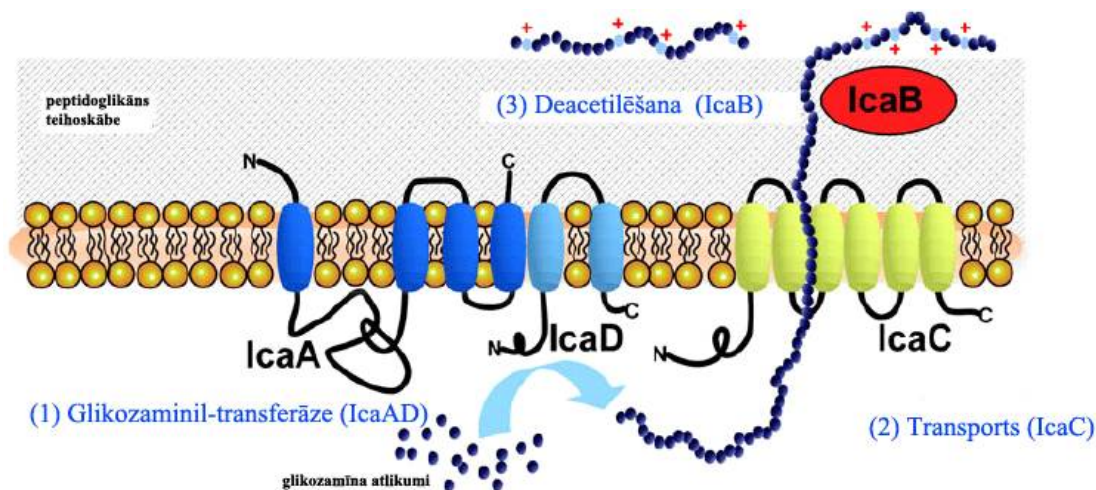
Adhēziju pie polimēru virsmas iedala divos etapos: primārā adhēzija , tā ir saistīšanās tieši pie polimēru virsmas un sekundārā adhēzija – saistīšanās pie cilvēka proteīniem, kas noklājuši polimēru virsmas. Tiek uzskatīts, ka sekundārā adhēzija notiek ātrāk nekā primārā adhēzija, jo pēc polimēra materiālu ievadīšanas cilvēka organismā, to uzreiz pārklāj proteīni (Davis et al., 2001, Sadovskaya et al., 2005).

Stafilokokiem ir arī dažādi sekretētie un uz virsmas fiksētie proteīni, ar kuru palīdzību mikroorganismi saistās ar saimniekorganisma ekstracelulārā matricā un plazmas komponentiem. MSCRAMM (mikrobu virsmas komponentu atpazīstošās adhēzijas matricā molekulas) adhezīni parasti ir kovalenti saistīti ar šūnu sienas peptidoglikāna slāni. Kad polimēru ierīci pārklāj saimniekorganisma proteīni, piemēram: kolagēns, fibrinogēns, fibronektīns, uz tiem sāk iedarboties *S. epidermidis* virsmas receptori. Svarīga funkcija šajā etapā ir arī SdrG, kas saistās pie fibrinogēna. SdrG ir sastopams praktiski visos *S. epidermidis* celmos. Antiviēlas pret SdrG var bloķēt adhēziju pie biomateriālu virsmām pārklātām ar fibrinogēnu, kas norāda uz šī faktora svarīgu funkciju adhēzijas procesā (McCrea et al., 2000, Hussain et al., 2001, Bowden et al. 2002, Williams et al. 2002, Nayak et al., 2011).

Polisaharīdu intercelulārais adhezīns (PIA) ir viens no svarīgākajiem biofilmu stabilizējošiem adhezīniem. Zinātniskās literatūras avotos aprakstīts arī ar nosaukumu PNAG (poli-N-acetilglikozamīns). PIA ir lineārs N-acetilglikozamīna homopolimērs, kas saistīts ar β -1,6-glikozīdisko saiti. PIA produkciju kodē *icaADBC* operons. *IcaADBC* operons galvenokārt ir sastopams klīniskajos *S. epidermidis* celmos, un tas tiek saistīts ar nozokomiālo infekciju izraisošajiem celmiem (Mack et al., 1996, Rogers et al., 2008).

Regulatorais *icaR* gēns, kas iesaistīts *ica* ekspresijas regulēšanā, atrodas blakus *icaADBC* operonam. *IcaA* gēns kodē glikozaminil-transferāzes produkciju. Šis enzīms

pārnes glikozamīna atlikumus no UDP-glikozamīna uz augošo pre-PIA ķēdi. Ja ir ekspresēts vienīgi *icaA* gēns, enzīma aktivitāte var būt ļoti zema. Enzīma pilnīgai aktivitātei ir nepieciešama *icaA* un *icaD* gēnu koekspresija. IcaA un IcaD proteīni ir lokalizēti šūnas membrānā. Trešais membrānu proteīns IcaC transportē augošo pre-PIA ārpus šūnas. Pre-PIA N-deacetilēšanu veic IcaB enzīms jeb N-deacetilāze (Stevens et al., 2004, Sadykov et al., 2008). Korelācija starp PIA produkciju un biofilmu veidošanos klīniskajos *S. epidermidis* izolātos tika noskaidrota jau 1996. gadā uzreiz pēc PIA polimēra atklāšanas. Nesen ir atklāti *S. epidermidis* celmi, kuri *in vivo* un *in vitro* var veidot biofilmas bez PIA starpniecības. Šajos baktēriju celmos PIA funkciju veic proteīni. Viens no šie proteīniem, kas var veikt PIA stabilizējošo funkciju ir Bap (Bhp) jeb ar biofilmu saistītais proteīns, kas ir iesaistīts adhēzijas un akumulācijas procesos. Tormo et al. 2005. gadā aprakstīja *bap* pozitīvus stafilokoku celmus bez *icaABCD* operona, kuri *in vitro* veidoja biofilmas. Taču ir pierādīts, ka biofilmas, kuras stabilizē PIA, ir daudz noturīgākas nekā proteīnu stabilizētas biofilmas (Heilmann et al., 1996, Knobloch et al., 2004, Otto et al., 2009). Zinātniskajā literatūrā minēts, ka mikroorganismi, kas producē nedeacetilētu PIA, nespēj saistīties ar citiem mikroorganismiem un arī neveido stabilu daudzslāņu sakopojumu. PIA ir arī citas funkcijas, piemēram, tas palīdz baktērijai izvairīties no saimniekorganisma imūnmehānismiem. PIA spēj inhibēt dabīgo pretmikrobu peptīdu un arī neitrofilu aktivitāti (Ziebuhr et al., 2006, Cheung et al., 2010).



3.attēls. PIA sintēzes modelis (ar izmaiņām no Otto, 2009)

1997. gadā Hussain et al. aprakstīja 140 kDa ekstracelulāru ar akumulāciju saistītu proteīnu Aap, kas piedalās biofilmas akumulācijas procesā. Proteīns atrodas šūnas sienā, un tā aktivācijai ir nepieciešama proteolītiskā šķelšana. Aap uz *S. epidermidis* šūnas virsmas veido proteīnu fibrillas, kas pastiprina intercelulāro adhēziju (Hussain et al., 1997). Zinātniskajos pētījumos ir noskaidrots, ka Aap ar savu A domēnu var piesaistīties karneocītiem, tādējādi tiek uzlabota baktēriju saistīšanās spējas pie cilvēka ādas. Kad biofilma ir nobriedusi, atsevišķas baktērijas vai baktēriju sakopojumi sāk atdalīties no biofilmas. Pats process atgādina metastazēšanu, jo baktērijas var pārvietoties no izveidotās biofilmas uz cilvēka ķermeņa daļām un orgāniem. Atšķirībā no agregācijas un akumulācijas procesiem, biofilmas atdalīšanās ir mazāk izpētīts process (Rohde et al., 2006).

Biofilmas atdalīšanās process ir saistīts ar *quorum-sensing* Agr sistēmas aktivitāti, kas, savukārt kontrolē fenolā šķīstošo modulīnu (PSM) un proteāžu ekspresiju. Proteāzes, piemēram, metāloproteāze (SepA) un cisteīna proteāze, piedalās proteīnu stabilizēto biofilmas atdalīšanās procesā. SepA tāpat kā PIA spēj inhibēt dabīgo pretmikrobu peptīdu aktivitāti. Līdz šim netika atklāti enzīmi, kas varētu hidrolizēt PIA stabilizētas biofilmas. Tomēr ir zināmas molekulas, kas spēj sagraut nekovalentās saites starp PIA un polimēra virsmu, to veic PSM, kā piemēram: delta toksīns (Donlan et al., 2014).

1.6. Biofilmas veidošanās procesu regulācija

1.6.1. *Quorum sensing process*

Baktērijām piemīt globālas regulējošas sistēmas, kas pielāgo virulences gēnu ekspresiju mainīgajiem vides apstākļiem

QS jeb kvoruma sajūta ir process, kurā baktērijas savstarpēji komunicē, tādejādi nodrošinot no baktēriju blīvuma atkarīgu gēnu regulāciju. Savstarpējā komunikācija notiek gan vienas sugas, gan arī dažādu sugu ietvaros, izmantojot speciālās signālmolekulas – autoinduktorus (AI). Zināmi vairāku veidu AI, visvairāk pētīti ir AI-1 un AI-2. AI-1 (acilēti homoserīna laktoni) ir vairāk raksturīgi gramnegatīvām baktērijām, bet AI-2 (polipeptīdi) raksturīgi kā gramnegatīvām baktērijām, tā arī grampozitīvām baktērijām, līdz ar to AI-2 uzskata par universālu signālmolekulu. Līdz šim *S. epidermidis* ir aprakstītas divas QS, tās ir: *agr* sistēma un *luxS/AI-2* sistēma (Kong *et al.* 2006, Hon *et al.* 2006, Min L. *et al.*, 2008).

Agr sistēma ir viena no visvairāk pētītajām QS sistēmām. *Agr* regulē vairāk kā 150 dažādu gēnu darbību, kuri nodrošina gan primārās, gan sekundārās adhēzijas receptoru producēšanu. *Agr* lokuss sastāv no diviem atšķirīgiem promoteriem P2 and P3 P2 promoters kontrolē *agrB*, *agrD*, *agrC* un *agrA* ekspresiju (Xu *et al.* 2006).

SarA gēna proteīns pieder pie DNS saistošiem proteīniem un ir sastopams ne tikai koagulāzes negatīvos stafilokokos, bet arī koagulāzes pozitīvajos *S.aureus*, kur tas atbild par virulences faktoru sintēzes regulāciju. *SarA* gēna proteīns KONS baktērijās ir homologs (84 %) ar *S.aureus sarA* gēna proteīnu, līdz ar to var pieņemt, ka to funkcijas varētu būt diezgan līdzīgas. Pirmkārt, tas pozitīvi inducē *ica* operona transkripciju, saistoties pie *icaA* gēna promotera. Otrkārt, *sarA* gēnam piemīt arī represoras īpašības, jo samazina *agr* sistēmas darbību, kas atbild par tādu virulences faktoru kā PSM, dažādu proteāžu un lipāžu producēšanu. *SarA* gēna kontrolētie PSM virulences faktori (PSM α , PSM β , PSM γ , PSM δ) ir multifunkcionāli polipeptīdi, un tiem piemīt iekaisumu veicinošas īpašības. Tie spēj destabilizēt biofilmu tās veidošanās procesā, traucējot baktēriju saistīšanos savā starpā (Yarwood and Schlievert 2003, Tormo *et al.*, 2005).

Pētījumos ir noskaidrots, ka izveidotajā biofilmā samazinās gēnu ekspresija, tai skaitā *agr* sistēmas darbība, kas producē PSM. Iespējams, ka tādā veidā baktērijas, pirmkārt, maina savu fizioloģisko stāvokli no agresīvas uz neagresīvu uzvedību, otr-

kārt, samazina imūnsistēmas aktivitāti jeb paaugstina evāzijas īpašības. PSM piemīt arī antibakteriālas īpašības, tas ietekmē citus mikroorganismus, kā arī papildus stimulē organisma imūnsistēmas makrofāgus (Vuong et al., 2001, Mack et al., 2007).

Pēdējā laikā daudz tiek pieminēts cits *Sar* sistēmas gēns: *sarZ*, kas regulē aptuveni 80 gēnu darbību, taču visvairāk tas ietekmē tieši tos gēnus, kas nosaka baktēriju virulences faktoru darbību. Eksperimentālos modeļos tika noskaidrots, ka *S.epidermidis* celmos ar defektīvu *sarZ* gēnu strauji samazinājās virulences gēnu ekspresija, tai skaitā arī PIA produkcija. Tas autoriem lika secināt, ka *sarZ* gēns varētu būt viens no svarīgākajiem faktoriem, kas atbild par koagulāzes negatīvo stafilokoku virulenci (Wang et al., 2008).

2006. gadā tika uzsākta *luxS/AI-2 quorum-sensing* sistēmas izpēte *S.epidermidis* baktērijās, kuru veica Xu Lin kopā ar saviem kolēģiem (Xu L. et al.,

2006). *LuxS/AI-2-quorum-sensing* sistēmai ir svarīga loma *S.epidermidis* biofilmas veidošanās procesā. Tomēr joprojām nav vienota viedokļa par *luxS/AI-2 quorum-sensing* sistēmas biofilmas veidošanās regulācijas molekulārajiem mehānismiem. Iespējams, ka šī sistēma negatīvi regulē *icaADBC* operona darbību transkripcionālā līmenī (Keersmaecker et al., 2006, Everett et al., 2010).

1.6.2. *Vides faktoru ietekme*

Ir pierādīts, ka *S.epidermidis* biofilmas veidošanos *in vitro* var ietekmēt vides faktori, piemēram, skābeklis (O₂), glikoze, NaCl, etanols, antibiotiku stress, Mg²⁺, temperatūras un EDTA, kas var darboties, izmantojot regulējošo proteīnu, piemēram: *Agr*, *sigB* un starpšūnu adhēzijas regulatoru *IcaR* (Lim et al., 2004, Fitzpatrick et al., 2005, Sadykov and Olson, 2008).

SigB ir DNS saistošais proteīns, kas negatīvi regulē *icaR* gēna darbību, saistoties ar tā promotera rajonu. Stress, kā arī noteiktu vielu klātbūtne (glikoze, etanols, NaCl) vidē var ietekmēt Rsb – UVW faktoru kaskādi, kas aktivē sigB darbību, pie tam sigB faktors tieši nereaģē uz stresa apstākļiem. Rsb-U faktors ir specifiska Rsb-V fosfatāze, kas aktivē Rsb-V faktoru. Normālos vides apstākļos sigB faktors ir saistīts ar anti-sigma faktoru Rsb-W. Taču aktivētais Rsb-V faktors konkurējoši saistās ar Rsb-W faktora aktīvo centru, tādā veidā bloķējot spēju saistīt sigB faktoru, kas augstā koncentrācijā inhibē *icaR* gēnu, bet aktivē *icaADBC* transkripciju (Fitzpatrick F et al.,

2002, Knobloch et al., 2004). Pētījumos aprakstīts arī, ka sigB darbība ir mazāk svarīga augstas skābekļa koncentrācijas apstākļos, nekā, ja skābekļa koncentrācija ir zema (Cotter et al. 2009).

1.7. KONS fenotipiskā un ģenētiskā mainība

Stafilokoki ir pazīstami ar savu spilgti izteikto fenotipisko un ģenētisko mainību. Heterogenitātes izpausme ir novērota klīniskajos *S.aureus* un *S.epidermidis* celmos un tiek pieņemts, ka šāda spēja kalpo kā priekšrocība stafilokoku adaptācijai mainīgajos vides apstākļos. Mehānismi, kas ir iesaistīti šajā fenomenā, ir maz zināmi. Tie ietver gan regulējošos mehānismus, kā atbildi uz vides signāliem, gan ģenētiskās variācijas. Svarīga nozīme ir insercijas sekvenču (IS) elementu klātbūtne.

IS ir mazi, mobili, autonomi DNS elementi, kas atrodami gandrīz visu dzīvo organismu genomos. Baktērijās tie izpilda svarīgas funkcijas genoma organizēšanā. IS var inaktivēt gēnus ar insercijas mutācijas palīdzību, taču tie var tikt iesaistīti arī tādos rekombinācijas notikumos, kā hromosomu delēcija vai pārkārtošanās. Ir pierādīts, ka *S. epidermidis* klīniskie un komensālie celmi atšķiras ne tikai ar biofilmu veidošanos, bet arī ar noteiktu IS elementu klātbūtni to genomos. Pētījumos aprakstīts, ka ST2 un *ica* pozitīvie kloni, kas izraisa nozokomiālās infekcijas, pārnes daudzas insercijas secības elementa IS256 kopijas, kamēr citas tipiskās stafilokoku insercijas secības, piemēram, IS257 un IS1272, līdzīgi sadalās starp komensālajiem un klīniskajiem izolātiem (Ziebuhr et al., 1999, Arciola et al., 2004).

IS256 ir daļa no transpozona *Tn4001*, kas piešķir stafilokokiem un enterokokiem rezistenci pret aminoglikozīdiem. IS256 piemīt spēja regulēt blakus esošā gēna izpausmi ar iekšējo promoteru struktūru palīdzību. Pētījumos ir aprakstīta IS256 ietekme uz teikoplanīna rezistenci *S.aureus* baktērijās, veicot *icaR* regulējošā gēna inaktivēšanu (O’Gara 2007).

Pētījumi par IS256 patogēno stafilokoku celmu genomā norāda, ka, no vienas puses, daudzkārtīgās IS kopijas genomā paātrina homologos rekombinācijas notikumus, tādējādi veicot ieguldījumu ģenētiskā materiāla plastiskumā un pārkārtošanās procesā. No otras puses, aktīva IS transponēšana dod ieguldījumu heterogēnā izpausmē ar gēnu mutāciju vai aktivēšanas palīdzību. Šo procesu rezultātā

rodas nebijuši genotipiski un fenotipiski varianti, kas baktērijām ļauj pielāgoties mainīgajiem ārējiem apstākļiem un arī iekarot jaunas ekoloģiskās nišas (Conlon K.M. et al., 2004). Daudzkārtīgu IS256 kopiju klātbūtne *S.epidermidis* ST2 genomā un attiecīgajos sekvenču tipos veicina adaptēšanās procesu. Tāpēc ar biofilmu veidošanos, rezistenci pret antibakteriālajiem līdzekļiem un augstu ģenētisko mainību var izskaidrot, kāpēc *S.epidermidis* ir dominējoši nozokomiālo infekciju izraisītāji (Maureen, 2008).

Pētot *S.epidermidis* ģenētisko daudzveidību un izmantojot izolātu daudzlokusu sekvenču tipēšanu (MLST), ir noteikti 74 mikroorganisma sekvenču tipi (ST). Lielākā daļa šo izolātu ietilpst klonālajā kompleksā (CC2), pie kura pieder visbiežāk sastopamais sekvenču tips ST2. Plašu ST2 izplatību varētu skaidrot ar to, ka visiem ST2 izolātiem konstatē *ica* gēnus un IS256 inserciju. Ir noskaidrots, ka *ica* gēni un IS256 ir faktori, kuri raksturīgi tieši invazīvajiem *S. epidermidis* celmiem. ST2 izolātiem piemīt spēja *in vitro* veidot biofilmas (Ziebuhr 1999, Mack 2006).

1.8. KONS patogenitāte

Vēl pagājušā gadsimta 50. gados KONS uzlūkoja par nepatogēniem ādas komensāliem, bet, ja tie izdalīti no klīniskā materiāla, par nekaitīgiem kontaminantiem. Uzskati mainījās pagājušā gadsimta 80. gadu beigās, 90. gadu sākumā, kad ļoti spilgti tika pierādīta KONS loma nozokomiālo infekciju izcelsmē. Bija apkopoti dati par to, ka KONS spēj ierosināt dažādus piogēnos procesus, no kuriem biežāk sastopamie ir bakterēmija, endokardīts (tas var skart gan mākslīgās, gan dabīgās vārstules), septisks artrīts, peritonīts, mediastinīts, šuntu un katetru, operāciju brūču infekcijas, osteomielīts, prostatīts, urīnceļu infekcijas u. c. (Chu et al., 2008, McCarty 2014 Gemmell and Lang 2015).

Pētījumos aprakstīti vairāki iemesli, kas veicinājuši KONS izveidošanos par oportūniskiem patogēniem. Medicīnas progress rada arvien pieaugošu pacientu skaitu ar novājinātu imunitāti, kuri savukārt ir ļoti uzņēmīgi pret oportūnisko patogēnu izraisītajām infekcijām. Arī medicīnā izmantojamās ierīces, kas tiek plaši izmantotas, rada baktērijām piemērotu vidi virsmu kolonizācijai un biofilmu veidošanai. Svarīgs iemesls ir antibakteriālo līdzekļu un dezinfektantu plašais pielietojums klīnikās, kas veicina augstu selektīvo spiedienu baktērijām, līdz ar to var selekcionēties aizvien

jauni, bieži vien rezistenti pret antibakteriālajām vielām, mikroorganismu celmi ((Ziebuhr W. et al., 2006, John J.F., Harvin A.M., 2007, Lavery G. et al., 2015).

S.epidermidis ir salīdzinoši mazāk agresīvi nekā *S.aureus*, jo neproducē daudz toksīnu vai degradējošu eksoenzīmu. Gan *S.epidermidis*, gan *S. aureus* producē fenolā šķīstošus modulīnus (PSM). Tie sekmē izvairīšanos no imūnsistēmas darbības, lizējot neitrofilos leikocītus. (Cheung *et al.*, 2010, Otto M., 2009) Cilvēka imūnsistēmai var būt grūtības atbrīvoties no ilgstošām *S.epidermidis* infekcijām, neskatoties uz to, ka tiek producētas antivielas pret *S.epidermidis* baktēriju proteīniem (Rohde et al., 2005, Presterl et al., 2007).

1.8.1. Nozokomiālās infekcijas

Nozokomiālās infekcijas tiek uzskatītas par vienu no lielākajām problēmām veselības aprūpē. Nozokomiālajām infekcijām teorētiski var būt pakļauti visi stacionētie pacienti, taču infekciju attīstību sekmē predisponējošie jeb riska faktori. Anamnētiskie riska faktori no pacienta puses var būt sekojoši: veci un ļoti jauni organismi, slikts vispārīgais veselības stāvoklis, liekais svars, smēķēšana, kardiovaskulāras un onkoloģiskas saslimšanas, diabēts, smagas operācijas u.c.

Lai infekcija attīstītos, nozīme ir arī bioloģiskajai videi klīnikā, kā arī sanitāri higiēniskā režīma ievērošanai (Žileviča, 2004, Suleman, 2014).

Infekciozi aģenti, kas izraisa nozokomiālās infekcijas var rasties vai nu no endogēniem avotiem vai eksogēniem avotiem. Endogēnie avoti ir ķermeņa vietas, kas normāli ir apdzīvotas ar mikroorganismiem, piemēram, nazofarings, gastrointestinālais trakts vai uroģenitālais trakts. Eksogēnie avoti ir apmeklētāji, medicīnas personāls, aparatūra un veselības aprūpes vide. Endogēnās infekcijas gadījumā procesu izraisa paša cilvēka normālās mikrofloras pārstāvji. Visbiežāk cēloņi ir sekojoši.

1. Mikroorganisms maina savu lokalizāciju. Tikai dabīgās eksistences vidē savā biotopā mikroorganismi ir pilnīgi nekaitīgi. Nokļūstot citur, tie var radīt iekaisuma procesus.
2. Ja organismā iekļūst svešķermenis, piemēram: protēze, tiek izmainīta normālā audu vide. Tādi mikroorganismi, kā, piemēram: *S. epidermidis*, kam ir liela afinitāte pret polimēriem, migrē svešķermeņa virzienā un var radīt iekaisumu.

3. Jebkurš mikrofloras mikroorganisms ir potenciāli patogēns. Tikai veselā organismā mikroflora ir viennozīmīgi pozitīva. Samazinoties organisma spējai kontrolēt homeostāzi, jebkurš no mikrofloras pārstāvjiem var ierosināt patoloģisku procesu.
4. Ilgstošas un intensīvas antibakteriālās terapijas gadījumā var izveidoties disbioze.

Ar nozokomiālajām infekcijām saslimst apmēram 5-15% hospitalizēto pacientu. Ir publicēti aprēķini, ka Eiropas Savienībā ik gadus ar šīm infekcijām saslimst aptuveni 4,1 miljoni cilvēku, starp intensīvās terapijas nodaļu pacientiem nozokomiālo infekciju biežums var sasniegt pat 37%. Biežākās nozokomiālās infekcijas ir urīnceļu infekcijas, elpceļu infekcijas, brūču infekcijas un ar asinsvadu katetru lietošanu saistītās bakterēmijas. Nozokomiālās infekcijas ir izplatītas visā pasaulē. Infekcijas, kas saistītas ar veselības aprūpi, ir viens no galvenajiem nāves cēloņiem un pieaugošais saslimstībai starp hospitalizētiem pacientiem. Tas ir apgrūtinājums gan pacientam, gan sabiedrības veselībai. Infekciju izplatības pētījums, kas bija veikts PVO aizbildnībā 55 slimnīcās 14 valstīs, kas pārstāv četrus PVO reģionus (Eiropa, Austrumu Vidusjūras reģions, Dienvidaustrumu Āzija un Rietumu Klusais Okeāns) tika konstatēts, ka apmēram 8,7 % no hospitalizētiem pacientiem bija nozokomiālā infekcija. Vislielākais nozokomiālo infekciju biežums konstatēts Austrumu Vidusjūras reģiona un Dienvidaustrumu Āzijas reģiona slimnīcās (11,8% un 10,0%), salīdzinot ar Eiropas un Rietumu Klusa Okeāna reģioniem, kur prevalence bija 7,7 un 9,0 % (WHO 2009, ES 2012).

ECDC ziņojumos biežāk sastopamās nozokomiālās infekcijas ir urīnceļu infekcijas (27%), elpceļu infekcijas, ieskaitot pneimoniju (24%), ķirurģisko brūču infekcijas (17%) un ar asinsriti pārnestas infekcijas (10,5%). Citas nozokomiālās infekcijas ir apmēram 19,3% un šeit ietvertas gastrointestinālās infekcijas, pārsvarā *Clostridium difficile* izraisītas, kā arī ādas un mīksto audu infekcijas, centrālās nervu sistēmas infekcijas (ECDC 2011).

Nozokomiālās infekcijas ir polietioloģiskas, to ierosinātāji pieder pie dažādām taksonomiskām grupām, piemēram: baktērijas, vīrusi, sēnes un vienšūņi. *Escherichia coli* un *Staphylococcus aureus* ir visbiežākie infekciju izraisītāji, seko *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus spp.* un koagulāzes negatīvie stafilokoki, *Candida spp.*, un

citi *Enterobacteriaceae* dzimtas pārstāvji, tādi kā, *Klebsiella spp.* un *Enterobacter spp.* (Rogers et al. 2009, ECDC 2011).

Stafilokoki ir ierindoti starp vadošajiem nozokomiālo infekciju izraisītājiem, un *S. aureus* iesaistīti gandrīz visās nozokomiālās infekcijās, gan ar katetru lietošanu saistītās urīnceļu infekcijās, gan nozokomiālu pneimoniju vidū. Visbiežāk stafilokoki ir saistīti ar ķirurģisko brūču infekcijām. Koagulāzes negatīvie stafilokoki, kaut arī netiek uzskatīti par patogēniem mikroorganismiem, tomēr ieņem svarīgu vietu nozokomiālo infekciju, īpaši bakterēmiju izraisītāju vidū. Vairāk kā 50% gadījumos KONS ir identificēti kā nozokomiālo infekciju ierosinātāji jaundzimušo intensīvās terapijas nodaļās. Bērniem ar katetru lietošanu saistīto infekciju gadījumos *S.epidermidis* ir bijis izolēts 34% gadījumos, bet jaundzimušajiem pat 51% gadījumos (Garcia et al. 2004, Hira et al. 2007, Suleman et al. 2014, Peerayeh et al. 2014).

Ar katru gadu Latvijas slimnīcās pieaug nozokomiālo infekciju skaits. Vidējā sastopamība nozokomiālajām infekcijām Latvijas slimnīcās ir 3,6%. Dažās Latvijas slimnīcās šo infekciju sastopamība pārsniedz 6%. Augstākā vidējā sastopamība tiek novērota lielākajās daudznozaru klīnikās 4,5% un pediatrikajās slimnīcās 4,0% (3,4-4,5%). Visbiežāk novērotās nozokomiālās infekcijas ir dziļo elpceļu infekcijas 23,1% (20,3-30,0%) un ķirurģiskās infekcijas 26,5% (19,1-32,0%), nozokomiālās urīnceļu infekcijas sastopamas (9%), zarnu trakta infekcijas (4%) un asinsrites sistēmas infekcijas (7%) gadījumu (Dimiņa et al., 2009). Latvijā tika veikts nozokomiālo infekciju izplatības pētījums P.Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcā un Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcā, tomēr iegūtos datus grūti vispārināt valsts mērogā, galvenokārt tādēļ, ka vairākus gadus nozokomiālo infekciju problēmas šajās klīnikās risina augsta līmeņa profesionāli infektologi un epidemiologi (Dumpis et al., 2003).

Nozokomiālās infekcijas palielina ne tikai pacientu hospitalizācijas laiku, bet arī palielina ekonomiskās izmaksas slimnīcai un veselības aprūpes sistēmai kopumā. Bieži nozokomiālās infekcijas norit smagi un ar augstu mirstību, kas ik gadus prasa tūkstošiem cilvēku dzīvību.

1.8.2. Ar katetru lietošanu saistītās infekcijas

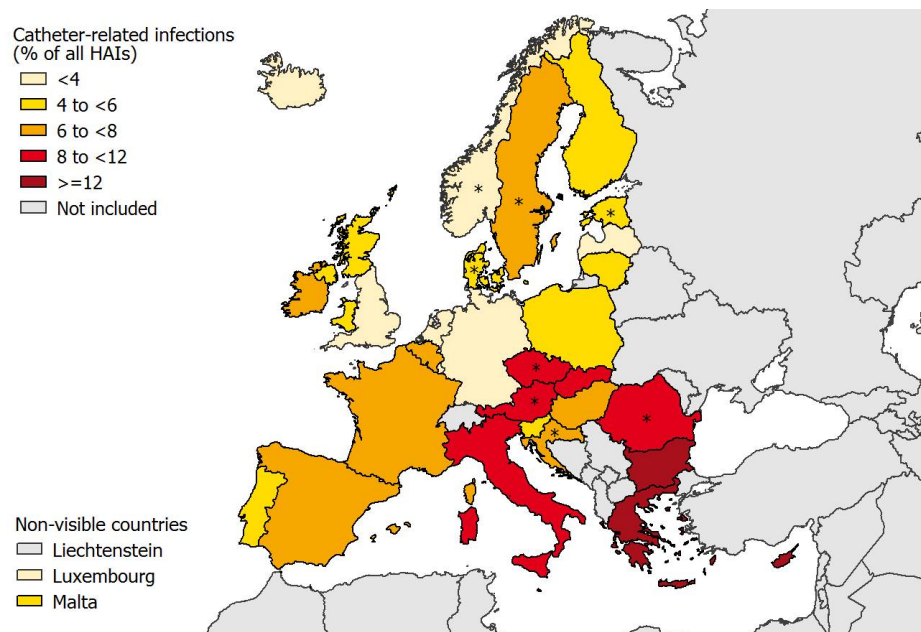
Aizvien plašāka invazīvo procedūru un intravaskulāro katetru lietošana ir viens no bakterēmiju gadījuma skaita pieauguma cēloņiem. Viens no stafilokoku izraisītas bakterēmijas primārajiem avotiem ir intravaskulārie katetri. Ir definēts, ka bakterēmijas gadījumā ir viens pozitīvs asins uzsējums ar zināmu patogēnu un pacientam ir vismaz viena no sekojošajām klīniskajām izpausmēm: drudzis (temperatūra virs 38°C), drebuļi vai hipotensija. Tāpat par bakterēmiju runā, ja pacientam ir konstatēti vismaz divi pozitīvi asins uzsējumi un ir izdalītas ādas normālās mikrofloras baktērijas, kā piemēram, *S.epidermidis*, kas identificēts no diviem atsevišķiem asins uzsējumu paraugiem (ECDC, 2011, Martinez et al., 2007).

Par nozokomiālu bakterēmiju uzskata tādu infekciju, kad pozitīvais asins uzsējums tika paņemts vairāk kā 48 stundas pēc hospitalizācijas sākuma. Nozokomiālu bakterēmiju definē arī gadījumā, ja pacients pēdējā mēneša laikā ir saņēmis veselības aprūpes pakalpojumus mājās. Lai diagnosticētu ar katetru lietošanu saistīto bakterēmiju (KLSB), ir nepieciešama gan asins paraugu paņemšana (hemokultūra), gan katetra izņemšana un nosūtīšana uz laboratoriju mikrobioloģiskajai izmeklēšanai. Ar katetru lietošanu saistīta infekcijas diagnoze tiek uzstādīta, ja viens un tas pats mikroorganisms tiek izdalīts gan no asins uzsējuma, gan no katetra gala uzsējuma ((Friedman et al., 2002, Petti et al., 2003, Garcia et al., 2004, Bouza E. 2005).

Koagulāzes negatīvos stafilokokus bieži izolē kā viltus pozitīvu kultūru jeb kontaminantu pie asinsrites sistēmas infekcijām, to klīnisko nozīmi tādos gadījumos ir grūti interpretēt (Costa et al., 2004). Ja pacientam, kuram ir ievietots centrālais venozais katetrs un parādās drudzis, kā arī laboratoriski konstatēts pozitīvs asins uzsējums, ārstam vienmēr jāizvērtē, vai pozitīvais asins uzsējums liecina par bakterēmiju un nav saistīts ar pacienta ādas mikrofloras kontamināciju vai katetra iekšējo lūmenu kolonizāciju. (Raad et al., 2000, Zing et al., 2008).

ASV gadā tiek izlietoti apmēram 180mlj. perifēro vēnu katetru un 7mlj. centrālo vēnu katetru. Ziņojumos tiek aprakstīti no 2-25% ar katetru lietošanu saistīto infekciju gadījumi dažādās klīnikās. (Eggimann et al.2004). *S. epidermidis* ir bijis infekcijas izraisītājs 50-70% gadījumu. Katru gadu ASV tiek reģistrēti vairāk kā 250000 katetru infekciju gadījumi, kam seko bakterēmija.

Katetru un šuntu infekcijas gadījumos 20 - 65% kā izraisītāji ir identificēti koagulāzes negatīvie stafilokoki (CDC, 2011).



4.attēls. Ar katetru lietošanu saistīto infekciju sastopamība, attēloti (%) no visām nozokomiālajām infekcijām (adaptēts no ECDC, 2011–2012)

1.8.3. Protēžu infekcijas

Protēžu infekcijas KONS izraisa 30 - 40% no visiem gadījumiem. Infekcija biežāk attīstās pacientiem ar autoimūnām slimībām, gados vecākiem cilvēkiem, kā arī pacientiem, kuri lieto hormonālos preparātus.

2009. gadā Zviedrijā tika veiktas apmēram 16.000 primāras gūžas locītavas aizvietošanas un 13.000 ceļu locītavu artroplastiju, savukārt ASV un Anglijā ap 800.000 gūžas un 130.000 ceļa locītavu artroplastiju. Tiek plānots, ka ASV līdz 2030. gadam gūžu un ceļu artroplastiju gadījumi paaugstināsies attiecīgi par 174% un 673%. Līdz ar to palielināsies arī šo locītavu protēžu infekciju gadījumi (Arciola et al., 2005).

Zviedrijā ap 0,8% artroplastiju gadījumos pēc diviem gadiem tiek veikta

revīzija, sakarā ar mākslīgās locītavas infekciju. Līdzīgs gadījumu skaits tiek ziņots arī no citām Ziemeļeiropas valstīm, ASV šo gadījumu ir vēl vairāk (1,5 -2.5%). Pēc revīzijas, ar vai bez protēzes nomaiņu, apmēram 20% gadījumos pacientiem attīstās atkārtota infekcija. Etioloģiskie aģenti visbiežāk ir *S.aureus* un KONS (Galdbart et.al., 2000).

Latvijā, pēc Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcas Mikrobioloģiskās laboratorijas (vadītāja: LU prof. A.Žileviča) apkopotajiem datiem, 2009. gadā pacientiem, kuriem pirmreizēji tika konstatēta locītavu iekšējās protēzes infekcija un kuriem veikta revīzijas operācija, mikrobioloģiskajos izmeklējumos visbiežāk izdalīti bija stafilokoki. No 99 uzsējumiem, no kuriem izdalīti mikroorganismi, 76,8% gadījumu identificētas grampozitīvas baktērijas. *S.aureus* identificēti 31 paraugos, bet KONS tika noteikti 39 paraugos, no tiem *S.epidermidis* identificēti 17 uzsējumu paraugos. Jāatzīmē, ka meticilīnrezistence (MRSE) konstatēta 9 (52,9%) gadījumos (nepublicēts ziņojums, 2009).

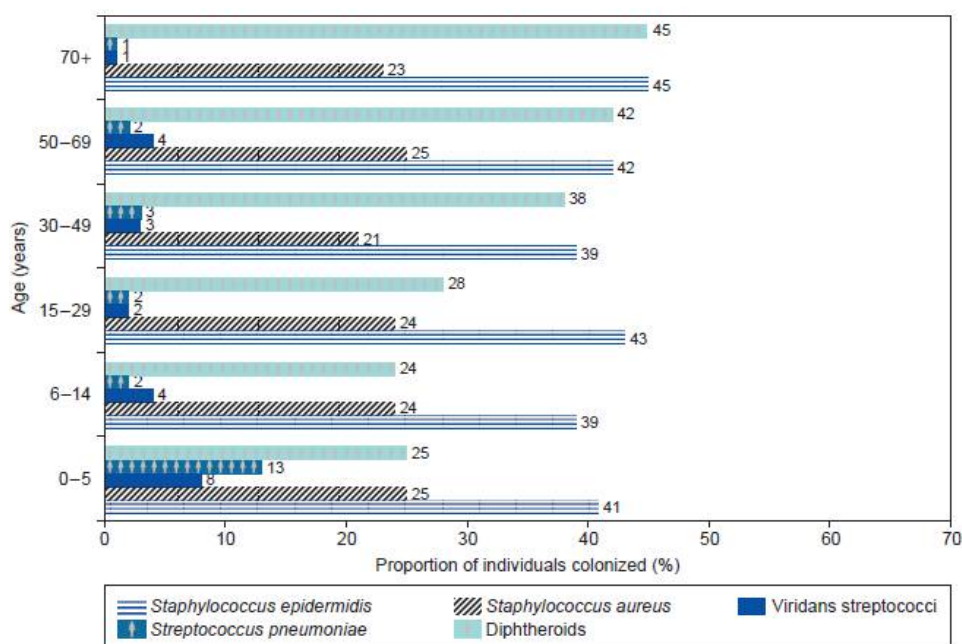
Dabisko sirds vārstuļu infekcijas stafilokoki neizraisa bieži, tie biežāk izraisa mākslīgo sirds vārstuļu infekcijas. Dabisko sirds vārstuļu endokardīta gadījumā *S.epidermidis* ir bijis izraisītājs 5-8% gadījumu. Sirds mākslīgo vārstuļu endokardīta gadījumos 15-50% ir bijis izdalīts *S.epidermidis* (Tegnell et al., 2002, Rohde et al. 2006).

Anselmino *et al.* pētījumos veica no inficētiem implantējamiem sirds defibrilatoriem un kardiostimulatoriem izolēto baktēriju identifikāciju un rezistences noteikšanu, apkopojot rezultātus, tika konstatēts, ka visbiežāk izolētais infekciju izraisītājs (37.7%) ir bijis tieši *S. epidermidis* (Anselmino et al., 2004, Gordon R., et al., 2012).

1.8.4. Ar kontaktlēcū lietošanu saistītās acs infekcijas

Acs mikroflora ir ļoti vienkārša un parasti sastāv no ne vairāk kā divām mikroorganismu sugām. Divas dominējošās baktēriju grupas, kas tiek izdalītas no konjunktīvas ir koagulāzes negatīvie stafilokoki (> 90% gadījumu) un difteorīdi (> 80% gadījumu). Visiežāk sastopami ir *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis* un *Propionibacterium acnes*. Retāk tiek identificēti *Peptostreptococcus* spp. , *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* spp., un gram-

negatīvās nūjiņas. Osato et al. pētījumos apkopoti rezultāti no 496 indivīdu acu konjunktīvām. Pētījumos tika salīdzinātas mikrofloras atšķirības atkarībā no indivīdu vecuma. Diagrammā var redzēt, ka dažādos cilvēka vecuma periodos būtisku prevalenci uzrāda koagulāzes negatīvo stafilokoku pārstāvis *Staphylococcus epidermidis*. Tas, varētu būt skaidrojams ar faktu, ka arī cilvēka ādas mikrofloras lielāko daļu veido tieši šīs sugas baktērijas. Vecākiem cilvēkiem biežāk tiek identificētas difteorīdu sugas, vecuma grupā virs 70 gadiem šie mikroorganismi tika identificēti 45% gadījumu (Osato et al., 2010).



5.attēls. Konjunktīvas mikroflora dažādos vecuma periodos (ar izmaiņām no Osato, 2010)

Palielinoties kontaktlēcu lietotāju skaitam, palielinās arī to pacientu skaits, kuri cieš no dažādām acu infekcijām. Kontaktlēcas var uzskatīt par svešķermeni, pret kuru līdzīgi kā citiem medicīnā lietotajiem polimēru materiāliem, mikroorganismiem ir izteiktas kolonizācijas un adhēzijas spējas (Dutta et al., 2014).

Visbiežākā infekcija kontaktlēcu lietotāju vidū ir bakteriālais keratīts. Lai attīstītos infekcija, mikroorganismiem ir jāiekļūst acs audos, kas visbiežāk notiek radzenes traumas dēļ, kontaminētu kontaktlēcu lietošanas gadījumā, vai arī kontaktlēcas radītas mikrotraumas dēļ. Vairāku pētījumu dati liecina, ka jaunattīstības

valstīs ir aptuveni 1,5 līdz 2 miljoni radzenes čūlu gadījumu katru gadu. Infekcijas biežums ir katram 11 no 100 000 personām ASV. Pamatoti tiek uzskatīts, ka bakteriālais keratīts ir ļoti nopietna sabiedrības veselības problēma (Seal and Pleyer 2007).

Visbiežākais acs infekciju izraisītājs ir *S.epidermidis*. Rossetti et.al. pētījumos tiek aprakstīts, ka pēc kataraktas operācijām, endoftalmīta gadījumā *S.epidermidis* bija visbiežāk izolētie mikroorganismi. Pētījumā tiek norādīts, ka 75% no *S.epidermidis* celmiem, kas izolēti no pacientiem, kuriem bija attīstījies endoftalmīts, tika atrasti virulences gēni *icaA*, *icaD* un arī tika noteikts meticilīnrezistences gēns *mecA*. Saprofitiskajiem izolātiem šie virulences marķieri tika noteikti tikai septiņos procentos gadījumu (Rossetti et.al., 2012).

1.9. *S.epidermidis* tipēšanas metodes

1.9.1.Fenotipēšanas metodes

KONS sugu noteikšana pagājušā gadsimta astoņdesmitajos gados galvenokārt tika balstīta uz bioķīmiskās testēšanas profiliem. Kloos un Schleifer 1975. gadā ieteiktajā identifikācijas shēmā tika izmantoti noteikti bioķīmiskie marķieri, tai skaitā rezistence pret novobiocīnu; saharozes, fruktozes, galaktozes, ribozes, laktozes, turanozes, melicitozes, ksilozes, mannozes, trehalozes, mannīta, ksilīta un maltozes fermentāciju, fosfatāzes, nitrātu reducēšana un arginīna izmantošana (Kloos and Schleifer, 1975).

Citas identifikācijas metodes ietver antibakteriālo līdzekļu jutības profilu noteikšanu un arī šūnu taukskābju analīzi (Birnbaum et al, 1991). Sakarā ar laika un resursu ietilpīgo darbu, kas tika ieguldīts šajās agrīnajās sugu identificēšanas shēmās, un arī tāpēc, ka tika pieņemts, ka KONS grupai ir raksturīga zema virulence, lielākā daļa izolātu ar grampozitīvo koku morfoloģiju, katalāzes producēšanu, bet bez koagulāzes producēšanas, tika vienkārši identificēti kā koagulāzes negatīvie stafilokoki (KONS). Taču diskusijās par KONS sugu identifikācijas klīnisko lietderību, kļuva skaidrs, ka dažas KONS sugas var būt saistītas ar ļoti nopietnām infekcijām. Tādejādi aktualizējās jautājums par koagulāzes negatīvo stafilokoku sugu identifikācijas nepieciešamību (Kloos un Bannerman, 1994).

Fenotipiski stafilokoku izolātus var salīdzināt pēc to jutības pret dažādiem antibakteriālajiem līdzekļiem, izmantojot disku difūzijas metodi un arī komerciālās sistēmas, kā piemēram: *miniAPI (BioMerieux)*. Taču šīm fenotipiskajām metodēm ir maza izšķirtspēja un arī pastāv iespēja, ka vienādas antibiogrammas var būt neradniecīgiem baktēriju celmiem. Antibiogrammu salīdzināšanu var lietot kā skrīninga metodi infekciju uzliesmojuma laikā, kad rezistences profilu pret antibakteriālajiem līdzekļiem iespējams izmantot, lai atšķirtu jaunu celmu no klīnikā jau eksistējošiem baktēriju celmiem (Lourdes et al., 2004).

1.9.2. Genotipēšanas metodes

Par izvēlēs metodēm baktēriju celmu tipēšanai kļuvušas metodes, kurās tiek izmantotas dažādas molekulārās izmeklēšanas tehnikas. Molekulārās epidemioloģijas pētījumiem izmantotās metodes galvenokārt ir balstītas uz diviem principiem: DNS joslu analīzi un DNS sekvenēšanu.

Restrikcijas fragmentu garuma polimorfisms (RFLP)

RFLP metodes pamatā ir atšķirība homologās DNS sekvencēs, kuru var noteikt pēc DNS parauga šķelšanas ar restriktāzes enzīmu, kad veidojas dažāda garuma un skaita fragmenti. Lielākā daļa RFLP marķieru ir lokusu specifiski un ar ļoti augstu izšķirtspēju. KONS tipēšanai metode tiek lietota reti, baktēriju biežā ģenētiskā polimorfisma dēļ (Widerström *et al.*, 2011).

Nejauši amplificētas polimorfiskas DNS analīzes (RAPD).

RAPD izmanto praimerus, lai brīvi piestiprinātu genoma DNS pie vairākiem lokusiem, tālāk seko gēla elektroforēze un vizualizācijas process. RAPD ir mazāka izšķirtspēja, salīdzinot ar pulsējošā lauka gēla elektroforēzi, bet šī metode ir daudz ātrāka un arī vieglāk izpildāma (Tyler et al., 1997, Cassey et al., 2006).

rep- PCR uz atkārtotām sekvencēm balstīta polimerāzes ķēdes reakcija

Rep- PCR metodes pamatā praimeru saistās ar daudzām atkārtotām sekvencēm. Dažāda garuma fragmenti tiek pagarināti. Fragmentus tālāk ir iespējams sadalīt pēc masas, pielietojot elektroforēzes metodi. Sekojoši tiek izveidots unikāls rep-PCR DNS profils ar vairākām joslām katram paraugam (Deplano et al., 2000).

Amplificēto fragmentu garuma polimorfisma (AFLP) analīze

AFLP lieto restrikcijas enzīmus, lai sašķeltu genoma DNS, tam seko adaptoru pievienošana restrikciju fragmentu lipīgajiem galiem. Izšķirtspēja tiek palielināta izmantojot

ar fluorescenci marķētus praimerus. AFLP biežāk lietota *S. aureus* pētījumiem, koagulāzes negatīvajiem stafilokiem šī metode ir ierobežota (Vos et al., 1995., Widerström et al., 2011).

Daudzlokusu variabla tandēma atkārtojumu analīze (MLVA)

Lietojot MLVA, tiek atpazīti kodējošo un nekodējošo gēnu īsu tandēmisku atkārtojumu mainība skaitļos. Noteiktie celmi tiek iedalīti pēc katra pētāmā lokusa atkārtojumu skaita. Metode tiek uzskatīta par zelta standartu *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis* un KONS epidemioloģiskajai izpētei (Li et al., 2009).

Pulsējošā lauka gēla elektroforēze (PGFE)

PFGE sākotnēji tika izstrādāts hromosomu un zemāko eikariotu elektroforētiskai sadalīšanai. PFGE ir RFLP līdzīga makroreskripcijas analīzes forma, kurā baktēriju genoms tiek sašķelts ar restrikcijas enzīmiem. Šie enzīmi salīdzinoši maz sagriež genoma DNS, tādējādi veidojot mazu skaitu DNS fragmentu (10-20 joslas). Šo fragmentu lielums variē no 20 kb līdz 10 000 kb un tos sadala ar speciālām elektroforēzes tehnikām, radot līdzstrāvas impulsus dažādos virzienos. Atšķirības restrikcijas profilos tiek lietotas lai varētu veikt ģenētiskos salīdzinājumus starp izolātiem (Felix et al., 2012).

Neskatoties uz faktu, ka šī metode ir mērķēta uz specifiska enzīma atpazīšanas vietām genomā, PGFE spēj noteikt arī lielas izmaiņas genomā, piemēram: insercijas, delēcijas un tranzīcijas.

PFGE kā tipēšanas metodei ir būtiski trūkumi. Pirmkārt, tā ir laikietilpīga un darbietilpīga, kā arī tehniski samērā grūti izpildāma metode. Otrkārt, KONS baktērijām raksturīgas nelielas ģenētiskās izmaiņas, kuras veidojas salīdzinoši īsā evolūcijas laikā un tas var būtiski ietekmēt rezultātu. Tādējādi ir piesardzīgi jāizmeklē izolāti, kuri iegūti dažādos laikos un vietās, it īpaši, ja ir nelielas atšķirības joslu modeļos. Tādēļ šī metode nav izvēles metode ilgstošiem baktēriju populācijas ģenētiskiem pētījumiem. Grūtības sagādā PFGE veidotie DNS profili no dažādām laboratorijām, jo metode ir jutīga pret nelielām izmaiņām tehniskās procedūras laikā.

Daudzlokusu sekvenču tipēšana (MLST)

Šī metode tika izstrādāta 1998. gadā. Metodes pamatā ir DNS sekvenēšana, lai pārbaudītu allēļu dažādību virknei gēnu. Šie t.s. „housekeeping” gēni nosaka svarīgu pro-

teĶnu sintēzi, kuri nav saistĶti ar baktēriju virulenci vai rezistenci pret antibakteriāliem līdzekļiem (Maiden et al. 2008). Septiņi gēnu lokusi, kas tiek izmantoti MLST metodei, apkopoti 2.tabulā.

**2.tabula. „Housekeeping” gēni un to kodētie fermenti
(ar izmaiņām no Feil, 2004)**

Gēni un to funkcija	Amplikona izmērs, ko lieto allēļu piešķiršanai
Karbamāta kināze (<i>arcC</i>)	465bp
Šikimāta dehidrogenāze (<i>aroE</i>)	420bp
ABC transporters (<i>gtr</i>)	438bp
DNS sintēzes kļūdas labojošais proteīns (<i>mutS</i>)	412bp
Pirimidīna sintēzes operona regulējošais proteīns (<i>pyrR</i>)	428bp
Triosefosfāta izomerāzes (<i>tpiA</i>)	424bp
Acetil KoA acetiltransferāze (<i>yqiL</i>)	416bp

Dažādas sekvences katrā lokusā tiek apzīmētas ar dažādiem alēļu skaitļiem. Katru celmu nosaka pēc alēlēm, to septiņiem lokusiem (alēliskais profils). Katram unikālajam alēliskajam profilam (vai genotipam) tiek piešķirts sekvences tips (ST),

kas tiek izmantots, kā ērts bakteriālā celma raksturotājs (Miragaia et al., 2002, Feil et al., 2004).

Tiek uzskatīts, ka ievērojama daļa populācijas pieder ierobežotam kopu skaitam vai tuvu radniecīgiem genotipiem, pētījumos tie tiek apzīmēti kā klonālie kompleksi (CC). Klonālie kompleksi parasti sastāv no viena dominējoša genotipa ar vairākiem mazāk radniecīgiem genotipiem. Vienkāršākais klonālo kompleksu modelis veidojas, pieaugot genotipa biežumam populācijā. Pēc MLST ainas pēcteči sākotnēji alēliskajā profilā paliks nemainīgi, bet laika gaitā var izveidoties varianti, mainoties vismaz vienai no septiņām alēlēm (punktveida mutāciju vai arī rekombināciju dēļ). Genotipus, kuriem alēliskais profils atšķiras no priekšteču profila vienā no septiņiem MLST lokusiem, sauc par viena lokusa variantiem (SLV). SLV arvien vairāk mainoties, veidojas varianti, kuri atšķirsies jau ar diviem (DLV) no septiņiem lokusiem. Divi celmi, kuri ir tuvu radniecīgi var uzrādīt arī atšķirīgas fenotipiskās īpašības (Cooper and Feil, 2008, Van Belkum et al., 2007) .

MLST ir salīdzinoši dārga mikroorganismu izolātu genotipēšanas metode. Tās priekšrocības ir tādas, ka tā sniedz informāciju arī par baktēriju filoģenēzi un arī ciltskoka evolūciju. MLST metodei ir pilnīgi standartizēta shēma, līdz ar to ir iespējama starplaboratoriju rezultātu salīdzināšana. Visi iesūtītie rezultāti tiek apkopoti starptautiskajā datubāzē. Lai palielinātu *S. epidermidis* MLST metodes izšķirtspēju, to kombinē arī ar gēnu analīzi. Kā papildus metode tiek lietota arī jutības pret antibakteriālajiem līdzekļiem profila noteikšana (Urwin and Maiden, 2003, Monk and Archer 2007, Miragaia, et al., 2008) .

Pilna genoma sekvenēšana

Metode sniedz plašu informāciju par baktēriju genomu, dodot plašāku iespēju tālākiem pētījumiem. Šobrīd ir sekvenēti četri KONS celmi: *S. epidermidis* ATCC12228, *S. epidermidis* RP62a, *S. haemolyticus* JCSC1435 un *S. saprophyticus*. (Widerström et al, 2011).

3.tabula. Biežāk lietoto *S. epidermidis* molekulāro tipēšanas metožu salīdzinājums (ar izmaiņām no Widerström et al, 2011)

Metode	Mērķis	Priekšrocības	Trūkumi
Pulsējošā lauka gēla elektroforēze	Visas bakteriālās hromosomas restrikcijas polimorfisms	Ir augsta izšķirtspēja Vērtīga, lai izvērtētu īstermiņa epidemioloģiju, nelielus uzliesmojumus	Tehniski sarežģīta un laikietilpīga metode. Ierobežota starplaboratoriju salīdzināšana. Nav pilnīgas standartizācijas
Daudzlokusu sekvenču tipēšana (MLST)	„Housekeeping” gēnu alēlisko variantu sekvenēšana	Starplaboratoriju datu salīdzināšana Vērtīga metode ilgtermiņa evolūcijas analīzēm	Ierobežota izšķirtspēja. Dārga metode
Daudzlokusu variablu tandēma atkārotjumu analīze (MLVA)	Hromosomālo elementu MLVA skaita polimorfisms	Ātri izpildāma metode Augsta caurlaidība	Nav pilnīgas standartizācijas. Nav apstiprināti interpretācijas kritēriji

2. Materiāli un metodes

2.1. Pētījuma apraksts

Promocijas darba eksperimentālā daļa tika izstrādāta LU BF Bioanalītisko un biodozimetrisko metožu laboratorijā „Kapacitātes stiprināšana starpnozaru pētījumos biodrošībā” 2009/0224/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAAA/055 projekta ietvaros. Pētījuma izpildes laikā tika saņemts LU Eksperimentālās un klīniskās medicīnas institūta zinātniskās izpētes ētikas komisijas atzinums, paraugu ievākšanai projekta mērķim no veselīgiem cilvēkiem un pacientiem (1.08.2011. priekšsēdētājs prof. J. A.Sīpols, 1. pielikumā).

Kopumā, laika periodā no 2010. gada pavasara līdz 2012. gada pavasarim, tika ievākti 305 *S.epidermidis* paraugi. Stafilokoku celmi iegūti, sadarbojoties ar mikrobioloģiskajām laboratorijām no:

P. Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas

Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas, stacionāra Gaīlezers

Traumatoloģijas un Ortopēdijas slimnīcas

Ventspils slimnīcas

Daugavpils slimnīcas

Klīnisko paraugu grupā tika iekļauti stafilokoku celmi, kas izolēti no operāciju brūcēm, kas bija ar iekaisuma pazīmēm un bez citu mikroorganismu klātbūtnes mikrobioloģiskajos uzņēmumos, kā arī *S. epidermidis* celmi no asinīm (hemokultūra) un intravenozo katetru galu uzņēmumiem. Mikroorganismu paraugi no hemokultūras tika izolēti, ievērojot rekomendācijas, par patiesi pozitīvām hemokultūrām, ja ir bijušas identificētas normālās mikrofloras baktērijas. Par izmantojamām pētījumā tika atzītas tās, kuras bija savāktas 48 stundu laikā, un vismaz divos asins uzņēmumos izauga *S.epidermidis*, kā arī šīs baktērijas bija ar vienādu koloniju morfoloģiju un ar vienādu jutības pret antibakteriālajiem līdzekļiem profilu. Stafilokoku izdalīšana no katetru galu uzņēmumiem tika veikta, lietojot puskvantitatīvo uzņēmumu metodi, pirms tam veicot sonikāciju. Izolētās baktērijas pēc identifikācijas tika uzglabātas stobriņos, kas piemēroti ilgstošai uzglabāšanai saldētavā (*Cryobank*).

Kontroles (komensālo) grupā bija iekļauti stafilokoku celmi, kas izolēti no veselīgiem studentiem, vecumā no 19-24 gadiem, kuri nav bijuši nodarbināti ar

veselības aprūpi saistītās iestādēs. No katra studenta tika ņemts uzsējums no nāsīm un tālākiem pētījumiem tika izmantots viens *S.epidermidis* izolāts.

Promocijas darba ietvaros, pirmo reizi Latvijā tika izmantota MLST metode *S.epidermidis* genotipēšanai. Tika analizēti *S. epidermidis* izolāti no praktiski vesela cilvēka un diviem hospitalizētiem pacientiem, kuri ārstējās intensīvās terapijas nodaļā. Kā arī tika analizēti divi *S.epidermidis* izolāti no hemokultūras un no perifēro vēnu katetra gala uzsējuma.

Jāpiezīmē, ka, lai iegūtu ticamus rezultātus, uzsējumā no katras vietas tika identificētas trīs kolonijas, tās tika salīdzinātas fenotipiski un tika iegūti rezultāti arī par jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem, izmantojot *Bauer-Kirby* metodi. Tālāk ar MLST genotipēšanas metodi tika analizēts tikai viens *S. epidermidis* celms. Kā kontroles tika izmantoti *S.epidermidis* standartcelmi ATCC 35984 (biofilmu veidojošais) un ATCC 12228 (biofilmu neveidojošais).

2.2. *S.epidermidis* izolātu kolekcijas un datu bāzes veidošana

Pirmreizēji izdalītās *S.epidermidis* izolātu tīrkultūras pēc identifikācijas tika ievietotas stobriņos (*Cryobank*), ilgstošai uzglabāšanai saldētavā -70°C temperatūrā. Pacienta parauga identifikācijas dati tika ievadīti elektroniskajā datu bāzes *Excell* failā, kurā ievadīta informācija par parauga paņemšanas datumu, vietu, pacienta diagnozi, pacienta personas dati netika iekļauti. Pētījuma laikā tika izmantotas speciāli izveidotas anketas, kurās tika iekļauta anonīma informācija par katru paraugu. (5.pielikumā).

2.3. Mikrobioloģiskās barotnes

Mikroorganismu kultivēšanai tika izmantots triptikāzes sojas agārs (TSA) (*Oxoid CM0131*) ar 5% aitas asins piedevu.

Kvalitātes kontrolei tika izmantots *S. aureus* ATCC 25923 celms un *S. epidermidis* ATCC 12228 celms.

Lai noteiktu baktēriju jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem tika izmantots *Mueller-Hinton* agārs (*Scharlau*, 01-136).

2.4. Fenotipiskās izmeklēšanas metodes

2.4.1. Mikroorganismu identifikācijas tests

Stafilokoku identificēšanai tika lietota *BBL™ Crystal™* identifikācijas sistēma (*Beckton, Dickinson and Company, ASV*). Mikroorganismi tiek izolēti no triptikāzes sojas agara (*Oxoid CM0131*) ar 5% asins piedevu, saskaņā ar standarta mikrobioloģisko tehnoloģiju. Identifikācijai tika ņemtas 1-2 kolonijas, tika sagatavotas suspensijas ar turbiditātes ekvivalentu 0,5 *McFarland*, mērot ar densitometru.

Identifikācijas sistēmās tiek izmantoti standartizēti un miniaturizēti fermentatīvi testi, kā arī speciāli adaptētu datu bāze. *BBL™ Crystal™* ir miniaturizēta 18 stundu identifikācijas metode, kurā tiek izmantoti fluorogēnie un hromogēnie substrāti. Reakciju interpretācijai izmantoja krāsu karti, lai varētu izveidot profila skaitli. Iegūto profila skaitli un šūnu morfoloģijas datus ievadīja datorā, kurā instalēta *BBL Crystal ID* sistēmas elektroniskā datu bāze, lai varētu identificēt izdalīto stafilokoku sugu.

Identifikācijas sistēmas rezultāti arī tika lietoti, lai analizētu stafilokoku fermentatīvo aktivitāti un sekojoši salīdzinātu klīniskās un kontroles grupu izolātu datus.

2.4.2. Antibakteriālās jutības noteikšana

Tika izmantota *Bauer-Kirby* metode, kura ir aprakstīta ASV Nacionālās Komitejas klīnisko laboratoriju standartā (CLSI M100-S24, 2014). Metodes pamatā ir pretmikrobu aģenta, ar kuru piesātināts papīra disks, difūzija agara gēlā.

Baktēriju suspensiju tika gatavota tieši no kolonijas fizioloģiskajā šķīdumā. Šim nolūkam izmanto 18 līdz 24 stundas uz neselektīva agara plates augušas kolonijas. Suspensijas blīvums tiek mērīts vai salīdzināts ar 0,5 *McFarland* standartu.

Diski 6 mm diametrā, kas piesūcināti ar antibakteriālo līdzekli, tika novietoti uz *Mueller-Hinton* agara platēm. Agara plates tika inokulētas ar izolēto mikroorganismu tūrkultūrām. Inokulēšanai izmantoja mikroorganismu suspensiju, duļķainība atbilstoši 0,5 *McFarland* standarta vienībām. Plates tika inkubētas 24 stundas 36⁰C temperatūrā.

Pēc inkubēšanas tika mērīta inhibīcijas zona. Zona mērāma milimetros, par zonas robežu uzskata nepārprotami redzamo inhibīcijas joslas malu. Inhibīcijas zonas novērtēja atbilstoši interpretācijas kritērijiem (CLSI M100-24,2014). Pētījumā izmantoto antibakteriālo vielu diski un to koncentrācijas apkopoti tabulā.

4.tabula. Pētījumā izmantotie antibakteriālo vielu diski

N.p.k.	Antibakteriāla viela	Koncentrācija diskā
1.	Cefoksitīns (FOX)	30 µg
2.	Gentamicīns (GN)	10 µg
3.	Klindamicīns (CC)	2 µg
4.	Eritromicīns (ER)	15 µg
5.	Ciprofloksacīns (CIP)	5 µg
6.	Vankomicīns (VA)	30 µg

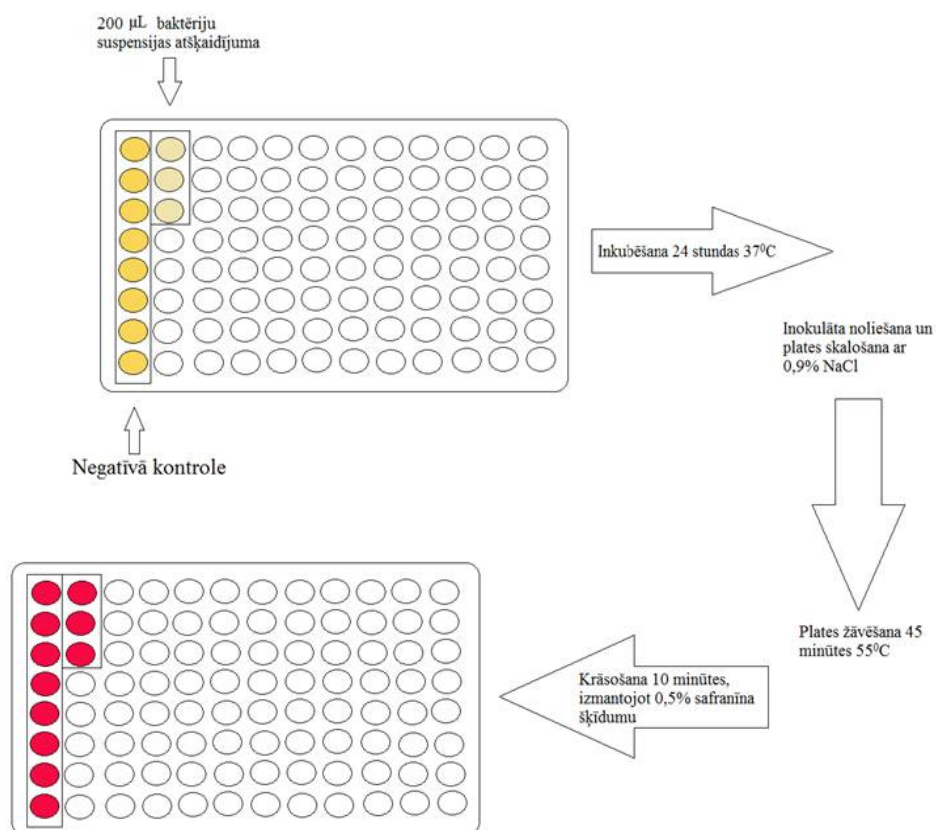
2.4.3. Hemolītiskās aktivitātes noteikšana

Identificētie *S.epidermidis* izolāti tika kultivēti triptikāzes sojas buljonā (TSB), pēc kultivēšanas termostatā 37⁰C temperatūrā 24 stundas, paraugi tika pārsēti uz triptikāzes sojas agāra ar 5 % aitas (TSA-A) un salīdzinājumam arī 5 % cilvēka asins (TSA-C) agāra platēm. Plates ar paraugiem tika ievietotas termostatā 37⁰C uz 24 stundām. Pēc tam tika analizēta *S.epidermidis* paraugu hemolītiskā aktivitāte un salīdzināta starp paraugiem, kuri uzsēti uz TSA-A un paralēli uz TSA-C agāra platēm.

Kontrolei tika izmantoti references celmi *S. epidermidis* ATCC 12228, un no klīniskā materiāla izolētais *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A).

2.4.4. Biofilmas veidošanās noteikšana

Tika lietota modificēta *Christensen* metode (Christensen et al.,1987)



6. attēls. Metodes shematisks attēlojums

No baktēriju suspensijas, kura 24st pie 37°C kultivēta triptikāzes sojas buljonā (Oxoid CM 1065), tiek gatavots atšķaidījums 1:100. 200 šī atšķaidījuma tiek inokulēti trijos lauciņos (200 µl ×3), izmantojot sterilu 96 lauciņu polistirēna mikrotitru plati (*Sarstedt, Inc, Newton, USA*), pēc attēla shēmas. Kā negatīvā kontrole tika lietota sterils triptikāzes sojas buljons bez baktēriju suspensijas. Plates tika inkubētas 24st pie 37°C, pēc tam suspensija tika nolieta un plates divreiz skalotas ar 0,9% NaCl un žāvētas 45 min. pie 55°C. Pēc nožāvēšanas mikrotitru plates lauciņi tika krāsoti 10min, izmantojot 0,5% safranīna šķīdumu. Pēc nokrāsošanas plate skalota ar 0,9% NaCl. Tālāk katrā lauciņā tika pievienots 100µl 0,9% NaCl un izmantojot ELISA datu nolasītāju (*Biochrom Asys Expert Plus* pie 490nm, tika noteikts optiskais blīvums. Par biofilmas veidošanos liecina optiskais blīvums sākot no 0,120 (relat. skaitlis). Katrā tes-

tēšanas reizē tika izmantoti references celmi *S. epidermidis* ATCC 12228, kā biofilmu neveidojošais celms un *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) biofilmu veidojošais celms, izdalīts no klīniskā materiāla.

2.4.5. *S.epidermidis* adhēzijas spēju noteikšana

Lai novērtētu *S. epidermidis* adhēzijas spējas, tika pētīta mijiedarbība starp baktērijām un dažāda materiāla mīkstajām kontaktlēcām. Darbā tika izmantotas ne tikai bakterioloģiskās, bet arī histoloģiskās metodes, kas tika izstrādātas, sadarbojoties ar RAKUS Patoloģijas centra patologu Dr. med. Sergeju Isajevu.

Pētījumā tika izvērtēta mijiedarbība starp *S.epidermidis* un dažāda materiāla mīkstajām kontaktlēcām, nosakot gan *S.epidermidis* adhēzijas spējas, gan arī biofilmas veidošanos uz kontaktlēcām. Pētījumā tika izmantotas divu dažādu materiālu lietotas un jaunas mīkstās kontaktlēcas.

Silikonhidrogēla materiāla lēcas: *Lotrafilcon B (Air Optix Aqua (O2 Optix) no CibaVision),*

Senofilcon A (Acuve Oasys no Johnson&Johnson),

Enfilcon A (Avaira no Cooper Vision),

Hidrogēla materiāla lēcas: *MethafilconA (Frequency55 Aspheric Cooper Vison),*

Hilafilcon B (SofLens 59 Bausch&Lomb).

Lietotas kontaktlēcas tika iegūtas no pastāvīgiem kontaktlēcu lietotājiem, pēc tam, kad bija beidzies to nēsāšanas termiņš, jeb pēc 30 dienām. Kontaktlēcas bija koptas pēc pieņemtajiem standartiem, izmantojot daudzfunkcionālo kontaktlēcu šķīdumu, katru dienu tās mehāniski tīrot. Kontaktlēcu lietotājiem nebija acs infekcijas pazīmju, tātad nepastāvēja iespējamība, ka kontaktlēcas tiktu lietotas pie esošām acu infekcijām. Svarīgi, ka noteikta materiāla kontaktlēcas bija ievāktas no viena cilvēka, nodrošinot to, ka viena materiāla kontaktlēcas bija ar vienādu optisko stiprumu, kas strukturēja metodiku, lai apstākļi būtu pēc iespējas līdzīgi. Pētījumā tika lietota standarta *S. epidermidis* kultūra ATCC 12228 *icaA*(-) un no klīniskā materiāla izdalīta biofilmu veidojoša *S.epidermidis icaA*(+) kultūra.

Tika pagatavota *Staphylococcus epidermidis* suspensija, pēc *McFarland* ar duļķojumu 0,5McF, tas ir $1,5 \times 10^6$ kvv/ml. Pēc noteikta ekspozīcijas laika (48h),

kontaktlēcas tika izņemtas no mikroorganismu suspensijām un skalotas fizioloģiskajā šķīdumā, lai nepieļautu mikroorganismu nonākšanu sekojošā eksperimenta posmā. Secīgi kontaktlēcas ar skalpeļa palīdzību tika grieztas garengriezumā ik pa 0.5cm, no katras lēcas tika sagatavoti vismaz 10 paraugu griezumī. Histoloģiskā materiāla pagatavošanai attiecīgie lēcas audi tika fiksēti 48 stundas 10% formalīnā un pēc tam atūdeņoti un tālāk iestrādāti parafīna kasetēs jeb blokos.

Lai būtu iespējams kontaktlēcas un mikroorganismu ainu vizualizēt mikroskopiski, preparāti tika krāsoti ar hematoksilīnu-eozīnu pēc Gimzas krāsošanas metodes. Baktēriju kolonijas tika novērtētas un saskaitītas mikroskopiski redzeslaukā pie 10×100 palielinājuma. Tika izmantots digitālais *Carl Zeiss* mikroskops. Vienam paraugam tika izpētīti 10 redzes lauki, kas tika summēti viena parauga ietvaros. Rezultāti tika izteikti, kā vidējais baktēriju koloniju skaits kvv/1mm² audu paraugā.

Lai noskaidrotu, vai baktērijas ar gēna *icaA(+)* klātbūtni uzrādīs lielāku afinitāti pret polimēriem, tika gatavotas mikroorganismu suspensijas, iekļaujot tajās *icaA(+)* un arī biofilmu veidojošu *S.epidermidis* celmu.

Pētījumā tika veikti sekojoši baktēriju adhēzijas noteikšanas testi :

kontaktlēcu mijiedarbība ar *icaA(-)* *S.epidermidis* suspensiju koncentrācijā 1:10

kontaktlēcu mijiedarbība ar *icaA(-)* *S.epidermidis* suspensiju koncentrācijā 0,5 (McF)

kontaktlēcu mijiedarbība ar *icaA(+)* *S.epidermidis* suspensiju koncentrācijā 1:10

kontaktlēcu mijiedarbība ar *icaA(+)* *S.epidermidis* suspensiju koncentrācijā 0,5(McF)

2.5. Genotipiskās izmeklēšanas metodes

2.5.1. *S.epidermidis* DNS izdalīšana

DNS tika izdalīta no *S.epidermidis* tīrkultūras. Vispirms ar cilpu tika noņemtas stafilokoku kolonijas un suspendētas 200 μl TE buferī. Pēc tam stobriņi likti karsēties termoblokā pie 80°C uz 20 minūtēm. Kad stobriņi tika izņemti no termobloka, tie atdzesēti līdz istabas temperatūrai. Tālāk tika pievienots 50 μl lizocīma šķīduma ūdenī. Tad stobriņi tika likti termostatā un inkubēti 37°C temperatūrā 1 - 2 stundas.

Pēc inkubēšanas katram paraugam tika pievienots 75 µl 20 mg/mL proteīnkināzes K un 10% SDS maisījums. Vēlāk tie tika likti karsēties termoblokā pie 65°C uz 10 minūtēm. Katram paraugam pievienots 100 µl 5M nātrija hlorīda šķīdums un 75 µl CTAB. Tad tika lēni samaisīts ar vorteksa palīdzību un atkal stobriņi likti termoblokā uz 10 minūtēm. Katram paraugam tika pievienots 750 µl hloroforma un izoamilspirta maisījums. Pēc rūpīgas samaisīšanas stobriņi centrifugēti 30 minūtes pie 14 000 apgr/min. Pēc tam augšējā fāze pārnesta jaunā stobriņā, un katram paraugam pievienots izopropanols 3/5 daļas no esošā apjoma. Tālāk seko centrifugēšana 30 minūtes pie 14 000 apgr./min. Tad tiek noliets virsējais slānis un nogulsnes mazgātas ar 500 µl etanola. Pēc 30 min. centrifugēšanas noliets virsējais slānis, un nogulsnes tiek žāvētas istabas temperatūrā. Tālāk katram stobriņam pievienots 50 µl TE buferis. Izšķīdušā DNS tika izmantota polimerāzes ķēdes reakcijām.

2.5.2. Polimerāzes ķēdes reakcija

DNS koncentrācija un tīrība tika pārbaudīta ar spektrofotometru *NanoDrop*. Natīvās DNS atšķaidītas, lai nukleīnskābju koncentrācija paraugā būtu robežās no 15 līdz 100 ng/µl. Vienam paraugam tika pagatavots 24 µl maisījums, kas satur:

- 12,5 µl PCR master mix;
- 0,5 µl *ica1* vai *aap1* praimera;
- 0,5 µl *ica2* vai *aap2* praimera;
- 10,5 µl ūdens.

Tiek pievienota 1 µl DNS, lai kopējais tilpums būtu 25 µl.

Pētījumā tika izmantoti attiecīgie praimeri (*Invitrogen*):

ica1 (5'-CAC GTG CTC TAT GCT GGA TG-3')

ica2 (5'-CCG TTG GAT ATT GCC TCT GT-3')

aap1 (5'-ATA CAA CTG GTG CAG ATG GTT G-3')

aap2 (5'-GTA GCC GTC CAA GTT TTA CCA G-3')

mecA1 (5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A)

mecA2 (5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A).

Amplifikācija tika veikta programmējamā termociklerī (*Applied Biosystems*), lietojot sekojošu PCR reakciju režīmu: 95°C 5 min, 35 cikli 94°C 30 sek, 60°C 30 sek, 72°C 30 sek; 72°C 5 min.

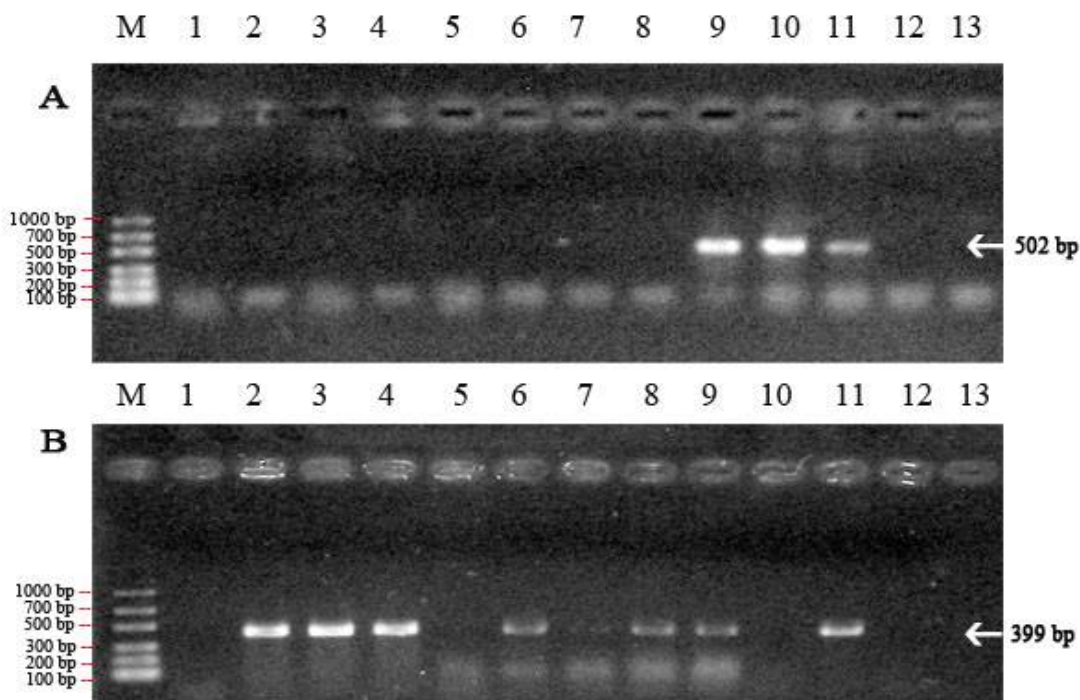
Katrā PCR tika iekļauta gan pozitīvā *S. epidermidis* ATCC 35984 / RP62A, gan negatīvā *S. epidermidis* ATCC 12228 kontrole. Pozitīvās kontroles ATCC 35984 celms satur gan *icaA*, gan *aap* gēnus un ir arī biofilmu veidotājs. Negatīvās kontroles celms ATCC 12228 nesatur *icaA* un *aap* gēnus un nespēj veidot biofilmu. PCR reakcijas produkti tika analizēti, izmantojot agarozes gēla elektroforēzes metodi.

2.5.3. PCR produktu kvalitatīva noteikšana ar agarozes gēla elektroforēzi

Pagatavots 1,5 % agarozes gēls, izmantojot agarozī (*Top Vision LE GQ Agarose*) un 1x TAE (Tris/Acetate/EDTA) buferi. Gēla bedrītē uznesti 7 µl DNS paraugi (5 µl DNS paraugs + 2 µl krāsvielas (6x DNA Loading Dye, Fermentas). Izmantots marķieris (*MassRuler™ Express LR Reverse DNA Ladder, Fermentas*). Strāvas uzstādījumi: 10 min - 80 V, 20 min – 100 V. Pēc elektroforēzes pabeigšanas gēls tika krāsots ar etīdija bromīda šķīdumu. Gēls tika novietots uz transiluminatora un PCR produkti aplūkoti UV gaismā.

2.5.4. Rezultātu interpretācija

Rezultāts tiek uzskatīts par pozitīvu, ja ir konstatēti *ica* gēna - 502bp un *aap* gēna - 399bp fragmenti, un tie atbilst pozitīvās kontroles signālam. Negatīvai un ūdens kontrolei visos gadījumos jābūt negatīvai.



7.attēls. *icaA* un *aap* gēnu fragmentu noteikšana ar PCR un vizualizācija 1,5% agarozes gēlā

- A - *icaA* gēna noteikšana
- B - *aap* gēna noteikšana
- M – DNS garuma marķieris
- 1 - 10 analizētie paraugi
- 11 - pozitīvā kontrole
- 12 - negatīvā kontrole
- 13 - reakcijas ūdens kontrole

2.5.5. Rezultātu statistiskās apstrādes metodes

Iegūto rezultātu analīze veikta, izmantojot *MS Excel 2010* un *GraphPad Prism version 5.01* programmas. Ticamības pierādīšanai pielietots Fišera tests (Fisher's exact test). Statistiskās atšķirības novērtētas ar ticamības vērtību $p < 0,05$, kā arī tika novērtēta OR jeb izredžu attiecība pie 95% ticamības intervāla (TI).

2.5.6. MLST metode

MLST (multilokusu sekvenču tipēšanas metode) ir genotipēšanas metode ar kuras palīdzību var noteikt epidemioloģisko saikni starp baktēriju celmiem, kā arī veikt filoģenētiskos pētījumus. Promocijas darba pētījumu laikā MLST tiek veikta, izmantojot polimerāzes ķēdes reakcijas, kas balstās uz septiņu noteiktu *S.epidermidis* „housekeeping” gēnu – *arcC*, *aroE*, *gtr*, *mutS*, *pyrR*, *tpi*, *yqiL* specifisku amplifikāciju. Promocijas darba ietvaros tika analizēti *S. epidermidis* izolāti no praktiski vesela cilvēka un no diviem hospitalizētiem pacientiem. Kopumā tika analizēti un veiktas sekvenēšanas reakcijas 12 paraugiem. Tiem tika izdalīta DNS, un katram paraugam veiktas 7 PCR un 14 sekvenēšanas reakcijas, tādējādi iegūstot 168 gēnu fragmentu sekvences MLST analīzei.

Uzsējumi tika ņemti no ādas (komensālie stafilokoki) veselai 20 gadus vecai sievietei: no labās un kreisās nāss, kā arī no cirkšņa un spranda apvidus.

No pacienta ar laboratoriski apstiprinātu bakterēmiju tika analizēti *S.epidermidis* izolāti (invazīvie/kolonizējošie) no hemokultūras un perifēro vēnu katetra gala uzsējuma.

No pacienta, kurš atradās intensīvās terapijas nodaļā (ITN) tika paņemti uzsējumi no rokas ādas un no jugulārās vēnas katetra insercijas vietas: pirmajā, trešajā un sestajā ITN ārstēšanās dienā. No *S.epidermidis* paraugu tīrkultūras tika iegūti dati arī par jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem, izmantojot *Bauer-Kirby* metodi, lietojot *CLSI* interpretācijas kritērijus. Sekvenču analīze tika veikta Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centrā. Septiņu lokusu sekvenču polimorfisma analīzi un ST tipa noteikšanu veica Dr. biol.Tatjana Tračevska, izmantojot datorprogrammas: *BioEdit* un *Vector NTI advance*. Iegūtie sekvenču dati tika ievadīti un salīdzināti ar MLST datu bāzē esošajiem datiem (www.mlst.net) un noteikts analizētā stafilokoku izolāta sekvences tips.

Atbilstošo gēnu praimeru sekvences (5'-3'):

arcC

arcC-F TGTGATGAGCACGCTACCGTTAG

arcC-R TCCAAGTAAACCCATCGGTCTG

aroE

aroE-F CATTGGATTACCTCTTTGTTTCAGC

aroE-R CAAGCGAAATCTGTTGGGG

gtr

gtr-F CAGCCAATTCTTTTATGACTTTT

gtr-R GTGATTAAAGGTATTGATTTGAAT

mutS

mutS-F3 GATATAAGAATAAGGGTTGTGAA

mutS-R3 GTAATCGTCTCAGTTATCATGTT

pyrR

pyr-F2 GTTACTAATACTTTTGCTGTGTTT

pyr-R4 GTAGAATGTAAAGAGACTAAAATGAA

tpiA

tpi-F2 ATCCAATTAGACGCTTTAGTAAC

tpi-R2 TTAATGATGCGCCACCTACA

yqiL

yqiL-F2 CACGCATAGTATTAGCTGAAG

yqiL-R2 CTAATGCCTTCATCTTGAGAAATAA

Presekvenēšanas PCR maisījums:

PCR Master Mix 2x (Fermentas Lietuva) 12,5 µl

Praimeru maisījums (P1+P2) 1 µl

DNS 1 µl

H₂O 10,5 µl

24 µl PCR maisījumam pievieno 1µl DNS.

PCR reakcijas apstākļi:

395°C 3min, 34 cikli 95°C 30s, 50°C 1min, 72°C 1min un 72°C 7min

Attīrīšana pēc PCR:

Katram paraugam pievieno 2 µl SAP un 0,5 µl Exol (*Fermentas Lietuva*). Inkubē 40 min pie 37°C un 20 min pie 95°C. Tālāk 2 µl lieto sekvenēšanas reakcijai, lietojot *Big Dye Terminator kit* (*Applied Biosystems USA*)

Sekvenēšanas reakcijas maisījums:

PCR produkts- 2 µl

Praimeris (+ vai -) 1 µl (10pmol/µl)

H₂O – 5,2µl

Big Dye – 1µl

Atšķaidīšanas buferis – 0,8 µl

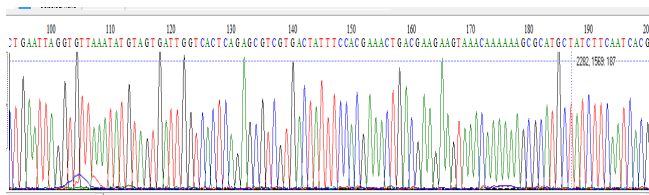
Programma amplifikatorā:

40 cikli 10s 96°C, 5s 50°C, 4min 60°C

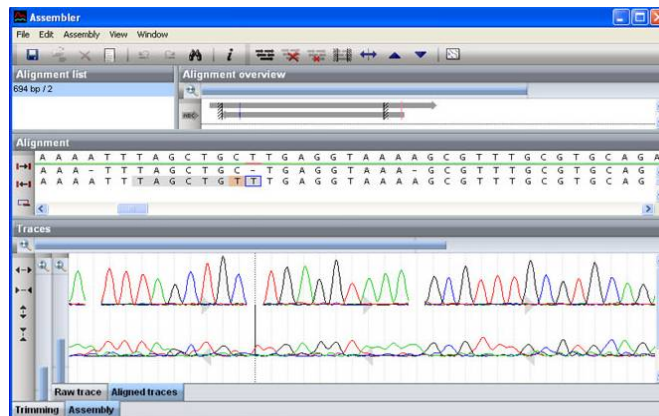
2.5.7. Rezultātu apstrāde

Iegūtā sekvence tika apstrādāta pēc vajadzīgā fragmenta garuma un ievadīta *BioEdit* datorprogrammā. Tālāk veikta salīdzināšanu ar standartu, izveidojot pēc garuma analogu fragmentu. Pēc tam sekoja tālāka analīze, izmantojot *Vector NTI advance 11.5.1.* datorprogrammu. Programmā sekvences tika savstarpēji salīdzinātas un tām tika noteiktas mutācijas vai rekombinācijas. Pēc tam sekvences ievadīja MLST datu bāzē (<http://sepidermidis.mlst.net>) un tika iegūti dati par *S. epidermidis* celmu epidemioloģisko saistību, raksturojot tos pēc noteikta sekvenču tipa (ST). Visi pētījuma laikā Latvijā iegūtie ST tipi un arī jaunās sekvenču kombinācijas tika iesūtītas datu bāzes moderatoram (Dr. Marija Miragaija), kura tos ievadīja datu bāzē un jaunajiem celmiem tika piešķirts ST numurs. Attēlā Nr.8 ir parādīta iegūto datu analīzes secība, lietojot *BioEdit* un *Vector NTI* datorprogrammas.

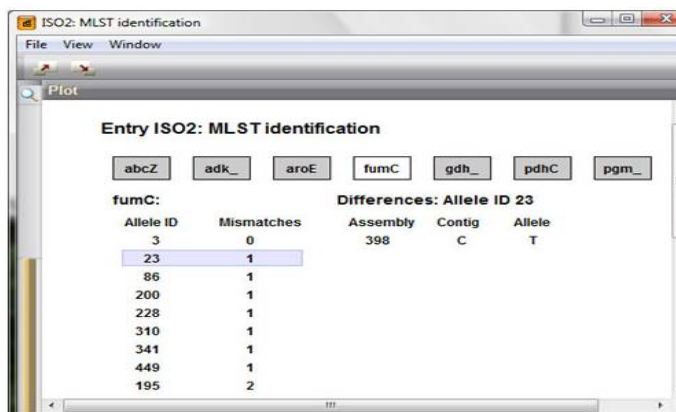
Sekvenču dati tiek ievadīti
BioEdit datorprogrammā



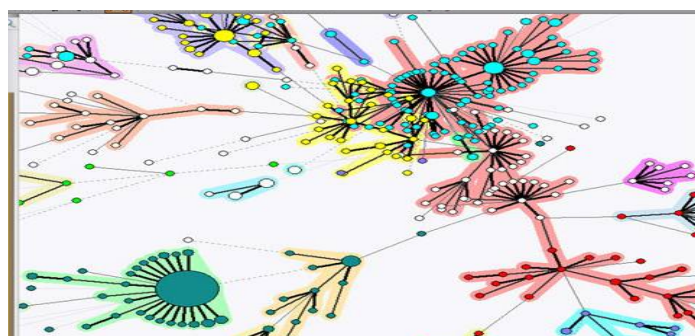
Alēļu salīdzināšana tika
veikta, lietojot *Vector NTI*
datorprogrammu



Sekvenču tipa noteikšana,
ievadot datus MLST
datubāzē



Pēc eBURST algoritma tiek
izveidota diagramma
(piemērs)



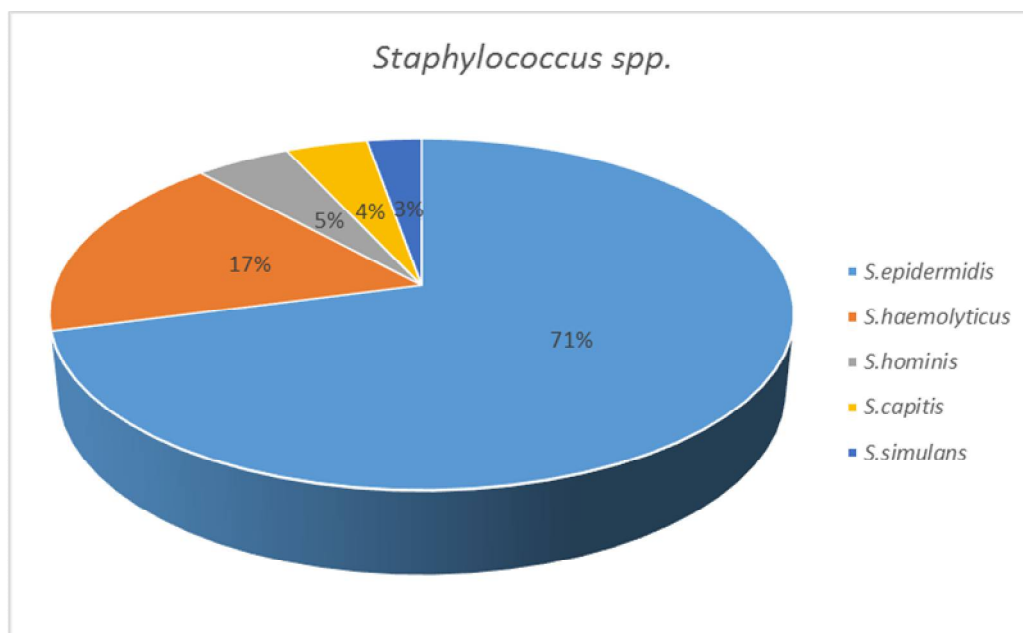
8.attēls. Genotipēšanas datu apstrāde ar *BioEdit* un *Vector NTI*
datorprogrammām

3.Rezultāti

3.1. Koagulāzes negatīvo stafilokoku identifikācija

Promocijas darba pētījuma laikā ievākti 305 *S.epidermidis* paraugi, no kuriem 185 bija paraugi no klīniskajiem materiāliem, tādiem kā asinis (hemokultūra), operāciju brūču un asinsvadu katetru uzsējumi un 120 kontroles paraugi, kas izdalīti no veselīgiem cilvēkiem.

Pētījuma sākumā ievāktajiem 144 no klīniskajiem materiāliem izdalītiem KONS paraugiem tika veikta mikroorganismu identifikācija līdz sugai. Mikroorganismi tika identificēti, izmantojot BBL™ Crystal™ (*Beckton, Dickinson and Company, ASV*) identifikācijas sistēmu. Dominējošā suga starp identificētajiem KONS bija *Staphylococcus epidermidis* 102(71%), no citām KONS sugām tika noteikti *S.haemolyticus* 25(17%), *S.capitis* 7(5%), *S.simulans* 6(4%), *S.hominis* 4(3%)



9.attēls. Identificētās KONS sugas

Veicot šo paraugu atlasi un sekojošu identifikāciju, tika noteikts, ka dominējošā KONS suga ir *S.epidermidis* 71%. Ņemot vērā, ka stafilokoki ir fenotipiski un genotipiski mainīgi mikroorganismi, pētījumiem tika izmantoti tikai *S. epidermidis* sugas izolāti.

3.2. Fermentatīvā aktivitāte

Stafilokokiem ir raksturīgs izteikts fenotipisks nepastāvīgums. Pētījuma ietvaros tika salīdzinātas klīnisko un kontroles grupu *S. epidermidis* celmu variablās un dažas konstantās bioķīmiskās īpašības. Pēc zinātniskajā literatūrā minētiem datiem, par variablām bioķīmiskām īpašībām tiek uzskatīta šādu fermentu darbība: sārmainā fosfatāze (PHA), beta-glikozidāze (LAC), arginīna dehidrolāze (ARG), par stabilām bioķīmiskām īpašībām: ureāzes (URE), maltozidāzes (PAM), N-acetilglutamskābes hidrolāzes (FPY), N-acetilglikozamīnhidrolāzes (FGA) aktivitāte.

S.epidermidis izolātu bioķīmiskā aktivitāte tika noteikta 183 izolātiem, no kuriem 83 bija kontroles grupas un 100 bija klīniskās grupas *S.epidermidis* celmi. Tika izmantota identifikācijas testsistēma *BBL™ Crystal™* (Beckton, Dickinson and Company, ASV).

5.tabula. *S. epidermidis* fermentatīvā aktivitātes salīdzinājums starp kontroles un klīniskās grupas celmiem.

Fermenti	Kontroles grupa (n - 83)		Klīniskā grupa (n -100)		p-vērtība
	Pozitīva reakcija	Negatīva reakcija	Pozitīva reakcija	Negatīva reakcija	
Sārmainā fosfatāze (PHO)	40 (48,0%)	43 (52,0%)	50 (50,0%)	50 (50,0%)	0,88
Ureāze (URE)	77 (93,0%)	6 (7,0%)	73 (73,0%)	27 (27,0%)	0,0005
Arginīna dehidrolāze (ARG)	80 (96,4%)	3 (3,6%)	98 (98,0%)	2 (2,0%)	0,66
Maltozidāze (PAM)	18 (22,0%)	65 (78,0%)	20 (20,0%)	80 (80,0%)	0,85
N-acetilglutāmskābes hidrolāze (FGA)	0 (0%)	83 (100%)	2 (2,0%)	98 (98,0%)	0,501
N- acetilglutāmskābes hidrolāze (FPY)	0 (0%)	83 (100%)	3 (3,0%)	97 (97,0%)	0,252
Beta-glikozidāze (LAC)	78 (94,0%)	5 (6,0%)	93 (93,0%)	7 (7,0%)	1,000

Kā redzams no tabulas datiem, kontroles un klīniskās grupas mikroorganismu bioķīmisko īpašību analīze un salīdzinājums statistiski nozīmīgus rezultātus vairumā gadījumu nedevis. Vienīgais pozitīvais rezultāts iegūts, salīdzinot ureāzes aktivitāti kontroles un klīniskajā grupā. Tika konstatēts, ka klīnisko paraugu grupā statistiski ticami mazāk bija ureāzes pozitīvo kultūru, iegūtā p-vērtība (0,0005). Klīnisko paraugu grupā 73 (73,0%) celmi bija ureāzes pozitīvi un 27 (27,0%) paraugi ureāzes negatīvi, salīdzinot ar kontroles grupas paraugiem, kur 77 (93,0%) paraugi bija ureāzes pozitīvi un 6 (7,0%) paraugi bija ureāzes negatīvi.

3.3. Hemolītiskā aktivitātes noteikšana

S.epidermidis izolātu hemolītiskā aktivitāte tika pētīta uz diviem dažādiem asins agāriem – aitas un cilvēka. Hemolizīni pieder pie stafilokoku virulences faktoriem. Ikdienas praksē nosaka β -toksīnu, kura darbību novērtē aitas asins triptikāzes sojas agārā (TSA-A). Pēc šī rādītāja *S. epidermidis* vērtē kā hemolīzes +/- mikroorganismus. Cilvēka asins agārā (TSA-C) var noteikt δ -toksīnu, bet tā nav laboratoriju rutīnas metode.

Analizējot klīnisko un kontroles *S.epidermidis* kultūru hemolītisko aktivitāti ar konvencionālo metodi, t.i.uzsējumu aitas asins agārā, varēja secināt, ka ir vērojama neliela tendence uz hemolītiskās aktivitātes palielināšanos klīniskajā grupā – hemolītiski bija 53,3% celmu, bet kontroles grupā - 45,0% *S.epidermidis* celmu.

Savukārt, cilvēka asins agārā bija vērojama otrāda parādība – klīniskās grupas stafilokoku celmiem bija noteikta statistiski ticami mazāka hemolītiskā aktivitāte. No kontroles grupas *S. epidermidis* paraugiem 90,0 % izraisīja hemolīzi cilvēka asins agarā, kamēr klīniskie paraugi uzrādīja tikai 55,6% aktivitāti.

6. tabula. *S. epidermidis* hemolītiskās aktivitātes salīdzinājums cilvēka (TSA-C) un aitas asins agārā (TSA-A)

	Hemolīze TSA-C		Hemolīze TSA-A	
	Klīniskā grupa	Kontroles grupa	Klīniskā grupa	Kontroles grupa
Pozitīva reakcija	25 (55,6 %)	36 (90,0 %)	24 (53,3 %)	18 (45,0 %)
Negatīva reakcija	20 (44,4 %)	4 (10,0 %)	21 (46,7 %)	22 (55,0 %)

3.3.1. Saistības starp baktēriju meticilīnrezistenci un hemolīzi noteikšana

Lai noteiktu, vai ir saistība starp *S.epidermidis* meticilīnrezistenci un hemolītisko aktivitāti, bija nepieciešams sagrupēt mikroorganismus pēc to jutības pret cefoksitīnu (metecilīnu) un salīdzināt ar hemolīzes reakciju. Iegūtie rezultāti bija sekojoši. Klīniskajā grupā no 45 *S. epidermidis* tikai pieci (11,1 %) paraugi bija jutīgi pret cefoksitīnu (MSSE), pārējie 40 (88,9 %) bija rezistenti pret cefoksitīnu (MRSE). No MSSE paraugiem trīs bija ar negatīvu hemolīzes reakciju uz TSA-A, diviem paraugiem reakcija bija pozitīva. Savukārt no 40 MRSE 17 paraugiem (42,5 %) bija negatīva hemolīzes reakcija uz cilvēka asins agara, pārējiem 23 paraugiem (57,5 %) hemolīzes reakcija bija pozitīva. Rezultāti ir apkopoti tabulās.

7. tabula. MSSE un MRSE hemolītiskā aktivitāte uz TSA-C

	Negatīva reakcija	Pozitīva reakcija	Kopā
MSSE	3 (60,0 %)	2 (40,0 %)	5
MRSE	17 (42,5 %)	23 (57,5 %)	40
Kopā	20 (44,4 %)	25 (55,6 %)	45

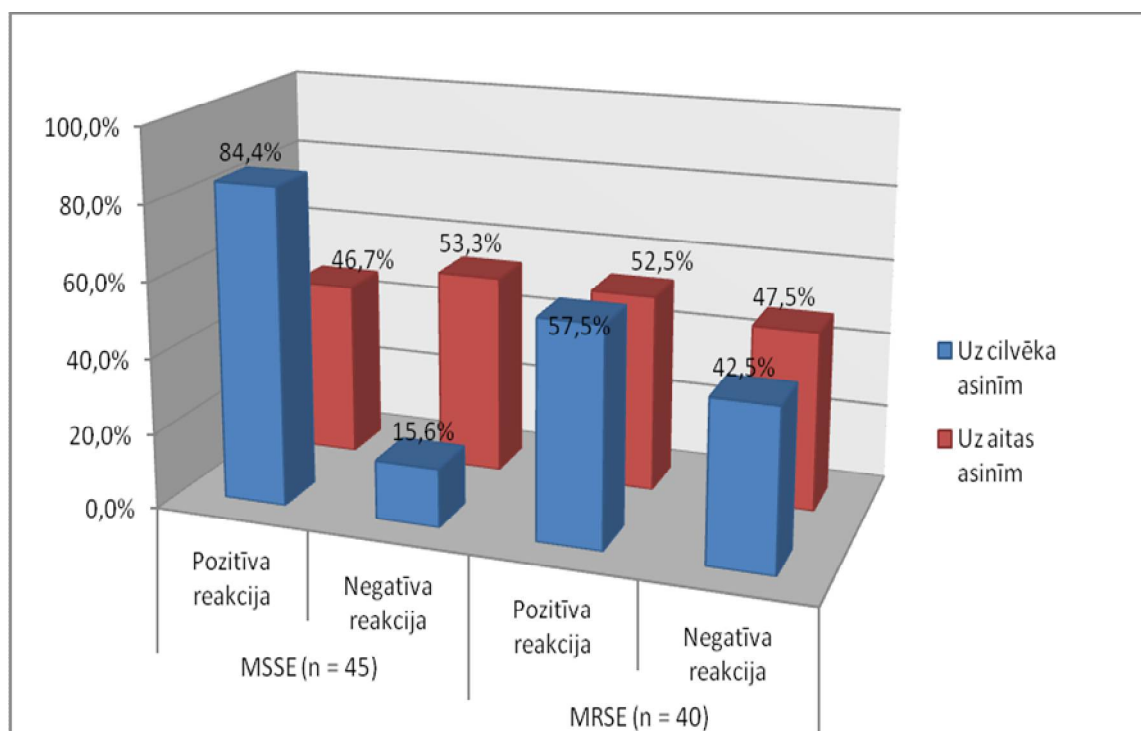
8.tabula. MSSE un MRSE hemolītiskā aktivitāte uz TSA-A

	Negatīva reakcija	Pozitīva reakcija	Kopā
MSSE	2 (40,0 %)	3 (60,0 %)	5
MRSE	19 (47,5 %)	21 (52,5 %)	40
Kopā	21 (46,7 %)	24 (53,3 %)	45

No iegūtiem rezultātiem var redzēt, ka MRSE ir nedaudz lielāka hemolītiskā aktivitāte uz agāra ar cilvēka asinīm nekā MSSE, attiecīgi 57,5 % un 40,0 %.

Lai varētu labāk novērtēt saistību starp meticilīnrezistenci un hemolītisko aktivitāti, tika ņemti *S. epidermidis* celmi no abām paraugu grupām, gan no klīniskās, gan no kontroles grupas. Klīniskajā grupā bija vairāk rezistentu paraugu (MRSE bija

40 izolāti un MSSE bija 5 izolāti), savukārt kontroles grupā visi izolāti bija meticilīnjutīgi (40 MSSE). Tā tika izveidotas divas jaunas grupas – MSSE grupa, kurā bija iekļautas 45 izolāti un MRSE grupa, kurā bija iekļauti 40 izolāti. Rezultāti ir apkopoti 10. attēlā.



10. attēls. MSSE un MRSE hemolītiskās aktivitātes salīdzinājums uz dažādiem asins agāriem

Meticilīnjutīgajiem *S. epidermidis* hemolītiskā aktivitāte uz TSA-C bija 84,4%, no 45 MSSE paraugiem 38 bija pozitīva hemolīze un tikai 7 paraugiem neparādījās hemolītiskā aktivitāte. Savukārt MRSE grupā (n=40) hemolītiskā aktivitāte nebija tik izteikta un sastādīja 23(57,5%), pārējie 17(42,5 %) bija ar negatīvu hemolīzi. Uz TSA-A hemolītisko aktivitāti parādīja MSSE 21 (46,7 %) un no MRSE hemolītiski aktīvi 21(52,5%).

3.4. *S.epidermidis* jutības pret meticilīnu noteikšana ar disku difūzijas testu

S.epidermidis izolātu rezistence pret meticilīnu tika noteikta fenotipiski, lietojot disku difūzijas metodi, izmantojot cefoksitīna 30µg disku. Rezultātu izvērtēšanai tika izmantoti kritēriji (CLSI M100-S24 2014).

Iegūtie rezultāti klīniskās (n-150) un kontroles (n-120) grupu *S.epidermidis* izolātiem apkopoti tabulā. Rezultāti liecina, ka klīniskajā grupā pret meticilīnu rezistenti (MRSE) bija 95,3% , bet kontroles grupā MRSE bija 8,33% *S.epidermidis* izolātu.

9.tabula. *S. epidermidis* jutība pret meticilīnu klīniskajos un kontroles grupas izolātos (skaits/procenti)

<i>S.epidermidis</i>	Jutīgs (MSSE)	Rezistents (MRSE)
Klīniskā grupa n-150	7(4,7%)	143(95,3%)
Kontroles grupa n-120	110(91,7%)	10(8,33%)

3.5. *mecA* gēna noteikšana ar PCR metodi

Lai apstiprinātu *S.epidermidis* celmu rezistenci pret meticilīnu, tika izmantota PCR metode un sekojoša analīze, izmantojot elektroforēzi agarozes gēlā, kas tiek uzskatīta par zelta standarta metodi *mecA* gēna noteikšanai. Tika analizēti 150 klīniskās grupas un 120 kontroles grupas stafilokoku izolāti. Klīnisko paraugu grupā *mecA* gēns tika noteikts 147 (98%) un 15(12,5%) kontroles grupas *S.epidermidis* izolātos. Veicot statistisko analīzi, izmantojot *GraphPad Prism* programmu, tika noteikta statistiskā nozīmīguma vērtība $p=0,0001$, kas pierāda iegūto rezultātu differences nozīmīgumu. *MecA* gēna noteikšanas rezultāti kontroles un klīniskās grupas *S.epidermidis* izolātos apkopoti tabulā nr 10.

10.tabula. *mecA* gēna noteikšanas rezultāti kontroles un klīniskās grupas *S.epidermidis* izolātos

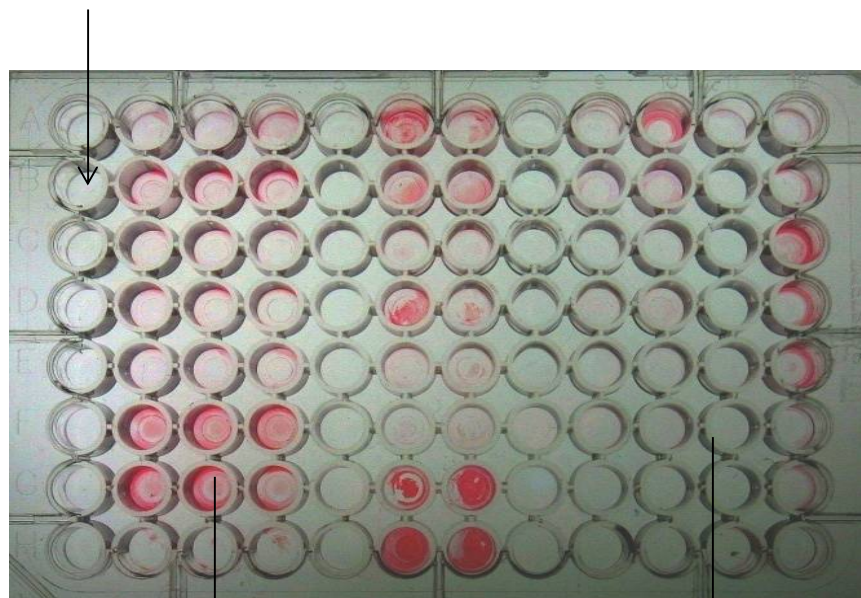
Analizētās grupas	<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -
Klīniskā grupa n - 150	147 (98%)	3(2%)
Kontroles grupa n - 120	15(12,5%)	105 (87,5%)

Salīdzinot PCR rezultātus ar DDT metodes rezultātiem, ir jāatzīmē, ka piecos gadījumos rezultāti atšķiras. Lietojot PCR metodi, *mecA* klātesamība tika noteikta *S.epidermidis* izolātos, kuros ar DDT metodi tika noteikta jutība pret cefoksitīnu (metecilīnu). Tas varētu būt izskaidrojams ar to, ka šajos *S. epidermidis* izolātos rezistences pret metecilīnu gēna *mecA* darbība fenotipiski nav izpaudusies, tāpēc, izmantojot DDT rezultātus, izolāti tika definēti kā jutīgi pret metecilīnu (MSSE).

3.6. Mikrotitru plates metodes rezultāti

Izmantota modificēta metode pēc *Christensen et al.*,1987.

Negatīvā kontrole (barotne bez baktēriju suspensijas)



Biofilmu veidojošie celmi

Biofilmu neveidojošie celmi

11. attēls. Mikrotitru plates metodes pielietojums

Izmantojot mikrotitru plates metodi, lai noteiktu biofilmas veidošanos, tika analizēti 155 klīniskie *S.epidermidis* celmi un 120 kontroles grupas *S.epidermidis* celmi.

Tika konstatēts, ka no 155 klīniskajiem *S.epidermidis* izolātiem 77 (49,7%) bija biofilmu veidotāji. Pārējie 78(50,3%) *S.epidermidis* celmi biofilmu mikrotitru platē neveidoja. Kontroles grupā biofilmu veidotāji bija 34 (28,3%) no 120 *S.epidermidis* izolātiem, 86 (71,7%) izolāti biofilmu neveidoja. Veicot statistisko analīzi, noteikta statistiskā būtiskuma vērtība, kas apliecina, ka atšķirības starp kontroles un klīnisko grupu rezultātiem ir statistiski nozīmīgas.

Attiecīgi: $p=0,0005$, OR: 2,497, 95% TI: 1,504 līdz 4,145

Turpmākajos pētījumos tika salīdzināti abu grupu paraugi, ņemot vērā biofilmas veidošanas mikrotitru platē rezultātus un virulences gēnu *icaA* un *aap* noteikšanas datus.

3.7. Virulences gēnu *icaA* un *aap* noteikšana

No klīniskās grupas 155 *S.epidermidis* celmiem biofilmu mikrotitru platē veidoja un arī tika noteikta abu gēnu *aap/icaA* klātesamība 42(27,1%) izolātos, 6(3,9%) paraugos šie virulences gēni netika atrasti. Viens no gēniem (*icaA* vai *aap*) tika noteikti 29(18,7%) *S.epidermidis* izolātos. Analizējot *S.epidermidis* klīniskos izolātus, kuri neveidoja biofilmu, tika noteikts, ka 20(12,9%) izolātos abi virulences gēni *icaA/aap* tika atrasti, bet 40(25,8%) izolātos tika noteikts viens no šiem gēniem. Virulences gēni netika noteikti 18 (11,6%) *S.epidermidis* paraugos.

No 120 kontroles grupas *S.epidermidis* izolātiem 11(9,2%), kuri veidoja biofilmu mikrotitru platē, tika noteikta virulences gēnu (*icaA/aap*) klātesamība. Viens no gēniem (*icaA* vai *aap*) tika atrasts 15(12,5%) biofilmu veidojošajos *S.epidermidis* izolātos, bet 8(6,7%) *S.epidermidis* paraugos abi virulences gēni netika atrasti.

Biofilmu neveidoja 86 (71,7%) *S.epidermidis* izolāti no kontroles grupas (n-120). Virulences gēni *ica/aap* netika atrasti 31(25,8%) izolātos, 37(30,8%) *S.epidermidis* tika noteikts viens no šiem gēniem, bet abu *icaA/aap* gēnu klātesamība tika noteikta 18(15%) izolātos.

Salīdzinot klīnisko un kontroles grupu rezultātus tika veikta statistiskā analīze,

noteikta statistiskā būtiskuma vērtība, kas apliecina, ka atšķirības starp kontroles un klīnisko grupu rezultātiem ir statistiski nozīmīgas, gadījumos, kad tika noteikta biofilmu veidošana un abu virulences gēnu (*icaA/aap*) klātesamība. Tabulā ir apkopoti biofilmas veidošanas un gēnu *aap/icaA* noteikšanas rezultāti un parādītas arī statistiskās datu apstrādes vērtības, kas iegūtas, lietojot *GraphPad Prism version 5.01* programmu. Ticamības pierādīšanai pielietots Fišera tests (Fisher's exact test). Statistiskās atšķirības novērtētas ar ticamības vērtību $p < 0,05$, kā arī tika novērtēta OR jeb izredžu attiecība pie 95% ticamības intervāla (TI).

11.tabula. Biofilmas veidošanās un gēnu *icaA/aap* klātbūtne klīniskajos un kontroles *S. epidermidis* celmos

Biofilmu veidošanās (BF) <i>icaA</i> un <i>aap</i> gēni	Klīniskā grupa (n-155)	Kontroles grupa (n-120)	P	OR	95% TI
*BF+/aap+/icaA+	42(27,1%)	11(9,2%)	0,0002	3,683	1,803-7,523
BF+/aap-/icaA-	6(3,9%)	8(6,7%)	0,408	0,564	0,190-1,671
BF+/aap+ vai <i>icaA</i> +	29(18,7%)	15(12,5%)	0,187	1,611	0,820-3,165
BF-/aap+/icaA+	20(12,9%)	18(15%)	0,7250	0,839	0,422-1,669
*BF-/aap-/icaA-	18(11,6%)	31(25,8%)	0,0026	0,377	0,199-0,715
BF-/aap+ vai <i>icaA</i> +	40(25,8%)	37(30,8%)	0,4167	0,781	0,499-1,324

* noteikts statistisks nozīmīgums

BF- biofilmas veidošanās, izmantojot mikrotitru plates metodi

P- statistiskā nozīmīguma vērtība

OR – izredžu attiecība

95% TI- ticamības intervāls

Promocijas darba pētījumā uzmanība tika vērsta uz invazīvo *S. epidermidis* celmu izpēti. Tāpēc tika atsevišķi analizēti izolāti no hemokultūrām un no katetriem. Tika veikta biofilmu veidošanas mikrotitru platē izpēte un sekojoša analīze, salīdzinot noteikto virulences gēnu *icaA/aap* klātesamības un biofilmu veidošanas saistību. Rezultāti liecina, ka biofilmu veidojošie *S. epidermidis* izolāti no hemokultūrām (n-67) bija 26(38,8%), no katetriem (n-38) bija 21(55,2%). Salīdzinot abu gēnu *aap/icaA*

klātesamību un biofilmas veidošanos starp izolātiem no hemokultūrām un katetriem, var konstatēt, ka nedaudz vairāk *S.epidemicus* izolāti, kā biofilmu veidotāji, kuriem tika noteikta abu virulences gēnu klātesamība, tika noteikti paraugos no katetriem, taču šī atšķirība starp grupām nesasniedz statistisku nozīmīgumu ($p=0,2092$, OR:0,5169; 95% TI : 0,200 līdz 1,336). Biofilmu veidošana un viens no potenciālajiem virulences gēniem *aap* vai *icaA* procentuāli vairāk tika noteikti *S.epidemicus* paraugos, kas izdalīti no katetru uzsējumiem, tomēr arī šie rezultāti netika noteikti kā statistiski nozīmīgi, rezultāti apkopoti 12.tabulā.

12.tabula. Biofilmas veidošanās un gēnu *icaA/ aap* esamības atšķirības izolātos no hemokultūrām un no katetriem

Biofilmas veidošanās <i>icaA</i> un <i>aap</i> gēni	Hemokultūras n= 67	Katetri n=38	P	OR	95% TI
BF+/aap +/icaA+	10(14,9%)	10(26,3%)	0,2092	0,5169	0,200- 1,336
BF+/aap ⁻ /icaA ⁻	5 (7,4%)	3(7,9%)	1,000	0,812	0,183- 3,586
BF+/aap +vai icaA+	11(16,4%)	8(21,05%)	0,6015	0,6923	0,256- 1,871
BF-/aap +/icaA+	8 (11,9%)	5(13,1%)	1,000	0,8735	0,271- 2,814
BF-/aap-/icaA-	8(11.9%)	3(7,9%)	0,5401	1,741	0,449- 6,742
BF-/aap+ vai icaA ⁺	25(37,3%)	9(23,7%)	0,1944	1,918	0,782- 4,704

BF – biofilmas veidošanās, izmantojot mikrotitru plates metodi
P- statistiskā nozīmīguma vērtība
OR – izredžu attiecība
95% TI- ticamības intervāls

3.8. *S. epidermidis* adhēzijas spēju noteikšana dažādu materiālu kontaktlēcās

Izvērtējot iegūtos rezultātus, redzams, ka virulences gēna *icaA* klātesamība baktēriju izolātos, būtiski palielina baktēriju adhēziju gan kontaktlēcū materiālos, gan lietojot dažādas baktēriju suspensiju koncentrācijas. *Lotrafilcon B* materiālā *S. epidermidis* suspensijas *icaA*(-) koncentrācijā 1:10 novēro vidēji $14 \pm 4,25$ kvv, savukārt, iedarbojoties uz šī materiāla kontaktlēcū ar tādu pašu koncentrāciju, bet lietojot *icaA* (+) kultūru, baktēriju adhēzija ir pieaugusi līdz vidēji $17 \pm 1,57$ kvv/mm². Lielākā *S. epidermidis* suspensijas koncentrācijā 0,5 McF, adhēzijas spējas starp abiem baktēriju celmiem *icaA* (+) un *icaA*(-) ir lielākas un veidojas starpība, kas kopā ir 10 kvv.

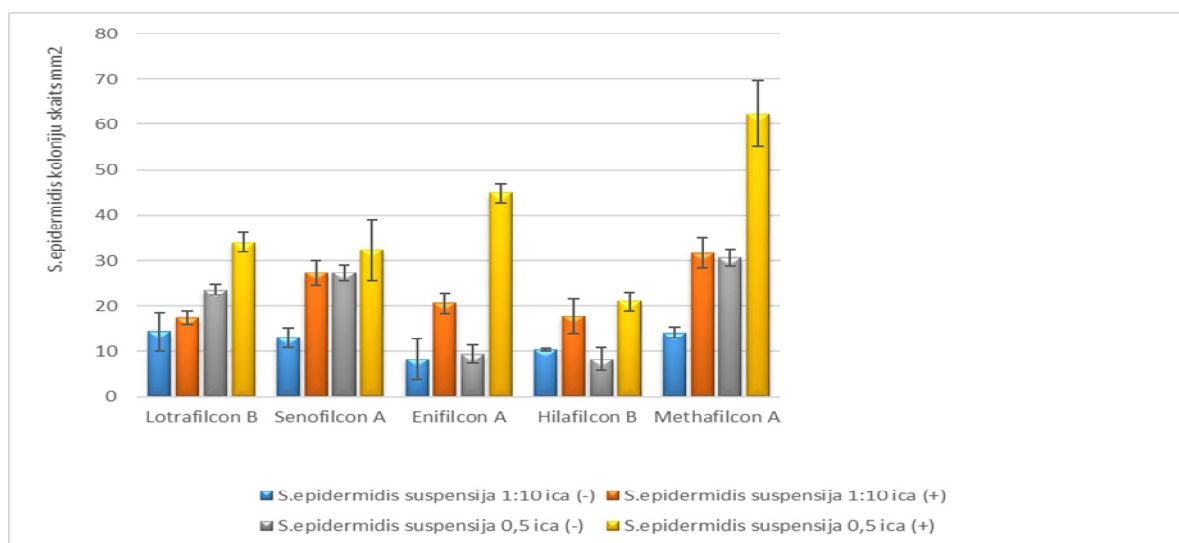
Senofilcon A materiālā lielāka starpība starp *S. epidermidis* adhēziju *icaA*(+) un *icaA* (-) gadījumā, tiek uzrādīta pie zemākās koncentrācijas (1:10), kur izmaiņas raksturojas kā vidējās vērtības no $13 \pm 2,08$ līdz $27 \pm 2,72$ kvv un vidēji $27 \pm 1,76$ līdz $32 \pm 6,7$ kvv, ja tika lietota 0,5McF baktēriju koncentrācijas suspensija.

Enfilcon A materiāla gadījumā adhēzija būtiski pieaug un pie koncentrācijas 0,5McF ir lielāka par pārējiem silikonhidrogēla materiāliem. Pie baktēriju suspensijas koncentrācijas 1:10, kad tika lietota *icaA*(-), vidējais koloniju veidojošais skaits ir $8 \pm 4,37$ kvv. Ievērojamas izmaiņas tika novērotas, lietojot *icaA*(+) baktēriju celmu ar $21 \pm 2,33$ kvv, tātad starpība bija 13 kolonijas. Pie koncentrācijas 0,5 McF izpaudās vēl izteiktāka diference starp *icaA* pozitīvo un *icaA* negatīvo celmu, kas bija vidēji 36 kvv/mm². Hidrogēla materiāla *hilafilcon B* gadījumā, lietojot *icaA* (+) kultūru, kolonijas veidojās no $10 \pm 0,33$ līdz $18 \pm 3,84$ kvv. Un vidēji no $8 \pm 2,4$ kvv līdz $21 \pm 2,1$ kvv pie 0,5 McF koncentrācijas.

Lietojot kontaktlēcū materiālu *methafilconA* tika noteiktas vislielākās atšķirības, salīdzinot ar citiem kontaktlēcū materiāliem. Attēlā redzams, ka baktērijiem ar *icaA* gēna klātesamību, adhēzijas spējas palielinājušās vairāk kā citos materiālos. Pie *S. epidermidis* koncentrācijas 1:10 *icaA*(-) suspensijas izmantošanas gadījumā, tika saskaitītas vidēji $14 \pm 1,15$ kolonijas, savukārt lietojot *icaA*(+) kultūru koloniju skaits ir palielinājies $32 \pm 3,28$ tātad, veidojot starpību vidēji 18 kvv/1 mm².

S. epidermidis 0,5McF koncentrācijas gadījumā uzrādītās baktēriju adhēzijas starpība *icaA*(-) un *icaA*(+) *S. epidermidis* kultūru gadījumā ir lielākā, salīdzinot ar citiem pētījumā izmantotajiem kontaktlēcū materiāliem. *MethafilconA* materiālā

novērots lielākais *S.epidermidis* baktēriju koloniju pieaugums no $31 \pm 1,76$ līdz $62 \pm 7,26$ kvv/1mm².



12. attēls. *S. epidermidis icaA(+)* un *S. epidermidis icaA (-)* adhēzija uz kontaktlēcām, lietojot dažādas baktēriju suspensiju koncentrācijas

3.9. MLST genotipēšanas rezultāti

Promocijas darba ietvaros tika analizēti 12 *S.epidermidis* izolāti (LAT1 – LAT12), tika veiktas 7 PCR un 14 sekvenēšanas reakcijas, iegūstot 168 gēnu fragmentu sekvences MLST analīzei.

Šajā pētījumā neatkarīgi tika salīdzināti genotipi starp katra cilvēka izolātiem no dažādiem ķermeņa apvidiem un arī ar infekciju saistītām ierīcēm/šķidrumiem. No vesela cilvēka tika paņemti izolāti no dažādām ķermeņa vietām ar mērķi noteikt, vai pastāv genotipiskas atšķirības starp *S.epidermidis* celmiem dažādos cilvēka ķermeņa rajonos, ņemot vērā *S.epidermidis* baktēriju lielo ģenētisko variabilitāti.

No *S.epidermidis* paraugu tūrkultūras tika iegūti dati arī par jutību pret antibakteriālajiem līdzekļiem. Visi iegūtie MLST dati tika iesūtīti *S.epidermidis* MLST datu bāzes moderatoram un jaunajiem baktēriju celmiem tika piešķirti sekvences tipa (ST) numuri.

Visi šai pētījumā iegūtie paraugu ST apkopoti 13.tabulā. (izvērsta tabula 2. Pielikumā)

13.tabula. Visu analizēto *S. epidermidis* izolātu iegūto ST apkopojums

Celms	Sekvences tips	arcC	aroE	Gtr	mutS	pyrR	tpiA	yqiL
LAT1	ST 142	2	1	2	2	2	1	1
LAT2	ST 218	1	1	2	6	2	16	1
LAT3	ST 179	1	2	2	2	1	1	1
LAT4	ST 153	2	1	6	2	2	1	1
LAT5	ST 130	1	1	1	2	1	1	1
LAT6	ST 483*	2	1	1	6	1	2	1
LAT7	ST 130	1	1	1	2	1	1	1
LAT8	ST 130	1	1	1	2	1	1	1
LAT9	ST 110	1	6	1	6	2	1	1
LAT10	ST 110	1	6	1	6	2	1	1
LAT11	ST 19	8	7	12	4	12	2	2
LAT12	ST 19	8	7	12	4	12	2	2

ST483* - Latvijā jauns sekvences tips

Veicot MLST analīzi, tika noskaidrots, ka četri celmi, kuri tika iegūti no vesela cilvēka dažādām ķermeņa vietām, bija ar dažādu sekvenču tipu: LAT1, LAT2, LAT3 un LAT4. Trīs no paraugiem bija jutīgi pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem, tomēr viens celms, kurš tika iegūts no nāss ar sekvences tipu – ST 218 bija rezistents pret cefoksitīnu (MRSE), eritromicīnu un klindamicīnu. Šis ST bija jutīgs pret vankomicīnu. Jutības pret antibakteriālajiem līdzekļiem dati veseram cilvēkam apkopoti tabulā.

14.tabula. Sekvences tips un jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem veseram cilvēkam

Sekvences tips (ST)	Am	Er	CC	Cip	Fox	Va
Labā nāss ST142	S	S	S	S	S	S
Kreisā nāss,ST218	R	R	R	S	R	S
Cirksnis ST179	S	S	S	S	S	S
Spranda ST153	S	S	S	S	S	S

Antibakteriālo līdzekļu nosaukumu saīsinājumi:

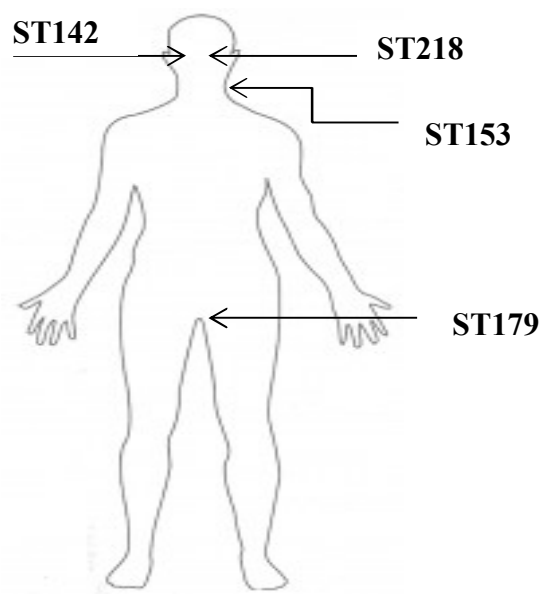
Am – ampicilīns; Er – eritromicīns;

CC – klindamicīns; Cip – ciprofloksacīns;

Fox – cefoksitīns; Va – vankomicīns

Interpretācija: S – jutīgs, I – vidēji jutīgs, R – rezistents

Uzsējumu paņemšanas vietas veseram cilvēkam, kā arī izdalīto un sekvenēto *S.epidermidis* sekvenču tipi (ST) redzami 13. attēlā. *S.epidermidis* baktēriju izolātam ar ST142 tika noteikts jutīgums pret visiem testētajiem antibakteriālajiem līdzekļiem. Savukārt celms ar ST218 bija rezistents pret cefoksitīnu (MRSE), bet uzrādīja jutību pret ciprofloksacīnu un vankomicīnu.



13. attēls. Paraugu paņemšanas vietas no vesela cilvēka un noteiktie sekvenču tipi

No pacienta ar laboratoriski apstiprinātu bakterēmiju tika analizēti divi paraugi; LAT5 celms izdalīts no hemokultūras un LAT6 izdalīts no centrālās vēnas katetra gala uzsējuma.

S. epidermidis celmam LAT5 no hemokultūras tika noteikts, ka MRSE celms ir ar jaunu sekvenču tipu ST483. Šī sekvenču tipa mikroorganismi bija jutīgi pret vankomicīnu. No centrālās vēnas katetra uzsējuma tika noteikts *S. epidermidis* celms ar ST130, arī antibakteriālās jutības profils bija atšķirīgs līdz ar to var secināt, ka bakterēmijas cēlonis, visticamāk nav bijis saistīts ar centrālās vēnas katetra lietošanu.

No uzsējumiem, kuri iegūti no pacienta, kurš atradās ITN, tika izolēti seši *S. epidermidis* celmi: LAT7, LAT8, LAT9, LAT9, LAT10, LAT11 un LAT12. Sešiem *S. epidermidis* celmiem no viena pacienta, bija raksturīgi trīs ST varianti: ST 130, ST 110 un ST19, kas mainījās, atradoties intensīvas terapijas nodaļā vairākas dienas. Viens no izolātiem ar ST130 sestajā dienā kļuva rezistents pret ampicilīnu, eritromicīnu, klindamicīnu, oksacilīnu un vidēji jutīgs pret ciprofloksacīnu, pirmajā

paraugu paņemšanas dienā visi celmi bija jutīgi pret antimikrobiālajiem līdzekļiem.

15.tabula. ITN pacientam identificēto *S.epidermidis* celmu ST un jutība pret antibakteriālajiem līdzekļiem

Dienas, iztriepes paņemšanas vieta	Sekvences tips (ST)	Am	Er	CC	Cip	Ox	Fox	Va
1.diena Roka	ST 130	S	S	S	S	S	S	S
1.diena jugulārā vēna	ST 110	S	S	S	S	S	S	S
3.diena Roka	ST 110	S	S	S	S	S	S	S
3.diena jugulārā vēna	ST 19	S	S	S	S	S	S	S
6.diena Roka	ST 130	R	R	R	I	R	R	S
6.diena jugulārā vēna	ST 19	S	S	S	I	S	S	S

Antibakteriālo līdzekļu nosaukumu saīsinājumi:

Am – ampicilīns; Er – eritromicīns;

CC – klindamicīns; Cip – ciprofloksacīns;

Fox – cefoksitīns; Va – vankomicīns.

Interpretācija: S – jutīgs, I – vidēji jutīgs, R – rezistents

DISKUSIJA

Tiek uzskatīts, ka *Staphylococcus epidermidis* svarīgākais virulences faktors ir spēja kolonizēt uz implantēto biomateriālu virsmas: uz katetriem, protēzēm, mākslīgajām sirds vārstulēm un izveidot biofilmu. Stafilokoku izraisīto infekciju patoģenēzē, sevišķi, ja ir attīstījusies ar katetru un protēžu lietošanu saistīta bakterēmija, liela nozīme ir šo baktēriju adhēzijai un spējai izveidot biofilmu. Biofilmas veidošanās ir komplekss process, kurā svarīga nozīme ir dažādiem proteīniem, tādiem kā ar adhēziju un ar akumulāciju saistītajiem proteīniem un arī faktoriem, kas ietekmē šūnu mijiedarbību, piem: baktēriju QS (kvoruma sajūta).

Pasaulē *S.epidermidis* virulences pētījumi tiek veikti, izmantojot gan šo baktēriju fenotipiskās, gan genotipiskās pazīmes. No fenotipiskajām īpašībām visvairāk pētīta ir ekstracelulāro polisaharīdu produkcija, hemolītiskā spēja, lecitināzes, lipāzes, dezoksiribonukleāzes u. c. eksofermentu aktivitāte. Taču iegūtie rezultāti nav devuši pārlicinošu informāciju par kritēriju specifitāti

Ir daudz pētījumu, kas vērsti uz virulences faktoru iespējamo pielietojumu patogēno celmu identifikācijai, taču šo faktoru nozīme līdz šim nav pilnīgi skaidra. Tāpēc šajā pētījumā tika analizēti dažādi celmu *S.epidermidis* parametri, gan fizikāli, kā biofilmu veidošana, gan bioķīmiskie, kā ureāzes, fosfatāzes testi, gan arī bija noteikta antibiogramma. Pielietojot PCR un genotipiskās metodes, tika raksturota baktēriju rezistence pret antibakteriālajiem līdzekļiem, kā arī noteikti potenciālie virulences faktori un salīdzināti *S.epidermidis* celmi genoma līmenī. Pētījuma laikā tika mēģināts noskaidrot, kādu faktoru kombinācija varētu būt visefektīvākā virulento celmu diagnostikai, kas ļautu precīzi un ātri diagnosticēt virulentos celmus. Ņemot vērā plašo izplatību *S.epidermidis* slimnīcas vidē, vajadzētu pievērst vairāk uzmanības pacientiem, kuriem identificēti patogēnie un pretmikrobu līdzekļu rezistentie stafilokoku celmi un ātrāk veikt terapeitiskus, kā arī preventīvus pasākumus, lai novērstu šo celmu izplatīšanos. Tātad, šiem pētījuma rezultātiem paredzama arī svarīga epidemioloģiskā nozīme.

Promocijas darba pētījuma dati liecina, ka biofilmu veidošana ir vairāk raksturīga klīniskajiem izolātiem. Pētījumā tika noskaidrots, ka biofilmu veidoja 77(49,7%) no visiem klīniskajiem *S.epidermidis* celmiem, šie dati ir ļoti līdzīgi tiem, ko savos pētījumos apraksta vairāki citi pētnieki, kā piemēram, gadījumos, kad

biofilmu veidotāji bija 46% no izpētītajiem *S.epidermidis* celmiem (Arciola et al., 2004). Augstāka procentuālā attiecība, pat virs 87% no klīniskajiem celmiem, kuri veidoja biofilmu, ir aprakstīta tādos pētījumos, kā aprakstīts Ziebuhr et al., 2000. Ir pētījumi ar pretrunīgiem rezultātiem, kuros netika atrasta *S.epidermidis* saistība starp klīnisko nozīmību un spēju veidot biofilmu (Rohde et al., 2006). Promocijas darba pētījumā kontroles grupas *S.epidermidis* celmi biofilmu veidoja 34(23,8%), salīdzinot klīniskos un kontroles grupas celmus, tika konstatēts, ka diference starp abām analizētajām grupām ir statistiski nozīmīga.

S.epidermidis izolātiem, kas bija biofilmu producētāji, 92% gadījumu bija noteikti virulences marķieri, gēni *icaA* un/vai *aap*, kontroles grupā 86% no biofilmu veidotājiem arī noteikti šie virulences marķieri. Līdzīgus rezultātus bija ieguvuši pētnieki Eftekhar un Mirmohamadi, šajos pētījumos tika konstatēts, ka izolāti no pacientiem ar simptomātisku infekciju ir virulentāki, nekā komensālie izolāti (Eftekhar and Mirmohamadi, 2009). Tomēr, pētījumā vairākiem *icaA/aap* pozitīviem *S. epidermidis* celmiem netika novērota biofilmu veidošanās.

Cītu autoru pētījumos par *S. epidermidis* izolātiem, kuri izdalīti bakterēmiju un septicēmiju gadījumos, parādīts, ka visbiežāk invazīvajos paraugos tiek atrasti *aap* un *icaA* gēni abi kopā (Vandecasteele et al., 2003, Woods and Percival, 2014).

Pēc zinātnisko publikāciju datiem, *icaABCD* operona sastopamība klīniskajos *S. epidermidis* izolātos ir 43 - 88%, savukārt komensālos izolātos līdz 38%. Vairākos pētījumos tika diskutēts par iespējamo *icaA* izmantošanu, kā virulences marķieri, lai atšķirtu invazīvos *S. epidermidis* celmus no komensāliem. (Frebours et al., 2000).

Jāatzīmē, ka promocijas darba pētījumos tika analizēts tikai *icaA* gēns, kas kodē glikozaminil-transferāzes produkciju, taču pilnai enzīma aktivitātei ir vajadzīga *icaA* un *icaD* gēna koekspressija, gēna *icaB* funkcija nav pilnībā noskaidrota. Taču pētījumos biežāk tieši *icaA* gēna noteikšana tiek izmantota, lai salīdzinātu virulentos *S.epidermidis* celmus un komensālos celmus (Kozitskaya et al., 2004).

Promocijas darba pētījumā, starp 155 klīniskajiem izolātiem *icaA* vai *aap* gēni tika noteikti 84,5% gadījumos, bet komensālo izolātu grupā abi šie gēni vai arī viens no tiem noteikti 67,5% gadījumu. Analizējot iegūtos rezultātus tika konstatēts, ka *icaA* gēns biežāk tika noteikts klīniskajos *S. epidermidis* izolātos, tomēr nebija konstatēta statistiska atšķirība *icaA/aap* gēnu sastopamībā starp klīnisko un komensālo izolātu grupām ($p>0.05$). Iegūtie rezultāti liecina, ka viena *icaA* vai *aap*

gēna noteikšana, tomēr nav pielietojama virulento *S. epidermidis* celmu diferencēšanai no komensāliem celmiem.

Pētījumos, kurus veica Pourmand et al., izmantojot PCR metodi, no medicīnas darbinieku deguna mikrofloras izolētiem *S. epidermidis* celmiem, *aap* gēnu noteica (91.9%), tas ir 91 no 99 izolātiem (Pourmand et al., 2011). 2012. gadā publicētā pētījumā, kas tika veikts Ugandā, Okee un kolēģi ieguva pretējus rezultātus par *aap* gēnu sastopamību komensālos *S. epidermidis* izolātos. Virulences gēns *aap* starp komensāliem celmiem netika noteikts. Tas norāda uz to, ka dažādās valstīs sabiedrībā cirkulējošo *S. epidermidis* celmu virulences potenciāls atšķiras. (Okee et al., 2012).

Promocijas darba pētījuma rezultāti pierādīja, ka statistiski ticami biežāk ($p < 0,05$) abi *aap/icaA* gēni ir sastopami klīniskajos *S. epidermidis* celmos, kas veidoja arī biofilmu *in vitro* - mikrotitru platē, tātad, virulences faktori tika novēroti gan genotipiski, gan fenotipiski. Līdz ar to vienlaicīga abu gēnu klātesamības noteikšana varētu tikt izmantota par virulences potenciāla marķieri *S. epidermidis* celmos. Rezultāti par *S. epidermidis* celmu spēju veidot biofilmas uz mikrotitru plates liecina, ka pastāv *S. epidermidis* celmi, kas spēj veidot biofilmas arī bez PIA starpniecības. Iespējams, ka šajos izolātos biofilmu stabilizējošo funkciju veic Bap, kas ir ar biofilmu asociētais proteīns. Atsevišķu pētījumu rezultāti liecina, ka ne vienmēr rezultāti liecina par gēnu klātesamības specifiskumu un klīnisko nozīmīgumu. Tā Vandecasteele et al. pētījumā pierādīts, ka visaugstākā *ica* un *aap* gēnu dominēšana ir kolonizējošos izolātos un 75% KONS izolātu arī ir sastopams viens no šiem gēniem (Vandecasteele et al., 2003.)

Iegūtie rezultāti varētu kalpot par pamatu turpmākiem pētījumiem, ar mērķi noskaidrot, kādi mehānismi ir iesaistīti biofilmu stabilizēšanas procesā gēnu *icaA/aap* negatīvajos stafilokoku izolātos.

Apkopojot promocijas darba pētījumu rezultātus par biofilmas veidošanos un adhēzijas procesu, izmantojot kontaktlēcas, var secināt, ka uz silikonhidrogēla materiāla stafilokoki adherējas un kolonizējas labāk nekā uz hidrogēla materiāla lēcām. Izņēmums ir *galyfilconA* kontaktlēcas, kas uzrāda tāda paša līmeņa adherenci kā hidrogēls *etafilconA*. Pamatojoties uz šiem datiem, var secināt, ka lietojot silikonhidrogēla kontaktlēcas, ir lielāks risks baktēriju kolonizācijai nekā hidrogēla lēcu lietošanas gadījumā. Palielināta skābekļa pārnese silikonhidrogēla materiālos

samazina radzenes hipoksijas draudus un tādējādi mazinās audu bojājumu iespējamību. Lietotās kontaktlēcas uzrāda augstāku adhēzijas apjomu nekā jaunas kontaktlēcas hidroģēla un silikonhidroģēla materiālu grupās, jo adhēzijas apjomu galvenokārt nosaka attiecīgās kontaktlēcas hidrofobitāte, kas kontaktlēcu lietošanas laikā būtiski palielinās. Tas notiek asaru depoziņu veidošanās un arī virsmas reljefa raupjuma palielināšanās dēļ. Kopumā izstrādātā metode un rezultāti parādīja, ka kontaktlēcas ir ļoti veiksmīgs modelis biofilmu veidošanas pētījumiem *in vitro*.

Pētījumos Cerca et al., pierāda, ka biofilmu veidošanās uz kontaktlēcu virsmām tiek novērotas gadījumos, kad ir attīstījies keratīts. *In vivo* inficēšanās ar *S. epidermidis* biofilmām notiek aptuveni pēc 48h ilga ekspozīcijas laika, kad kontaktlēca ir bijusi uzlikta radzenei (Cerca et al., 2005).

Biofilmu veidošanās var radīt komplikācijas pacientiem pēc kataraktas operācijām. Rossetti et al. pētījuši *S. epidermidis* biofilmas veidošanos pacientiem, kuriem pēc kataraktas ekstrakcijas bija attīstījies endoftalmīts. Pētījuma rezultāti pierādīja, ka 75% gadījumos no *S. epidermidis* celmiem, kas izolēti no pacientiem, kuriem ir endoftalmīts, tika noteikti potenciālie virulences marķieri, gēni *icaA* un *icaD*, kas ir būtiski nepieciešami stabilas biofilmas veidošanās procesos.

Pēdējā laika mikrobioloģiskie pētījumi pierādījuši, ka viens no galvenajiem adhēzijas un virulences faktoriem ir *icaADBC* operona klātesamība baktērijās. Arī promocijas darba pētījumos, lietojot *icaA(+)* *S. epidermidis* suspensiju, baktēriju adhēzijas spējas kontaktlēcās bija izteikti augstākas. Mikroskopiski izpētot *S. epidermidis* adhēziju uz kontaktlēcu virsmas, netika konstatēta biofilma kā mikroorganismu monoslānis, bet gan tika atrastas atsevišķas *S. epidermidis* kolonijas.

Pētījumā tika pierādīts, ka *S. epidermidis* adhēzija uz virsmas notiek, kā arī notiek baktēriju vairošanās, jo nebija vērojamas atsevišķas baktērijas, bet gan to kolonijas. Iemesls tam, ka netika novērota baktēriju izveidotā biofilma, varētu būt pārāk īss novērojumu laiks, lai *S. epidermidis* baktērijas spētu izveidot biofilmu. Citu autoru pētījumos tiek norādīts, ka biofilmu neveidošanās ir saistīta ar limitētām barības vielām fizioloģiskajā fosfātu buferšķīdumā, kurš tika izmantots pētījumā. Mazs uzturvielu daudzums var samazināt *S. epidermidis* dzīvotspēju, jo īpaši, ja baktērijas inkubē ilgāku periodu. Arī Henriques et al. pētījumos aprakstīts, ka par mikroorganismu suspensijas pamatsastāvdaļu labāk ir izmantot mākslīgās asaras (Henriques et al., 2005).

Dutta et al. pētījumos pierādīts, ka laiks, kas nepieciešams neatgriezeniskai baktēriju adherencei un sekojošai biofilmu veidošanai uz kontaktlēcu virsmas, ir būtisks faktors, kas dažādām baktēriju sugām var atšķirties. *S. epidermidis* adhēzija mīkstajās kontaktlēcās mēdz būt salīdzinoši lēna un biofilmu veidošanās notiek ilgāk par 16–24h. Vairākos pētījumos aprakstīts, ka *S.epidermidis* vislabāk adherējas *Lotrafilcon B* materiālā, salīdzinot ar pārējiem eksperimentā izmantotajiem materiāliem (*Etafilcon A*, *Galyfilcon A*, *Enfilcon A*, *Senofilcon*). Vismazākā adhēzijas spēja novērota *Etafilcon A* materiālā. Lietotu kontaktlēcu gadījumā adherence ar *S.epidermidis* baktērijām palielinās, un tas skaidrojams ar depozītu veidošanos, lietoto kontaktlēcu virsmā (Dutta et al., 2012, Kumar et al., 2014).

Kontaktlēcas kā biomateriāls ir lielisks modelis, ar kuru var strādāt dažādos zinātniskajos pētījumos, kas ir saistīti ar baktēriju adherence izpēti. Neviena no medicīnā izmantotajām ierīcēm nav tik vienkārši lietojama kā kontaktlēcas, tas paver lielas iespējas virulences faktoru pētījumiem *in vitro* vidē.

Stafilokoku izraisīto infekciju ārstēšanu apgrūtina arvien pieaugošā rezistence pret beta laktāmiem un citiem antibakteriālajiem līdzekļiem. KONS infekciju ārstēšanai lieto pretbetalaktamāžu penicilīnus, piemēram, oksacilīnu un nafcilīnu, kā arī pirmās paaudzes cefalosporīnus (cefazolīns) vai trimetoprimu-sulfometaksazolu. Kotrimoksazols, linkozamīdi, makrolīdi, tetraciklīni, un fluorhinoloni ir alternatīvi līdzekļi, galvenokārt cilvēkiem kuriem ir alerģija pret beta-laktāmiem. MRSE un arī citu meticilīna rezistentu KONS izraisīto infekciju terapijā lieto vankomicīnu, daptomicīnu vai linezolīdu, kas ir ievērojami dārgāki preparāti, kā arī iespējamās nopietnas blakusparādības (Paradisi et al., 2001, Tang et al., 2014,).

Pētījumos par stafilokoku rezistenci pret antibakteriālajiem līdzekļiem tiek aprakstīts, ka apmēram 80% - 97% nozokomiālo *S.epidermidis* izolātu ir rezistenti pret meticilīnu un ir arī multirezistenti (Stewart and Costerton, 2001, Claessens et al., 2015).

Epidemioloģiskajos pētījumos, kas veikti Igaunijā 2009. gadā, par nozokomiālajām bakterēmijām, secināts, ka 86% no izdalītajiem un identificētajiem stafilokokiem ir (MRSE), tātad rezistenti pret klasiskajiem beta laktāmu antibakteriālajiem līdzekļiem (Mitt et al., 2009).

Latvijā pēdējos gados arvien pieaug KONS rezistence pret meticilīnu. Klīniskajos *S.epidermidis* izolātos tā ir noteikta 97,5% gadījumu 2012. gadā, salīdzinot ar 60-80% gadījumu 2004. gadā (Žileviča un Tračevska, 2012).

Promocijas darba pētījuma ietvaros, nosakot jutību pret meticilīnu konstatēts, ka identificētie *S.epidermidis* klīniskie celmi ir rezistenti pret meticilīnu (97,8%), kā arī tika pierādīta *mecA* klātesamība visiem šiem baktēriju izolātiem.

Līdz ar datiem par meticilīnrezistenci klīniskajos paraugos bija interesanti izpētīt, kāda ir jutība pret meticilīnu starp KONS ārpus slimnīcas jeb *S.epidermidis* izolātiem no praktiski vesela cilvēka mikrofloras. Promocijas darba pētījuma ietvaros tika noteikts, ka no veseliem cilvēkiem identificēto KONS rezistence pret meticilīnu ir samērā zemā līmenī, MRSE tika konstatēts 12,5% no visiem analizētajiem izolātiem.

Lai varētu precīzāk novērtēt šo tendenci, ir nepieciešami plašāki un ilgstošāki pētījumi veselo cilvēku grupā. Citu autoru pētījumos par meticilīnrezistentiem KONS sabiedrībā, tika aprakstīts, ka 19,2 % no izdalītajiem stafilokokiem bija rezistenti pret meticilīnu. Iespējams, ņemot vērā vispārējo pretmikrobu līdzekļu rezistences pieaugumu pasaulē, kā arī pieaugošo cilvēku migrāciju pēdējos gados, MRSE skaits turpmākajos gados tikai pieaugs.

Zinātniskajos pētījumos aprakstīts, ka papildus biofilmas veidošanai, *S.epidermidis* izolātiem raksturīga rezistence pret meticilīnu (MRSE), kā arī rezistence pret vairākiem antibakteriālajiem līdzekļiem jeb multirezistence. Rezistence pret meticilīnu ir ievērojami augstāka (81%), *S.epidermidis* izolātos, kuri veidoja biofilmas, salīdzinot ar izolātiem (57%), kuri neveidoja biofilmas (Ziebuhr et al., 2006, Tang et al. 2014, Claessens et al., 2015).

Mūsdienās plaši pielieto molekulārās tipēšanas metodes, kuru pamatā tiek analizēts ģenētiskais polimorfisms. Tas ļauj labāk izprast baktēriju evolūciju un populāciju izplatīšanos. *S. epidermidis* noteikšanai visbiežāk lieto tādas molekulārās tipēšanas metodes, kā PFGE, MLST un MRSE celmu stafilokoku hromosomālās kasetes (*SCCmec*) tipēšanu. Neskatoties uz *S.epidermidis* ģenētisko daudzveidību, ar MLST metodes palīdzību ir atklāta nozokomiālā *S. epidermidis* populācija, kuras sastāvā bija deviņi klonālie ciltskoki un šie ciltskoki ir izplatīti visā pasaulē (Miragaia et al., 2008). MLST metodi pielieto ne tikai *S. epidermidis* tipēšanai, bet arī *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* u.c. baktēriju tipēšanai. Analizējot MLST datus, var rast pierādījumus par rezistentu baktēriju celmu

rašanos un izplatību. (Miragaia et al., 2002, Cooper and Feil, 2004).

Lai izpētītu genoma mainīgumu *S. epidermidis* klīniskajiem un komensālajiem celmiem, promocijas darba pētījumu rezultātā tika iegūti MLST dati 12 *S. epidermidis* paraugiem ar dažādiem sekvenču tipiem. Kopumā tik analizēti 12 paraugi no trīs cilvēkiem. Katram paraugam pēc DNS izdalīšanas un koncentrācijas mērījumiem tika veiktas 7 PCR reakcijas un 14 sekvenēšanas reakcijas. Pēc pirmās PCR reakcijas 7 gēnu fragmenti tika analizēti ar agarozes gēla elektroforēzes metodi. Ņemot vērā to, ka pētījuma finansiālās iespējas bija ierobežotas un katram paraugam ir jāveic 14 sekvenēšanas reakcijas, lai iegūtu vienu MLST ainu jeb ST, analizēto 12 paraugu skaitu nevajadzētu uzskatīt par mazu. MLST analīzes gaitā 12 paraugi veidoja 9 dažādus ST variantus. Pēc diagrammas, salīdzinot Latvijas *S. epidermidis* celmu sekvenču tipus ar ārzemēs konstatētiem sekvenču tipiem ir redzams, ka neviens no pētījumā noteiktajiem celmiem nepieder pie ST2, kurš pasaulē ir zināms kā nozokomiālais celms.

Veicot MLST analīzi, tika noskaidrots, ka četri celmi, iegūti no vesela cilvēka dažādām ķermeņa daļām, bija ar dažādiem genotipiem: atbilstoši ST-142, ST-218, ST-179 un ST-153. No vesela cilvēka iegūtie ST218 un ST179 veido klonālo kompleksu ar ST270. Pētījuma rezultāti parāda, ka viena cilvēka ādu var kolonizēt dažādu genotipu stafilokoki, un tādējādi apstiprinās šo baktēriju ģenētiskais polimorfisms.

Pētījuma laikā tika atklāts pavisam jauns *S. epidermidis* celms ar sekvenču tipu ST483. Vienīgais izolāts no hemokultūras (invazīvais) ar ST483 nebija radniecīgs nevienai ST grupai.

Ja salīdzina *S. aureus*, kuriem klonālā dažādība rodas veidojoties punktveida mutācijām, tad *S. epidermidis* gadījumā tā veidojas galvenokārt rekombināciju rezultātā. Jāpiebilst, ka *S. epidermidis* baktērijām ir raksturīga biežāka ģenētiskā mainība, nekā *S. aureus*. Pēc neseniem pētījumiem *S. epidermidis* populācijas ģenētiskā dažādība starp dažādiem celmiem, iespējams, veidojas no ātras hromosomālās DNS evolūcijas, kas notiek gan rekombināciju, gan arī biežas *SCCmec* pārneses rezultātā (Ziebuhr et al., 2000).

Kopumā ir savākts liels datu apjoms par *S. epidermidis* celmiem, lietojot PFGE, MLST un arī *SCCmec* tipēšanas metodes, taču nav neviena pētījuma, kur būtu salīdzinātas visas šīs trīs metodes (Turner and Feil, 2007, Los et al., 2010).

MLST analīze ir vērsta uz stabila „housekeeping” genoma funkcijām, pastāv

īpaši fenotipi, kuri ietver klīniski svarīgas īpašības un biežāk tiek kodēti ar gēniem vai mobīliem elementiem, kuri populācijā var strauji izplatīties un tik pat ātri var pazust (Kozitskaya et al., 2005).

Nemot vērā, ka genoms un līdz ar to arī MLST dati ne vienmēr attaino virulences potenciālu, MLST klasteru genotipi nav salīdzināmi starp divām dažādām populācijām. Tātad, MLST ne vienmēr ir pielietojams mikroevolucionāriem pētījumiem (Chaieb et al., 2005).

Klonālo kompleksu CC2 veido aptuveni 74% no visiem *S.epidermidis* nozokomiālo infekciju izraisītājiem visā pasaulē un tas satur dominanto sekvenču tipu ST2, kurš ir identificēts trijos kontinentos un 13 dažādās valstīs. (Conlal et al., 2012). ST2 ir klonālā kompleksa CC2 dibinātājsekvenču un šī klonālā kompleksa celmos ir īpaši augsts rekombinācijas biežums, kas ir pamatā tālākai baktēriju klonu izplatībai. Vairākos pētījumos ir aprakstīts, ka *S.epidermidis* celmi ar ST27 atbilst ST2. Izmantojot MLST shēmu, *S.epidermidis* ST2 celmi ir konstatēti dažādos ģeogrāfiskajos reģionos, kas liecina par to, ka šie baktēriju celmi evolucionāri ir ļoti veiksmīgi un ātri spēj izplatīties pasaulē (Schoenfelder et al., 2010, Widerström et al., 2012).

Promocijas darba pētījumā netika atrasts nozokomiālais sekvenču tips ST2, bet dominējošais sekvenču tips bija ST130. No veselā cilvēka iegūtie dažādie sekvenču tipi liecina par *S.epidermidis* baktēriju polimorfo raksturu. Savukārt ITN pacientam identificētajos *S.epidermidis* izolātos, kuri paņemti sestajā ārstēšanās dienā tika atklāti trīs celmi ar vienādu sekvenču tipu ST130. Interesanti, ka pirmajā dienā iegūtais celms ar ST130 uzrādīja jutību pret visiem antibakteriālajiem līdzekļiem, savukārt sestajā dienā izolāts ar ST130 uzrādīja rezistenci pret vairāku testēto antibakteriālo līdzekļu. Tātad dažu dienu laikā šis baktēriju celms ir kļuvis polirezistents un antibakteriālā jutība tika konstatēta tikai pret vankomicīnu. Tas liecina par *S.epidermidis* fenotipisko un genotipisko mainību, ar kuru palīdzību baktērijas var labi pielāgoties mainīgajiem ārējiem apstākļiem. Pacientam ar laboratoriski apstiprinātu bakterēmiju, iegūtie rezultāti liecina par infekciju, kas nav bijusi saistīta ar katetru lietošanu, jo izdalītie un noteiktie *S.epidermidis* izolāti ir ar ST130 un ST483, kas ir atšķirīgi sekvenču tipi.

Pēc antibiogrammu datiem, pacientam, kurš atradās ITN 6. dienā izolāts ar ST 130 uzrādīja rezistenci pret visiem pētījumā izmantotajiem antibakteriālajiem

līdzekļiem, izņemot vankomicīnu. Šādā gadījumā pacientam būtu jāpiemeklē antibakteriālie līdzekļi, kuriem ir jāveic antibakteriālās jutības noteikšana mikrobioloģiskajā laboratorijā, un visbiežāk šādas situācijas gadījumā paildzinās pacienta hospitalizācijas laiks un palielinās arī ārstēšanās izmaksas. Turklāt ir augsts risks izplatīt rezistentās baktērijas ārpus slimnīcas, kā arī palielinās iespēja iegūt patogēnus mikroorganismus ar iepriekš nenovērotām rezistences īpašībām.

Mūsdienu mikrobioloģijas pilna genoma izpētes ērā ir izstrādātas tādas tiešsaistes platformas kā *Bacterial Isolate Genome Sequence Database* (BIGSdb) kas, izmantojot 16S RNS gēnu sekvenēšanas metodi, ļauj vienlaicīgi veikt vairāk kā 500 MLST gēnu salīdzinājumu un ir iespējams analizēt gan epidemioloģiskās, gan evolucionārās saiknes starp baktērijām, sākot no domēna līdz pat celmam. Tomēr sistematizēta un standartizēta genotipisko variāciju analīze paliek kā nemainīga epidemioloģiskās izpētes vērtība (Maiden et al., 2013).

Promocijas darba ietvaros veiktais MLST metodes pielietojums ir pirmais Latvijā, kas tika izmantots *S.epidermidis* celmu tipēšanai, pirms tam Latvijā MLST tika pielietota tikai *S.aureus* tipēšanai. Veicot *S.epidermidis* MLST un izanalizējot rezultātus, var secināt, ka metode ir augsti efektīva un to lietojot, ir iespējams atšķirt dažādus baktēriju genotipus. Lai gan metode ir darbietilpīga un ir nepieciešama apmācība iegūto datu analīzei, šai metodei ir augsts potenciāls gan zinātnē, evolūcijas pētījumos, gan arī praktiskajā pielietojumā nozokomiālo infekciju izraisītāju izcelsmes noskaidrošanā.

Secinājumi

1. Dominējošā suga starp pētījumā identificētajiem KONS bija *Staphylococcus epidermidis* (71%).
2. Klīniskās grupas *Staphylococcus epidermidis* celmiem raksturīga ureāzes aktivitātes pazemināšanās.
3. Klīniskajiem *S. epidermidis* celmiem raksturīga pazemināta hemolītiskā aktivitāte (55,6%), salīdzinot ar kontroles grupas mikroorganismiem (90%).
4. Klīniskās grupas celmi biežāk ir rezistenti pret meticilīnu, noteikta *mecA* klātesamība (97,8%) izolātiem un konstatēta arī polirezistence. Meticilīnrezistence ir izpētīta un konstatēta arī veselo cilvēku grupas (12,5%) izolātiem, kas iezīmē tendenci rezistences izplatībai sabiedrībā.
5. Biofilmu veidošana *in vitro* un to noteicošo gēnu *icaA/aap* klātesamība ir vairāk raksturīga klīniskajiem izolātiem, nekā kontroles grupas *S.epidermidis* izolātiem. Konstatēta statistiski nozīmīga ($p=0,002$) atšķirība starp klīnisko un kontroles *S.epidermidis* grupām, kas norāda uz šo gēnu kopu kā uz potenciāliem virulences marķieriem, nosakot tos kopā ar biofilmas veidošanas metodi mikroplatē.
6. *Staphylococcus epidermidis icaA* (+) celmu izmantošanas gadījumā adhēzijas apjoms būtiski pieaug dažādos kontaktlēcū materiālos, salīdzinot tos ar *icaA*(-) *S.epidermidis* celmiem.
7. Pētījuma ietvaros, pirmo reizi Latvijā pielietotā MLST metode *S.epidermidis* genotipēšanai, uzrādīja augstu potenciālu nozokomiālo infekciju izcelsmes noskaidrošanai. Tika atrasti 9 dažādi sekvenču tipi. Starp klīniskajiem izolātiem biežākais sekvenču tips bija ST130, netika atrasts pasaulē izplatītākais nozokomiālais sekvenču tips ST2.

Ar promocijas darbu saistīto publikāciju saraksts

1. Genotipēšana atklāj *Staphylococcus epidermidis* mainību un spēju ātri iegūt rezistenci. Tatjana Tračevska, **Iveta Līduma**, Aija Žileviča
Nodots publicēšanai, Medicīna/ Raksti LU (2016).
2. *Staphylococcus epidermidis* - biofilmu veidotāji uz acs kontaktlēcām. **Iveta Līduma**, Laura Jurka, Sergejs Isajevs, Aija Žileviča Medicīna, Raksti / Latvijas Universitāte (2015), 116-123.lpp.
3. Phenotypic and Genetic Analysis of Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Līduma, I.**, Tračevska, T., Bērs, U., Žileviča, A. (2012). „Medicina” (Kaunas) 48 (6): 305-309. (<http://medicina.kmu.lt/1206/1206-05e.pdf>)
4. Evaluation of the Expression of luxS Gene in Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis* from Bloodstream infections. Innovative journal of Medical and health Science. Tračevska, T., **Līduma I.**, Bērs U., Žileviča, A., Vol2, No4(2012). (<http://www.innovativejournal.in/index.php/ijmhs/article/view/353>)
5. Nozokomiālo koagulāzes negatīvo stafilokoku meticilīnrezistences un virulences faktoru pētījums Study of Virulence Factors and Methicillin Resistance in Nosocomial Coagulase Negative Staphylococci / **Iveta Līduma**, Tatjana Tračevska, Aija Žileviča. Lit.: 19.-20.lpp. // Medicīna Medicine. Raksti / Latvijas Universitāte ; 755.sēj., 2010. 13.-20.lpp
6. Discrimination between contaminating and commensal strains of *Staphylococcus epidermidis* (Search for phenotypic virulence criteria in *S.epidermidis*) Žileviča, A., Tračevska, T., **Līduma I.**, Viesturs, U. (2010) (http://www.clbme.bas.bg/bioautomation/2010/vol_14.3/files/14.3_02.pdf)

Darba rezultātus atspoguļojošie konferenču referāti

1. Nozokomiālo koagulāzes negatīvo stafilokoku virulences faktori un epidemioloģiskā nozīme. **Iveta Līduma** /Latvijas Medicīnas Mikrobiologu asociācijas sēde, 2016. gada marts (mutisks ziņojums).
2. *Staphylococcus aureus* rezistence pret antibakteriālajiem līdzekļiem. **Iveta Līduma**, Katrīna Gruzinska, Aija Žileviča, Tatjana Tračevska Latvijas Universitātes 73. Zinātniskās konference/ Medicīnas sekcija, 2016. (mutisks ziņojums).
3. *S.epidermidis* izolātu raksturošana, izmantojot multilokusu sekvenču tipēšanas metodi. **Iveta Līduma**, Uģis Bērs, Aija Žileviča, Tatjana Tračevska/ Latvijas Universitātes 71. Zinātniskās konference/ Medicīnas sekcija, 2013. (mutisks ziņojums).
4. Klīniski nozīmīgo baktēriju rezistence pret antibakteriālajiem līdzekļiem / **Iveta Līduma**, Tatjana Tračevska, Dzintars Ozoliņš, Aija Žileviča // Latvijas Universitātes 72. zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas / Latvijas Universitāte. Rīga, 2014. (mutisks ziņojums).
5. *Implementation of molecular techniques to determine virulence factors in staphylococci* **Iveta Liduma** Uģis Bers Tatjana Tracevska LU 70. Zinātniskās konferences Biodrošības sekcija 2012.02.03. (mutisks ziņojums).
6. Panton-Valentine leukocidīna toksīna noteikšana *Staphylococcus aureus* izolātos. **Iveta Līduma**, Uģis Bērs, Aija Žileviča, Tatjana Tračevska // Latvijas Universitātes 70. Zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums : 2012. gada 2. februārī / Latvijas Universitāte. Rīga : Latvijas Universitāte, 2012.
7. "Does methicillin resistance increase in staphylococci among healthy population of Latvia?" (**I. Liduma**, U. Bers, A. Gorbatjuka, T. Tracevska) 6-8. 09.12. Rīgā, IMM-2012 (International Medical Meeting) konference (stenda referāts).
8. Sepsis caused by coagulase negative staphylococci is associated with the aap and the icaA genes", T. Tračevska, U. Bērs, I. Līduma) 27.06.-01.07. 2010., starptautiskais simpozījs „International immunocompromised host society” Budapešta, (stenda referāts).
9. Phenotypical and genetical analysis of biofilm formation by coagulase negative staphylococci“ **I. Liduma**, T. Tracevska, U. Bers, A. Zilevica) 07.05. - 10.05.2011., 21-ais ECCMID-ICC kongress, Milāna (on-line referāts).
10. Determination between invasive and commensal coagulase negative staphylococci by luxS gene “EUROBIOFILMS 2011” kongress Kopenhāgena: 06.07.-08.07.2011., Uģis Bērs **I. Līduma**, T. Tračevska (stenda referāts).

11. Combination of a microtiter plate method with the amplification of the icaA/aap genes is an effective tool to determine biofilm formation in Staphylococcus epidermidis isolates from Latvian patients” Baltijas laboratorās medicīnas kongresā , Viļņā, Lietuvā: **I. Liduma**, U. Bers, A. Gorbatjuka, A. Zilevica, T. Tracevska (10-12.04.12 11. (stenda referāts).
12. Interaction between LuxS expression and ica operon involved in biofilm formation by Staphylococcus epidermidis" (T.Tračevska, **I.Liduma**, U.Bērs, A.Žileviča) 1.09.-3.09.2010.,Vinčesterā "Biofilms 4" ESCMID un *Biomerieux* starptautiskā konference (stenda referāts).
13. Differentiation between contaminating and invasive strains of coagulase negative staphylococci” **Liduma**, Tračevska, Bērs, 16.09.-18.09.2010., 8.Baltijas laboratorās medicīnas kongress, Igaunija (stenda referāts).
14. Sepsis caused by coagulase negative staphylococci is associated with the aap un icaA genes : abstracts of the 16th International Symposium on Infections in the Immunocompromised HostBudapest, Hungary, 27-30 Jun. / Tatjana Tracevska, **Iveta Liduma**, Ugis Bers, Diana Platace, Aija Zilevica // Clinical Microbiology and Infection ISSN 1198-743X. Vol.16, Suppl.3 (2010), s31-s32.

Pielikumi

LEKMI ētikas komisijas pieteikums un slēdziens

1.pielikums LU EKMI Zinātniskās izpētes
 ētikas komisijas nolikumam.
 Apstiprināts: LUEKMI ZP sēdē
 25.03.2008.

LATVIJAS UNIVERSITĀTES EKSPERIMENTĀLĀS UN KLĪNISKĀS MEDICĪNAS
 INSTITŪTA ZINĀTNISKĀS IZPĒTES ĒTIKAS KOMISIJA

PIETEIKUMS

I. PROJEKTA VADĪTĀJS

Vārds, uzvārds Tatjana Tračevska Zinātniskais grāds Dr.biol. Amats LU as.profesore
 Zinātniskās iestādes nosaukums LU Bioanalītisko un Biodozimetrisko Metožu lab-ja
 (BBML)
 Nodaļa _____ Adrese Rātsupītes iela 7, 3.korpuss, Rīga, LV- 1586
 Tālr. 67421114, mob.29191137 Fakss nav E-pasts tatjana.tracevska@lu.lv

II. PROJEKTA NOSAUKUMS

**„Kapacitātes stiprināšana starpnozaru pētījumos biodrošībā”, aktivitāte “Bioanalītisko
 markeru atlase patogēno baktēriju rezistences un virulences pētījumiem”**

III. PROJEKTA IZPILDĪTĀJI

Vārds, uzvārds Iveta Līduma Zinātniskais grāds M.sc.biol Amats pēt.asistente
 Zinātniskās iestādes nosaukums LU Bioanalītisko un Biodozimetrisko Metožu lab-ja (BBML)
 Nodaļa _____ Adrese Rātsupītes iela 7, 3.korpuss, Rīga, LV- 1586
 Tālr. 67421114 Fakss _____ E-pasts iveta.liduma@lu.lv

Vārds, uzvārds Uģis Bērs Zinātniskais grāds B.sc.Ves. zin. Farmāc. Amats pēt.asistents
 Zinātniskās iestādes nosaukums LU Bioanalītisko un Biodozimetrisko Metožu lab-ja (BBML)
 Nodaļa _____ Adrese Rātsupītes iela 7, 3.korpuss, Rīga, LV- 1586
 Tālr. 67421114 Fakss _____ E-pasts ugis.bers@lu.lv

Vārds, uzvārds Ludmila Bogdja Zinātniskais grāds _____ Amats tehniskā asistente
 Zinātniskās iestādes nosaukums LU MF Medicīnas katedra, mirobiol. lab-ja
 Nodaļa _____ Adrese Šarlotes iela, 1a. LV - 100
 Tālr. 67399291 Fakss _____ E-pasts ludpa@inbox.lv

Vārds, uzvārds Marina Samilova Zinātniskais grāds _____ Amats tehn.asistente
 Zinātniskās iestādes nosaukums LU Bioanalītisko un Biodozimetrisko Metožu lab-ja (BBML)
 Nodaļa _____ Adrese Rātsupītes iela 7, 3.korpuss, Rīga, LV- 1586
 Tālr. 67421114 Fakss _____ E-pasts marimar@inbox.lv

Vārds, uzvārds _____ Zinātniskais grāds _____ Amats _____
 Zinātniskās iestādes nosaukums _____
 Nodaļa _____ Adrese _____
 Tālr. _____ Fakss _____ E-pasts _____

IV. PROJEKTA KOPSAVILKUMS

A. PĒTĪJUMA OBJEKTI

Iezīmēt: Cilvēki __ir__, konkrētāk: veselo cilvēku un slimnīcas pacientu normālās mikrofloras (deguns/ āda / gļotādas) baktērijas, ģints *Staphylococcus*.

Dzīvnieki nav

B. PĒTĪJUMA PROTOKOLA VĒSTURE UN PAMATOJUMS (iesk. izskaidrojumu **vienkāršā, saprotamā valodā**, uzrādot zinātnisko jautājumu, kuru šis pētījuma protokols risinās).

Līdz ar antibakteriālo preparātu lietošanu pēdējos gados pieaug arī pret zāļu rezistentu mikroorganismu skaits. Gluži pretēji medicīnas sasniegumiem – ātrai infekciju diagnostikai un efektīvai pretmikrobu terapijai, parādās jauni patogēni, kas līdz šim likās cilvēkam gluži nekaitīgi. Tā, divu pēdējo gadu laikā epidermālie stafilokoki (*Staphylococcus epidermidis*) izraisa zinātnieku interesi un kļuvuši par intensīvu izpētes objektu. No vienas puses tie pieder pie cilvēka normālās mikrofloras, bet zināmos apstākļos, piemēram, cilvēkam ilgstoši uzturoties slimnīcā, var radīt nopietnas brūču infekcijas, asins saindēšanās utt. Ir zināms, ka cilvēks, ienākot slimnīcā, tiek pakļauts kolonizācijas ar t.s. slimnīcas mikrofluoru. Tas nozīmē, ka stafilokoki var nopietni apdraudēt cilvēka veselību, kļūstot par bioloģiska riska faktoru. Kāpēc vienam cilvēkam tas rada infekciju un citam nē? Kāpēc ir svarīgi neuzturēties slimnīcā ilgāk nekā tas ir nepieciešams? Kādu efektu atstāj ilgstoša antibiotiku lietošana mūsu sabiedrībā?

Pētījuma mērķis ir biodrošības kritēriju un metodoloģijas izstrāde, izveidojot virulences un rezistences marķierus Latvijā cirkulējošo baktēriju biodrošības novērtēšanai. Pētījuma aktivitātes uzdevumi ir analizēt un atlasīt bioanalītiskos marķierus, kas raksturo *Staphylococcus aureus* un *Staphylococcus epidermidis* baktēriju rezistenci pret beta-laktāmu antibiotikām un nosaka to virulenci. Mūsu pētījuma modelis paredz salīdzināt divas grupas – stafilokokus veselo cilvēku sabiedrībā ar tiem, kas izraisa infekcijas. Tomēr sabiedrība ir cieši saistīta ar slimnīcas vidi. Piemēram, ja Latvijas sabiedrībā pieaug zāļu rezistentu baktēriju nēsātāju skaits, tad, inficējoties ar šādu baktēriju, cilvēkam būs smagāki simptomi, ka arī sadārdzinās terapijas izmaksas. Ir svarīgi izpētīt rezistentu epidermālo (*Staphylococcus epidermidis*) un zeltaino – patogēno stafilokoku (*Staphylococcus aureus*) nēsāšanas procentu Latvijas sabiedrībā, kas joprojām nav zināms.

C. PĒTĪJUMA PROTOKOLA ĪSS APRAKSTS (iesk. informāciju **vienkāršā, saprotamā valodā** par metodiku un tehnoloģiju, piem., paredzamais pētījumu objektu skaits un to vecums, asins daudzums, ievadītās zāles un medikamenti, aptaujas lapas, testi utt.).

1) Protokola uzdevums ir ievākt stafilokoku *S.epidermidis* u.c. koagulāzes negatīvu stafilokoku (ģ. *Staphylococcus*) bakteriālo celmu kolekcijas un uzturēt atbilstošos apstākļos (kopā ap 300 bakteriāli celmi), no veselo cilvēku un slimnīcas pacientu normālās mikrofloras: deguna, ādas un gļotādām. Pētījumā ir iekļauti abu dzimumu pilngadīgi cilvēki. Lai izslēgtu kontamināciju ar hospitālo jeb slimnīcas mikrofluoru, pie veselo cilvēku grupas pieskaitāmi cilvēki, kas nav saistīti ar darbu klīnikā un nav bijuši hospitalizēti pēdējo divu mēnešu laikā.

Protokolā nav paredzēts izmantot zāles un medikamentus. Tiks izmantotas aptaujas lapas (1.pielikums) un piekrišanas apliecinājums mikrofloras parauga (ādas/deguna/gļotādu uztriepe) izmantošanai (2.pielikums).

Parauga ņemšanas piemērs:

Mikrofloras paraugu ņem no deguna ar sterilo vates kociņu, ievietojot to katrā nāsī un viegli rotējot gar sienīņām, tad ievieto fizioloģiskā šķīdumā, kas atrodas mēģenē. Mikrofloras uztriepi no ādas ņem ar samitrinātu sterilo vates kociņu, un ievieto transporta barotnē. Tālākas darbības, t.i. parauga apstrādi un uzņēmumu veic mikrobioloģijas laboratorijas speciālists.

2) Slimnīcas pacientam vai veselam cilvēkam tiks lūgts aizpildīt aptaujas anketu (1.pielikums) (aizpilda pats vai parauga pārnēsātājs) un parakstīt piekrišanas apliecinājumu mikrofloras parauga (ādas/deguna/ģlotādu uztriepe) izmantošanai (2.pielikums). Abos pielikumos tiks norādīts arī piešķirtais parauga šifrs, kuru turpmāk izmantos pētījumā, lai ievērotu personīgu datu aizsardzību.

3) Pētījuma eksperimentālas daļas īss apraksts: Ir paredzēts ar mikrobioloģiskām un molekulārām metodēm analizēt *S.aureus*, *S.epidermidis* un citu koagulāzes negatīvu stafilokoku potenciālos virulences un zāļu rezistences faktorus; izvērtēt sekojošos gēnus kā biofilmas veidošanas virulences marķierus *S.epidermidis* u.c. koagulāzes negatīvu stafilokoku celmiem: adhēzijas faktoru *icaA* un ar akumulēšanu saistīto *aap* gēnus; ar *real-time* PCR analizēt autoinducētājmolekulu regulējošas sistēmas *LuxS* gēna ekspresiju. Optimizēt stafilokoku genotipēšanas metodes: daudzlokusu sekvenču tipēšanas jeb MLST metodi, augšminētas metodes stafilokoku raksturošanai tiks izmantotas Latvijā pirmoreiz.

Pētījumā iekļautos koagulāzes negatīvu stafilokoku celmus analizēt ar PCR metodi uz hromosomālo rezistences kaseti *SCCmec*, kas ir visu beta-laktāmu un cefalosporīnu rezistences avots. Minētais mobīlais elements tiks detektēts kā rezistences ģenētiskais marķieris, kas tiek viegli nodots arī starp dažādām sugām. Novēroto korelāciju ar klīniskiem datiem paredzēts atspoguļot datu bāzē un publikācijās, ka arī publiskos ziņojumos.

D. PĒTĪJUMA IZPILDES TERMIŅI

Sākums - 2011. g. jūnijs

Beigas - 2011.g. 31.decembris

E. PĒTĪJUMA NORISES VIETA (-AS) LU MF Medicīnas katedra, mikrobiol. lab-ja (TOS, Šarlotes iela, 1a. LV - 100), LU Bioanalītisko un Biodozimetrisko Metožu lab-ja (BBML) Rātsupītes iela 7, 3.korpuss, Rīga, LV- 1586.

F. DAĻĒJA ATKLĀTĪBA: Ja pilna informācija pētījuma gaitā cilvēkiem kā pētniecības objektiem netiek sniegta, izskaidrot šāda protokola nepieciešamību, kā un kad objekti tiks informēti.

S.epidermidis pieder pie cilvēka ādas, ģlotādu normālas mikrofloras, tāpēc personiski paziņot rezultātu par ievāktu mikrofloru nav nepieciešams, jo tas nesniedz konkrētam cilvēkam informāciju par viņa veselības stāvokli vai ar veselību saistītiem riskiem. Ja pētījuma gaitā tiks atklāts metecilīna rezistentais *S.aureus*, kas ir epidemioloģiski svarīgs, par šī celma nēsāšanu var tikt paziņots ārstējošam ārstam.

Pētījuma objekts, šai gadījumā, cilvēks, var iegūt vispārīgu informāciju par pretmikrobu terapijas (tautā biežāk lieto terminu „antibiotikas”) lietošanas sekām, ka arī par to patēriņa samazināšanas iespējām un pētījuma rezultātiem no publiskiem semināriem, piem. ”Biodrošības pēcpusdiena”, brošūrām, populārzinātniskam un zinātniskām publikācijām un interneta mājas lapas www.biodrosiba.lv.

V. RISKI PRET IEGUVUMIEM

1. Izskaidrot būtību un riska pakāpi iespējamiem ievainojumiem, sāpēm, stresa, diskomforta, cilvēka neaizskaramības pārkāpumiem un citām blakus parādībām, kas izraisītas cilvēkiem vai dzīvniekiem protokola izpildes gaitā.

Baktēriju paraugs tiek ņemts no deguna mikrofloras, ģlotādām vai ādas ar sterilo vates kociņu, kas nav invazīva procedūra un var radīt tikai īslaicīgu diskomfortu, taču nerada stresu un sāpes.

LEKMI ētikas komisijas pieteikums un slēdziens

4

Citi, pētījumā iekļauti invazīvie stafilokoku paraugi (invazīvie: brūču, audu skalojums, likvors, asinis) tiek savākti stacionētiem cilvēkiem pēc ārsta norīkojuma; to veic medicīniskais personāls, parasti pie anestēzijas.

2. Izskaidrot veiktos pretpasākumus, lai mazinātu traumas risku un aizsargātu pētniecības objektu tiesības un labklājību.

Veselo un stacionēto (arī ambulatori izmeklējamo) pacientu grupas personas dati (personas kods, vārds, uzvārds u.c.) netiek izmantoti; pētījuma nolūkos tiek ievākti un apkopoti dati par dzimumu un vecumu, medikamentu lietošanu (skat. 1.pielikumu), diagnozi, ka arī dati par ievāktu baktēriju sugu, zāļu jutību, augstāk minētiem rezistences un virulences faktoriem; neizpaužot personas datus.

3. Izskaidrot šo pētījuma potenciālos ieguvumus (i) pētījuma objektiem, (ii) sabiedrībai un cilvēcei.

(i) Baktēriju zāļu rezistences pieaugums Latvijā skar ne tikai tās personas, kas lieto antibakteriālo terapiju, lai cīnītos ar baktēriju izraisīto infekciju, bet arī apkārtnes cilvēkus, ka arī nākamās paaudzes, sevišķi jaundzimušos un vecos cilvēkus. Pētījuma objekts, šai gadījumā, cilvēks, iegūs informāciju par antibakteriālas terapijas (antibiotiku) lietošanas sekām, ka arī par antibiotiku u.c. pretmikrobu līdzekļu patēriņa samazināšanas iespējām (publiskās uzstāšanās, piem., semināri "Biodrošības pēcpusdiena", brošūras, publikācijas, interneta mājas lapas www.biodrosiba.lv.).

(ii) Rezistentu epidermālo (*Staphylococcus epidermidis*) un zeltaino – patogēno stafilokoku (*Staphylococcus aureus*) nēsāšanas procents Latvijas sabiedrībā nav zināms, un tas ir šī pētījuma zinātniskais aspekts, jo mēs, iespējams, ieraudzīsim apmēram 50 gadu pretmikrobu terapijas atspulgu mūsu populācijā. Pētījuma praktiskais aspekts būtu izstrādāt biodrošības kritērijus, kas, cilvēkam nonākot slimnīcā uz ilgāku laiku un veicot tūlītējus drošības pasākumus, ļautu justies drošāk.

Svarīgi, ka izpētē tiks iekļauti ne tikai slimnīcu pacienti, bet arī veselie cilvēki, tātad plašāka Latvijas sabiedrība, kas uzlabos izpratni par neadekvātas pretmikrobu terapijas sekām. Turklāt, tas stimulēs zinātnes integrāciju un popularizēšanu jauniešu un pieaugušo vidū.

VI. APLIECINĀJUMS

Es, Tatjana Tračevska (vadošais pētnieks),

esmu pilnībā iepazinies (-usies) ar informāciju, kas attiecināma uz pētījumu. Es ievērošu pētījuma protokolu, Helsinku deklarāciju un uz klīniskiem pētījumiem attiecināmos Latvijas Republikā spēkā esošus likumdošanas nosacījumus. Man ir pienākums ziņot par protokola izmaiņām un klīniskā pētījuma rezultātiem kompetentām pētniecības iestādēm un komisijām.

Datums 20.06.11

Paraksts

Tatjana Tračevska (T. Tračevska)

Šo vietu aizpilda LU EKMI Zinātniskās izpētes ētikas komisija

VII. PARAKSTI

APSTIPRINĀTS

NEAPSTIPRINĀTS

Datums 22.01.2011 (Paraksts, atšifrējums)

A.J. Sīpols

/L. Plakane/

Datums 01.08.2011. Paraksts, atšifrējums

/T. Freivalds/

Direktors, LU EKMI

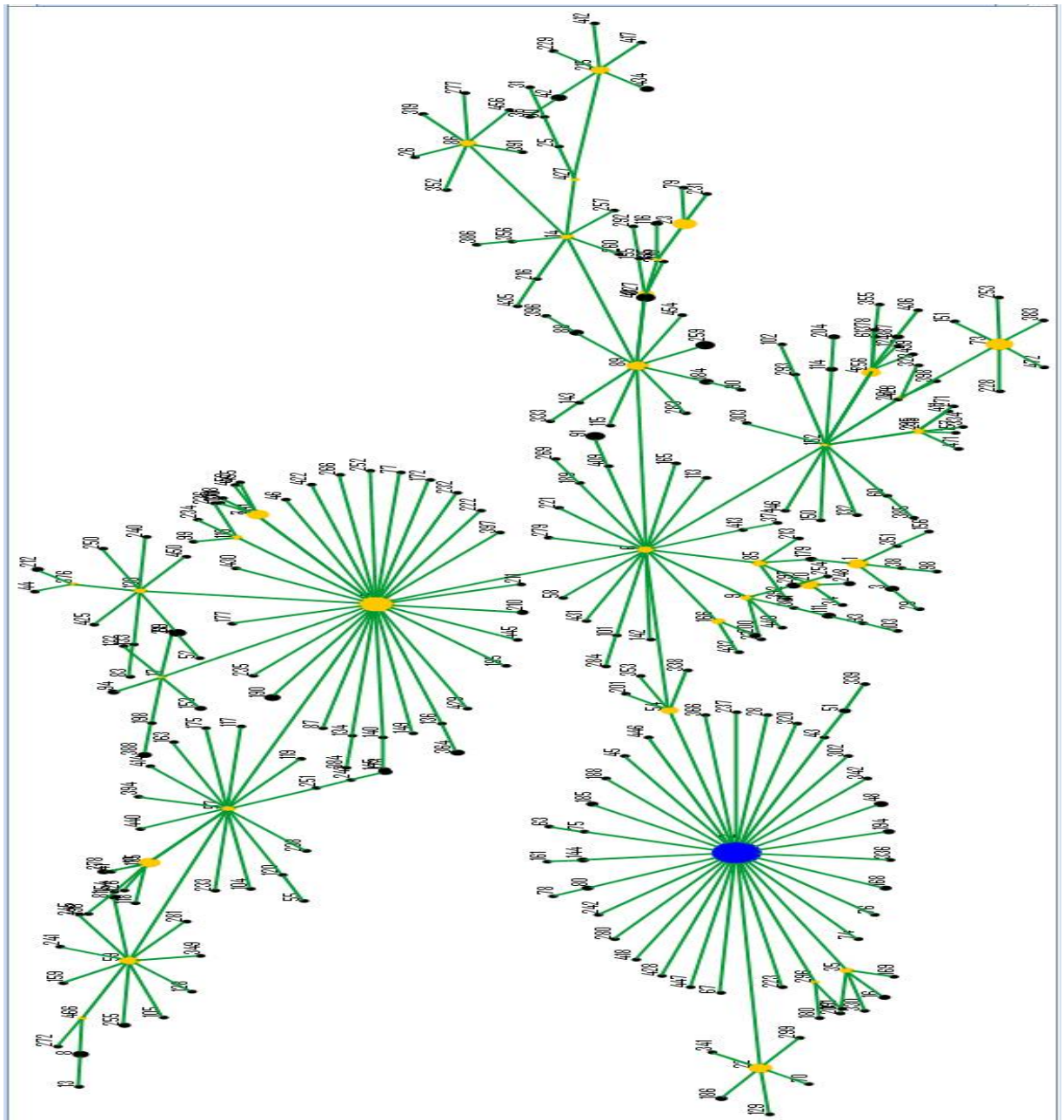


Analizēto *S. epidermidis* ST apkopojums

Celms	ST	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>gtr</i>	<i>mutS</i>	<i>pyrR</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>	Izcelsme	Komentāri	Jūtība
LAT1	142	2	1	2	2	2	1	1	Sabiedrība	Celms tiek iegūts no sievietes, kura neatrodas ves. aprūpē	MSSE; AMP,ER,CI-rezistents
LAT2	218	1	1	2	6	2	16	1	Sabiedrība	Celms tiek iegūts no sievietes, kura neatrodas ves. aprūpē	MSSE
LAT3	179	1	2	2	2	1	1	1	Sabiedrība	Celms tiek iegūts no sievietes, kura neatrodas ves. aprūpē	MSSE
LAT4	153	2	1	6	2	2	1	1	Sabiedrība	Celms tiek iegūts no sievietes, kura neatrodas ves. aprūpē	MSSE
LAT5	130	1	1	1	2	1	1	1	Invazīvs	Hemokultūra	MRSE, VAN –jutīgs
LAT6	483	2	1	1	6	1	2	1	No katetra uzsējuma	Celms iegūts no pacienta ar aizdomām par bakterēmiju	MRSE, VAN – jutīgs
LAT7	130	1	1	1	2	1	1	1	ITN- 1diena.	Celms ir iegūti pacientu ādas uzsējuma	MSSE
LAT8	130	1	1	1	2	1	1	1	ITN -6.diena	Celms ir iegūti pacientu ādas uzsējuma	MRSE
LAT9	110	1	6	1	6	2	1	1	ITN- 1diena	Celms ir iegūti pacientu ādas uzsējuma	MSSE
LAT10	110	1	6	1	6	2	1	1	ITN-3diena	Celms ir iegūti pacientu ādas uzsējuma	MSSE
LAT11	19	8	7	12	4	12	2	2	ITN-3.diena	Celms ir iegūti pacientu ādas uzsējuma	MSSE
LAT12	19	8	7	12	4	12	2	2	ITN- 6.diena	Celms ir iegūti pacientu ādas uzsējuma	MSSE

Apzīmējumi: ST –sekvences tips, CVK- centrālās vēnas katetrs, ITN- intensīvās terapijas nodaļa kolon.- kolonizējošais celms

MLST datu apstrāde ar eBURST datorprogrammu



Diagrammā ar zilo aplīti ir apzīmēts galvenais klonālā kompleksa „priekštecis”– ST2, ar dzelteni aplīti - pārējie „priekšteči” (lielākie– ST5 un ST6), ar melnu aplīti - pārējie ST. Radniecība ir apzīmēta ar zaļo līniju. Redzami šajā pētījumā noteiktie sekvenču tipi: ST 142; ST 218; ST 179; ST153; ST130 un ST 110. Pārējie ST ir citur pasaulē konstatētie sekvenču tipi. Šajā grupā nav ST19 un ST483, jo neveido ģenētisko radniecību ne ar vienu no citur noteiktajiem ST

Informācija par paraugu

Slimības vēstures numurs 12736 Nodaļas Nr. JTN

Daugavpils
(R)

**Multirezistento mikroorganismu (MrMo)
gadījuma epidemioloģiskās izmeklēšanas protokols**

1. Laboratoriskie izmeklējumi:Laboratoriskās pārbaudes rezultāts: Staphylococcus epidermidis

Parauga Nr. Laboratorijas žurnāla	Materiāla veids	Datums	
		Materiāla ņemšanas	Rezultātu sniegšanas
P. 07-09-1922	asinis iekā sterilitāti	20.07.2009.	23.07.2009.

Pēc klīniskām indikācijām ;Pēc epidemioloģiskām indikācijām **2. PACIENTA DATI**

Personas vārds _____ uzvārds _____

Personas kods: 164482Slimnieka vecums: 26 gDzimums V S

Pacienta kustība slimnīcā:

Pacienta iestāšanās datums nodaļā	Nodaļas profils
<u>16.04.2009</u>	<u>Intensīvas terapijas nodaļa</u>

Izrakstīšanās datums no slimnīcas:

Iznākums:

Izrakstīts Pāvests Exitus letālis

Mikroorganisma iegūšanas vieta:

Sabiedrībā iegūts Nozokomiāls Pāvests no citas slimnīcas Neskaidrs

Infekcija, kuru izraisījis MrMo:

Pneimonija Ķirurģiska brūces infekcija Urīnceļu infekcija Ar katetru saistīta infekcija

Cita infekcija _____

3. Riska faktori

Kontakts ar citu pacientu ar MrMo:

Jā Nē

Antibiotiku lietošana pirms materiāla ņemšanas:

Jā Nē

Iepriekšēja hospitalizācija:

Jā Nē CVK Nieru mazspēja un dialīze Enterāla barošana MPV Transplantācija Cukura diabēts ITN Audzēji Nedzīstošas čūlas Urīnkatetrs

Protokola aizpildītājs:

FV290109

Ludmila Savone - SIA DRŠ mikrob. lab. vadītāja
Jolanta Malina - SIA DRŠ hig.ārste, epidemioloģe

1. Pielikums

Pacienta anketa

Piešķirtais parauga šifrs (tas jānorāda arī piekrišanas apliecinājumā 2. pielikumā) _____

Paraugs: āda/ deguna gļotāda

1. Pacienta stacionēšanas datums un laiks _____
2. Dzimums (pasvītrot): vīrietis/ sieviete
3. Vecums.....
4. Pretmikrobu (antibiotiku) līdzekļu lietošana pašlaik – (pasvītrot) jā/ nē; kādu.....
5. Centrālās vēnas (CV) katetra ievadīšanas datums un laiks _____
6. Centrālās vēnas (CV) katetra veids _____

Paldies par līdzdalību!

Vesela cilvēka anketa

Piešķirtais parauga šifrs (tas jānorāda arī piekrišanas apliecinājumā 2. pielikumā) _____

Paraugs: āda/ deguna gļotāda

1. Dzimums (pasvītrot): vīrietis/ sieviete
2. Vecums.....
3. Pretmikrobu (antibiotiku) līdzekļu lietošana pašlaik – (pasvītrot) jā/ nē; kādu.....
4. Pretmikrobu (antibiotiku) līdzekļu lietošana pēdējo 2 mēnešu laikā – (pasvītrot) jā/ ne
5. Vai ir bijis(-usi) hospitalizēts(-a) pēdējo 2 mēnešu laikā – (pasvītrot) jā/ nē
6. Vai ir ilgstošs kontakts ar slimiem cilvēkiem (strādā stacionārā) – (pasvītrot) jā/ nē

Paldies par līdzdalību!

Literatūras saraksts

1. Anselmino M. et al. Bacteriology of infected extracted pacemaker and ICD leads. *J Cardiovasc Med*, 2009, Vol. 10, N 9, p. 693-8.
2. Arciola C. R., Campoccia D., Speziale P., Montanaro L., Costerton J. W. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 2012 September; 33(26) 5967-5982.
3. Arciola C. R., Campoccia, D., Gamberini S., Rizzi S., Baldassari L., Montanaro L. Search for the insertion element IS256 within the *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates collected from biomaterial-associated infections. *Biomaterials*, 2004. Vol. 25, N 18, p. 4117–4125.
4. Balode A. Meticilīnrezistentā *Staphylococcus aureus* molekulāri bioloģiskās īpatnības daudzprofila stacionārā ārstētiem pacientiem Latvijā. Promocijas darbs, RSU, 2011.
5. Bannerman, L. T., Peacock, S. J. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci. In: *The Manual of clinical microbiology* (9th Edition). ASM Press, 2004, p. 390-405.
6. Barbier F., Ruppe, E., Hernandez D., et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2010; 202(2): 270-281
7. Barros E., Ceotto H., Bastos M. *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, N 1, vol. 50, p. 166-168.
8. Bouza E. Intravascular catheter-related infections: a growing problem, the search for better solution. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(5): 255.
9. Carmen, J., Roeder, B., Nelson, J. Ultrasonically enhanced vancomycin activity against *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vivo. *Journal of biomaterials applications*, 2004, N 4, vol. 18, p. 237-45.
10. Casey A., Worthington, T. Caddick, J. et al. RAPD for the typing of coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infection. *Journal of Infections*, 2006, N 4, vol. 52, p. 282- 289.

11. CDC, Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections, 2011, 1-83 (apsskat 17.12.2013)
<http://www.cdc.gov/hicpac/bsi/bsi-guidelines-2011.html>
12. Cerca N., Pier G.B., Vilanova M., Oliveira R., Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*, *Research in Microbiology*, 2005, Vol. 156, p. 506 – 514
13. Chaieb, K., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infections*, 2005, N 3, vol. 61, p. 225-230.
14. Cheung, G. Y. C., Rigby, K., Wang, R., Queck, S. Y., Braughton, K. R., Whitney, A. R., Teintze, M., DeLeo, F. R., Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* Strategies to Avoid Killing by Human Neutrophils. *PloS Pathogens*, 2010 October; 6(10): 1-10.
15. Costa S.F., Miceli M.H., Anaissie E.J.. Mucosa or skin as source of coagulase-negative staphylococcal bacteraemia? *Lancet Infect. Dis.*, 4 (2004), pp. 278–286
16. Christensen G, Baddour L and Simpson W. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. *J.Infect Immun* 1987; 55: 2870–2877.
17. Chu VH, Woods CW, Miro JM, et al. Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clin Infect Dis* 2008 Jan 15;46(2):232-42.
18. Claessens, J., Roriza, M., Merckx, R., Baatsen, P., Mellaert, L., Eldere, J. Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2015 April; 45(4): 368-375.
19. Cooper, J., Feil, E. Multilocus sequence typing- what is resolved? *TRENDS in Microbiology*, 2004, N 8, vol. 12, 373-7.
20. Conlon K.M. Humphreys H. and O’Gara J.P. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*, *J Bacteriol* 186 (2004), pp. 6208–6219.
21. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, N5418, Vol.284, p.1318-1322.
22. Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I. and Penades J.R., Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation, *J*

Bacteriol 183 (2001), p. 2888–2896.

23. David, M., Daum, R. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, N 3, vol. 23, p. 616-687.
24. Deplano, A. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European Study Group on Epidemiological Markers of the ESCMID. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, N 10, vol. 38, p. 3527-3533.
25. Donlan R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. (2001) *Healthcare Epidemiology*, 33, 1387–1389
26. Dumpis U., Balode A., Vīgante D., Narbutė I., Valinteliene R., Pīrāgs V., Martinsons A., Vingre I. Prevalence of nosocomial infections in two Latvian hospitals. *Eurosurveillance*, 2003, N 3, vol. 8, p. 405-411
27. Dutta D., Cole N., Willcox M., Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses, *Molecular vision*, 2012, Vol. 18, p.14 – 21
28. ECDC, The European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2013, pieejams: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Healthcareassociated_infections/pages/index.aspx. (skatīts 12.10.2013)
29. Eiff C., Peters, G., Heilmann, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative *Staphylococci*. *Lancet Infectious Diseases*, 2002 November, 2(11): 677–685.
30. Eftekhari F, Mirmohamadi Z. Evaluation of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from nosocomial infections and skin of healthy volunteers. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 2009;10:438-441
31. Elder M.J., Stapleton F., Evans E., Dart J.K.G. Biofilm – related infections in ophthalmology, *Royal College of Ophthalmologists*, 2001, Vol.9 N 3, p. 102-109
32. Filho, R. G. S., Silva, A. A. L., Saramago, C. S. M., Bento, C. A. M., Souza, I. S., Souza, M. J., Carvalho K. R., Bôas, M. H. S. V. Biofilm production by clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its relationship with genotypic profile, presence of virulence-related genes and antibiotic resistance. *African Journal of Microbiology Research*, 2015, April; 9(14): 1026-1036.
33. Finch R. G. Coagulase negative staphylococci. In: *Principles and Practice of Clinical bacteriology* 1997, Edited by A. M. Emmerson. John Wiley, England, 132–142.

34. Fitzpatrick F., Humphreys H., O'Gase J. P. The genetics of staphylococcal biofilm formation., *J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.* 2005, 11, 967–973.
35. Frebourg N.B., Lefebvre S., Baert S. and Lemeland J.F., PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains, *J Clin Microbiol.* 2000, 38 , p. 877–880.
36. Gad, G. F. M., Feky, M. A., Rehewy, M. S., Hassan, M. A., Abolella, H., Baky, R. M. A. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2009 June; 3(5): 342-351.
37. Galdbart J.O., Allignet J., Tung H.S., Ryden C. and El Solh N., Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses, *J Infect Dis* 182 (2000), 351–355.
38. Garcia P, Benitez R, Lam M, et al. Coagulase-negative staphylococci: clinical, microbiological and molecular features to predict true bacteraemia. *J Med Microbiol*, 2004 Jan;53(Pt 1):67-72.
39. Gemmell, C. G., Lang, S. Chapter 43 - Coagulase negative staphylococci and their role in infection. In: *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, Glasgow, UK. 2015, p. 793–810.
40. Gillespie, S. H., Hawkey, P. M. *Principles and practice of clinical bacteriology second edition*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006. p.604
41. Gordon, R., Miragaia, M., Weinberg, A. et al. *Staphylococcus epidermidis* Colonization Is Highly Clonal Across US Cardiac Centers. *Journal of Infectious Diseases*, 2012, N 9, vol. 205, 1391-1398.
42. Götz, F., Perconti, S., Popella, P., Werner, R., Schlag, M. Epidermin and gallidermin: Staphylococcal lantibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014 January; 304(1): 63-71.
43. Hall-Stoodley L., Costerton J.W. and Stoodley P., Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nat Rev Microbiol* 2 (2004), 95–108.
44. Hartman B.J., Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta lactam resistance in *Staphylococcus aureus* . *J.Bacteriology*, 1984, Vol.158, p. 513-516.
45. Havaei, S. A., Namvar, A. E., Moghim, S., Lari, A. R., Akbari, M. Phenotypic and Genotypic Detection of *Staphylococcus epidermidis* Delta Toxin from Neonatal Patients in Isfahan and Tehran University Hospitals. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2014 July; 29(3): 139-143.

46. Heilmann C., Schweitzer O., Gerke C., Vanittanakom N., Mack D. and Gotz F., Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*, *Mol Microbiol* 20 ,1996, pp. 1083–1091.
47. Heilmann C., Hussain M, Peters G and GotzF., Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface, *Mol Microbiol* 24 (1997), pp. 1013–1024
48. Heilmann C., Thumm G, Chhatwal G.S., Hartleib J., Uekotter A. and Peter G., Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*, *Microbiology* Vol. 149 , 2003, pp. 2769–2778.
49. Hellmark, B., Unemo, M., Augustinsson, A., N., Söderquist, B. Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the *rpoB* gene. *Clinical Microbiology and Infection*, 2009; 15(3): 238-244.
50. Henriques M, Sousa C., Lira M., Elisabete M., Olivera R. Olivera R., Azeredi J. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* to Silicone–Hydrogel Contact Lenses, *Optometry and vision science*, 2005. Vol. 82 N 6, p. 446-450
51. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 Nov;29(11):996-1011.
52. Hussain M., Heilmann C., Peters G. and Herrmann M., Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin, *Microb Pathog* 31 (2001), pp. 261–270.
53. Feil, E., Li, B., Aanensen, D., Hanage, W. eBURST: Interfering Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*, 2004, N 5, vol. 186, p. 1518-1530.
54. Fey P.D., Olson M.E., Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, *Future Microbiology*, 2010, Vol 5, N 6, p. 917 – 933
55. Fitzpatrick F; Humphreys H; Smyth E; Kennedy C A; O'Gara J P. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of hospital infection* (2002) 52(3):212-8.

56. Fitzpatrick F., Humphreys H. and O’Gara J.P., Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*, *J Med Microbiol* 54, 2005, 509–510.
57. Frebourg N.B., Lefebvre S., Baert S. and Lemeland J.F., PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains, *J Clin Microbiol* 38 (2000), 877–880.
58. Ibrahim S, Salmenlinna S, Lyytikainen O, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients. *Clin Microbiol Infect* 2008 Nov;14(11):1020-7.
59. Ingraham, J. L., Ingraham, C. A. *Introduction to Microbiology*. California: Wadsworth Publishing Company, 1995, 752 p.
60. John J.F., Harvin A.M., History and evolution of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci: Susceptibility profiles of new anti-staphylococcal agents, *Therapeutic and Clinical Risk Management* 3(6)(2007), pp. 1143-1152
61. Jain, A., Agarwal, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiological Methods*, 2009 January; 76(1): 88-92.
62. Kaplan J. B. et al. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 2004. Vol. 48, N 7, p. 2633-6.
63. Keersmaecker S, Sonck K and Vanderleyden J. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends Microbiol* 2006; 143: 114-9.
64. King, M., Humphrey, B., Wang, Y. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections. *Annals of internal Medicine*, 2006, N 5, vol. 144, p. 309-17.
65. Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1975 Jan;1(1):82-8.
66. Klotz S.A., Penn Ch. C., Negvesky G. J., Butrus S. I. Fungal and Parasitic Infections of the Eye, *Clinical Microbiology Reviews*, ASM News, 2000, Vol. 13, N 4 p.668
67. Kong K. F., Vuong C., Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2006, 296, 133–139.
68. Knobloch J.K., Horstkotte M.A., Rohde H., Kaulfers P.M. and Mack D., Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of

Staphylococcus epidermidis, J Antimicrob Chemother 49 (2002), p. 683-687

69. Knobloch, K. M. J., Jager, S., Horstkotte, A. M., Rohde, H., Mack, D. RsbU-Dependent Regulation of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation Is Mediated via the Alternative Sigma Factor σ^B by Repression of the Negative Regulator Gene *icaR*. *Infection and Immunity*, 2004, N 7, vol. 72, p. 3838-3848.
70. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infections *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 296, 3, : 57-170.
71. Kozitskaya S., Cho S.H., Dietrich K., Marre R., Naber K. and Ziebuhr W., The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides, *Infect Immun* 72, 2004, p. 1210–1215.
72. Kozitskaya S., Olson M.E., Fey P.D., Witte W., Ohlsen K.J. and Ziebuhr W., Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing, *J Clin Microbiol* 43 2005, p. 4751–4757.
73. Kumar A, Hua Z., Jermome O., Duoqia W., Simin M., Rani B, Willcox M. *Bacterial adhesion to unworn and worn silicone hydrogel lenses*, *Optometry and Vision Science*, 2012, Vol. 89, N. 8, pp. 1095-1106.
74. Labischinski H. Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Med Microbiol Immunol*. 1992;181:241–265.
75. La Plante, K., Mermel, L. In Vitro Activities of Telavancin and Vancomycin against Biofilm-Producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, and *Enterococcus faecalis* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, N 7, vol. 53, p. 3166-3169.
76. Lasa I. and Penades J.R., Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation, *Res Microbiol* 157 (2006), pp. 99–107
77. Laverty G., Gorman, S. P., Gilmore, B. F. Chapter 2 - Biofilms and implant-associated infections. In: *Biomaterials and Medical Device-associated Infections*. Woodhead publishing, Belfast, UK. (2015), p. 19-45.
78. Li W., Raoult, D. Fournier P. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Review*, 2009, N 5, vol. 33, p. 892-916
79. Lim S.M. and Webb S.A., Nosocomial bacterial infections in Intensive Care Units. I. Organisms and mechanisms of antibiotic resistance, *Anaesthesia* 60 (2005), pp. 887–902

80. Liu, H., Zhao, Y., Zhao, D., Gong, T., Wu, Y., Han, H., Xu, T., Pesche, A., Han, S., Qu, D. Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains. *Emerging Microbes & Infections*, 2015 January; 4(1): 1
81. Lourdes M., Sinzato Y. K., Silveira L. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2004, 99(8), p.855–860.
82. Los R., Sawicki, R., Juda, M., Stankevic, M., Rybojad, P., Sawicki, M., Malm A., Ginalska, G. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiology Lett*, 2010 September; 310(2): 97-103.
83. Mack D., Fischer W. and Krokotsch A. et al., The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis, *J Bacteriol* 178, 1996, pp. 175–183
84. Mack D., Sabottne A., Dobinsky S., Rohde H., Horstkotte M. A., Knobloch J. K. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm-negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes. *Antimicrob. Agents and Chemother*, 2002, 46, 1, 178–183.
85. Mack D., Rohde h., Harris L. G., davies A. P., Horstkotte M. A., Knobloch J. K. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int. J. Artif. Organs*, 2006, 29, 343-359
86. Mack D., Davies, A. P., Harris, L. G., Rohde, H., Horstkotte, M. A., Knobloch, J.K.M. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical & Bioanalytical chemistry Journal*, 2007; 387: 399-408.
87. Madigan, T. M., Martinko, J. M. *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2006. p.992
88. Maiden M., M. Jansen van Resnburg, J. Bray et al., “MLST Revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics,” *Nature Reviews Microbiology*, 2013, vol. 11, pp. 728–736.
89. Martinez JA, Pozo L, Almela M, et al. Microbial and clinical determinants of time-to-positivity in patients with bacteraemia. *Clin Microbiol Infect* 2007 Jul;13(7):709-16.
90. Maureen T, McCann, Brendan F, Gilmore, Sean P. Gorman *Staphylococcus epidermidis* device related infections: pathogenesis and clinical management. *JPP* 2008; 60,12:1551-1571
91. McCarty, S., Jones, E. M., Finnegan, S., Woods, E., Cochrane, C. A., Percival, S. L. Chapter eighteen - Wound Infection and Biofilms. In: *Biofilms in*

Infection Prevention and Control: A Healthcare Handbook. Academic Press, San Diego, 2014, p.339-358.

92. McCrea K.W., Hartford O. and Davis S. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*, *Microbiology* 146 (2000), pp. 1535–1546.
93. Mermel LA, Allon M, Bouza E, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009 Jul 1;49(1):1-45.
94. Melnbārde- Kelmere, A., Dimiņa, E., Dumpis, U. Roku higiēnas novērojumi Intensīvās terapijas nodaļā – intervences rādītāji. Latvijas Universitātes Raksti. Medicīna. 773. sējums. Latvijas Universitāte, 2011. 7-13 lpp.
95. Min L, Villaruz AE, VadyvalooV, Sturdevant D, Otto M. AI-2-dependent gene regulation in *Staphylococcus epidermidis*. *BMC Microbiology* 2008; 8-4.
96. Miragaia M, Couto I, Pereira SF, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *J Clin Microbiol* , 2002 Feb;40(2):430-438.
97. Miragaia, M., Carrico, J., Thomas, C. et al. Comparison of Molecular Typing Methods for Characterization of *Staphylococcus epidermidis*: Proposal for Clone Definition. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, N 1, vol. 46, p. 118-129.
98. Mitt P, Adamson V., Loivukene K., Lang K., Telling K, Paro K., Room A., Naaber P., Maimets M. Epidemiology of nosocomial bloodstream infections in Estonia. *Journal of Hospital Infection*, 2009, 71, 65-370.
99. Monk, A., Archer, G. Use of outer surface protein repeat regions for improved genotyping of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, N3, vol. 45, p. 730-735.
100. Monsen T, Karlsson C, Wistrom J. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005 Jan;26(1):76-80
101. Nayak, N., Satpathy, G., Nag, H. L., Venkatesh, P., Ramakrishnan, S., Nag, T. C., Prasad, S. Slime production is essential for the adherence of *Staphylococcus epidermidis* in implant-related infections. *Journal of Hospital Infection*, 2011 February; 77(2): 153-156
102. Ninin E, Caroff N, Espaze E, Marailac J, Lepelletier D, Milpied N, Richet H Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus*

epidermidis isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clin. Microbial Infect* 2006;12: 446-52.

103. Okee M. S.. Prevalence of virulence determinants in *Staphylococcus epidermidis* from ICU patients in Kampala, Uganda. *J Infect Dev Ctries.*, 2012. Vol. 6, N 3, p. 242-50.
104. O’Gara P.J., Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications *Journ. Med. Microbiol.* (2001) Vol. 50 p. 582-587.
105. O’Gara, P.J. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Lett*, 2007 May; 270: 179-188.
106. Osato M. *Ocular Infection and Immunity*. Mosby-Year Book Inc., 2010, pp. 183-191.
107. Otto, M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in Bioscience*, 2004; 9(1): 841-863
108. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* – the ”accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 2009 August, 7(8): 555–567.
109. Otto, M. Coagulase- Negative *Staphylococci* as reservoirs of genes facilitating MRSA infections. *Bioessays*, 2013, N 1, vol. 35, p. 1-4.
110. Peerayeh, S. N., Moghadas, A. J., Behmanesh, M. Antibiotic Susceptibility and *mecA* Frequency in *Staphylococcus epidermidis*, Isolated From Intensive Care Unit Patients. *Jundishapur journal of microbiology*, 2014 August; 7(8): 1-4.
111. Peters G, Locci R, Pulverer G, Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J.Infect. Dis* 1992;146: 479-482
112. Piette, A., Verschraegen, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*, 2009 February 16; 134(1-2): 4.
113. Prescott, M., Harley, J. P., Klein, D. A. *Microbiology*. USA: The McGraw-Hill Companies, 1999. 962 p.
114. Presterl, E., Suchomel, M., Eder, M. *et al.* Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, vol. 60, p. 417-420. .
115. Pourmand M., Abdossamadi Z., Salari M.H., Hosseini M. Slime layer formation and the prevalence of *mecA* and *aap* genes in *Staphylococcus epidermidis* isolates. *J Infect Dev Ctries*. 2011. Vol. 5, N 1, p. 34-40.

116. Raad I, Hanna H, Maki D. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis* 2007 Oct;7(10):645-57.
117. Rogers K.L., Rupp M.E, and Fey P.D. The Presence of icaADBC Is Detrimental to Colonization of Human Skin by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl Environ.Microb.* 2008, October; 74(19): 6155–6157.
118. Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Mack D. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol*; 2004, 42 (12): 5614-9.
119. Rohde H., Burdelski, C., Bartscht, K. et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.*, 2005, vol. 55, 1883–1895.
120. Rohde H, Mack D, Christner M, Burdelski C, Franke G, Knobloch JK. Pathogenesis of staphylococcal device related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev. Med. Microbiol* 2006;17: 45–54
121. Rossetti S., Alessandro L., Pellegrino F., Carrasco M.A. The effect of ketorolac on biofilm of *Staphylococcus epidermidis* isolated from post-cataract endophthalmitis, Springer, 2012, 89 – 93 p.
122. Sadykov M. R., Olson, M. E., Halouska, S., Zhu, Y., Fey, P. D., Powers, R., Somerville, G. A. Tricarboxylic acid Cycle-Dependent Regulation of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular adhesion Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 2008, N 23, vol. 190, p. 7621-7632.
123. Sadvovskaya I., Vinogradov E., Flahaut S., Kogan G. and Jabbouri S., Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A, *Infect Immun* 73,2005, 3007–3017.
124. Stevens N.T., Tharmabala M., Dillane T., Greene C.M., O.Gara J.P). Biofilm and the role of the *ica* operon and *aap* in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. *J. Clin. Microb. Inf. Dis.*, (2008), 14, 716-730.
125. Stewart P.S.and Costerton J.W., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet* 358, 2001, 135–138.
126. Schoenfelder, S. M. K., Lange, C., Eckart, M., Hennig, S., Kozytska, S., Ziebuhr, W. Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establis-

hes as a nosocomial pathogen. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010 August; 300(6): 380–386.

127. Sloos JH, Horrevorts AM, Van Boven CP, et al. Identification of multiresistant *Staphylococcus epidermidis* in neonates of a secondary care hospital using pulsed field gel electrophoresis and quantitative antibiogram typing. *J Clin Pathol* 1998 Jan;51(1):62-67.
128. Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, et al. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol* 2000 Jul;38(7):2488-2498
129. Suleman, L., Archer, D., Cochrane, C. A., Percival, S. L. Chapter ten Healthcare-Associated Infections and Biofilms. In: *Biofilms in Infection Prevention and Control: A Healthcare Handbook*. Academic Press, San Diego, 2014, p.165-184.
130. Stoodley, P., Stoodley, L. H., Costerton, B., DeMeo, P., Shirtliff, M., Gawalt, E., Kathju, S. Chapter 5 - Biofilms, Biomaterials, and Device-Related Infections. In: *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. Elsevier Academic Press, California, US. 2013, p. 77–101.
131. Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., Hsu, L. Y. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014 November 30; 78: 3–13.
132. Tegnell A, Saedi B, Isaksson B. A clone of coagulase-negative staphylococci among patients with post-cardiac surgery infections. *J Hosp Infect* 2002 Sep;52(1), p.37-42.
133. Teruyo I. and International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements(IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec(SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements, *Antimicro Agents Chemother*, 2009; 53(12): 4961–4967.
134. Thiel H.J., Schumacher U. Normal flora of the human conjunctiva: examination of 135 persons of various ages, *Klin Monbl Augenheilkd*, 1994, Vol. 205, N 6 p. 348-357
135. Tormo, M. A., Marti, M., Valle, J., Manna, A. C., Cheung, A. L., Lasa, I., Penades, J. R. SarA is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epider-*

- midis* Biofilm Development. *Journal of Bacteriology*, 2005, N 7, vol. 187, p. 2348-2356.
136. Tortora G. J., Funke B.R., Case C. L. *Microbiology: an introduction*, The Benjamin/ Cummings publishing company, 1989, p 512 .
 137. Turner, K., Feil E., Secret life of multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents. Review*, 2007, N 29, p. 129-135.
 138. Tyler K.D., Wang G., Tyler S.D., Johnson W.M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* (1997), 35, 339-346.
 139. Urwin R. and Maiden M.C., Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology, *Trends Microbiol* 11 (2003), pp. 479–487.
 140. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(3):1- 46.
 141. Vandecasteele S.J., Peetermans W.L., Merckx R, Rijnders B.J.A., Van Eldere J. Reliability of the *ica*, *aap* and *atIE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *J. Clin. Microb. Inf.* ,2003, 9, pp.114-119.
 142. Vandecasteele S.J., Peetermans W.E., Merckx R. and Van Eldere J., Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during *in vitro* and *in vivo* foreign body infections, *J Infect Dis* 188 ,2003, pp. 730–737.
 143. Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al., AFPL : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* (1995), 23: 4407-4414
 144. Vuong, C., Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 2002 April; 4(4): 481–489.
 145. Vuong C., Voyich J.M. and Fischer E.R. *et al.*, Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system, *Cell Microbiol* 6 (2004), pp. 269–275.
 146. Vuong C., Dürr M., Carmody A. B., peshel A., Klebanoff S. F., Otto M. Regulating expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol soluble modulines. *Cell. Microbiol.*, (2004,) 6, 8, 753–759.
 147. Wang, L., Li, M., Dong, D., Bach, T. H. L., Sturdevant, D. E., Vuong, C., Otto, M., Gao, Q. SarZ is a key regulator of biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, N 9, vol.197, p. 1254-1262.

148. Widerström, M., Wiström, J., Sjöstedt, A. *et al.* Coagulase-negative *staphylococci*: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2012, N 1, vol. 31, p. 7-20.
149. Wisplinghoff H., Rosato A.E., Enright M.C., Noto M., Craig W. and Archer G.L., Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 47 (2003), pp. 3574–3579.
150. WHO (World Health Organisation) A brief synopsis of patient safety. 2010[skatīts: 02.05.2013.] Pieejams: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0015/111507/E93833.pdf
151. Wojtyczka, R. D., Orlewska, K., Kępa, M., Idzik, D., Dziedzic, A., Mularz, T., Krawczyk, M., Mikłasińska, M., Wąsik, T. J. Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014 May; 11(5): 4619-4633.
152. Woods, E., Percival, S. L. Chapter eleven - Biofilms' Role in Intravascular Catheter Infections. In: *Biofilms in Infection Prevention and Control: A Healthcare Handbook*. Academic Press, San Diego, 2014, p.185-198.
153. Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M., Gao, Q. Role of the *luxS* Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 2006 January; 74(1): 488-496.
154. Xu L., Li H., Vuong C., Vadyvaloo V., Wang J., Yao Y., Otto M., Gao Q.) Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immunol.*, (2006), 74(1), 488–496.
155. Yarwood J. M., Schlievert P. M. (2003) Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.*, 112, 1620–1625
156. Yoda, I., Koseki, H., Tomita, M., Shida, T., Horiuchi, H., Sakoda, H., Osaki, M. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* Adhesion. *BMC Microbiology*, 2014; 14: 234.
157. Ziebuhr W., Heilmann C. and Götz F. et al., Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates, *Infect Immun* 65 (1997), pp. 890–896.
158. Ziebuhr W., Krimmer V., Rachid S., Lossner I., Gotz F. and Hacker J., A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alter-

nating insertion and excision of the insertion sequence element IS256, *Mol Microbiol* 32 (1999), pp. 345–356.

159. Ziebuhr W., Dietrich K., Trautmann M. and Wilhelm M., Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis, *Int J Med Microbiol* 290 ,2000, pp. 115–120.
160. Ziebuhr W., *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections, *Contrib Microbiol* 8 (2001), pp. 102–107.
161. Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kranzler, H., Batzilla, C., Kozitskaya, S. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006 August; 28,Suppl. 1, pp.14–20.
162. Zing W., Cartier Fassler V., Walder B. Central venous catheter- associated infections. *Best practice & research clinical anesthesiology* 2008, vol. 22,No3, pp. 407-421.
163. Zhang Y, Ren S. and Li H et al. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* 2003; 49: 1577–1593.
164. Žileviča A. , Tračevska T. Koagulāzes negatīvo stafilokoku (KONS) virulences izpēte. *Latvijas Universitātes raksti*, 2009, 750. sējums, 253. - 260. lpp.

Es vēlos pateikties promocijas darba vadītājām: profesorei Aijai Žilevičai un asoc.profesorei Tatjanai Tračevskai par atbalstu, vērtīgiem padomiem un palīdzību promocijas darba veikšanas laikā.

Es pateicos savām kolēģēm, mikrobioloģēm: Ilzei Pūliņai, Andželikai Ezerniecei, Ingai Norvaišai un molekulārbioloģei Ilvai Polei par līdzdalību un atbalstu.

Pateicos kolēģēm Dacei Rudzītei, Agitai Melbārdei-Kelmerei un arī Uģim Bēram, kuri bija iesaistīti dažādos darba izstrādes posmos.

Esmu ļoti pateicīga savai ģimenei par pacietību, sapratni un nebeidzamu atbalstu visā promocijas darba veikšanas laikā.