

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS
BIOFILMU VEIDOŠANA UN REZISTENCES PRET
METICILĪNU NOTEIKŠANA, LIETOJOT
FENOTIPISKĀS UN MOLEKULĀRI BIOLOĢISKĀS
IZMEKLĒŠANAS METODES

BAKALaura DARBS

Autors: Reinis Maļuhins

Studenta apliecības Nr.: rm13069

Darba vadītāja: Dr. med. Iveta Līduma

Rīga, 2018

ANOTĀCIJA

Staphylococcus epidermidis ir veselas cilvēka ādas un gļotādas dabiskās mikrofloras sastāvdaļa, kas ir viens no visbiežāk sastopamajiem cilvēka mikrobioma pārstāvjiem. Epidermālais stafilokoks ir oportūnists, kas saimniekorganismam spēj kolonizēt gan ādu, gan gļotādu. Kaut arī *S. epidermidis* piemīt mazāk virulences faktoru, nekā radniekam *S. aureus*, epidermālais stafilokoks ir kļuvis par vienu no visbiežāk izolētajiem koagulāzes negatīvajiem stafilokokiem intrahospitālajā vidē. Tomēr neskatoties uz to, ka epidermālajam stafilokokam ir mazāk virulences faktoru, tas ir kļuvis par nopietnu un komplikētu problēmjautājumu gan ārstniecības iestādēm, gan sabiedrības veselībai kopumā.

Pētījuma mērķis bija noteikt izolēto *Staphylococcus epidermidis* celmu meticilīnrezistenci un spēju veidot biofilmu *in vitro*. Pētījumā tika pielietotas fenotipiskās izmeklēšanas metodes, lai noteiktu celmu antibakteriālo jutību un biofilmas veidošanos, kā arī tika pielietota genotipiskā izmeklēšanas metode, lai noteiktu *mecA* gēna klātbūtni celmos.

Iegūtie bakalaura darba pētījuma rezultāti liecina, ka no 43 *S. epidermidis* izolātiem visaugstāko rezistenci, 93% gadījumu (n-39), novēroja pret eritromicīnu. Zemāku, bet salīdzinoši augstu *S. epidermidis* izolātu rezistenci, 74% gadījumu (n-32), novēroja pret cefoksitīnu un ciprofloksacīnu. *S. epidermidis* izolātu vidēju jutību, 2% gadījumu, novēroja pret eritromicīnu un ciprofloksacīnu, 4% gadījumu pret klindamicīnu. Savukārt, visaugstāko *S. epidermidis* jutību, 100% gadījumu (n-43), novēroja pret vankomicīnu. No 17 *S. epidermidis* izolātiem, kas iegūti no intravaskulāriem katetriem, 65% gadījumu (n-11) veidojās biofilma. Pētījuma rezultāti liecina, ka no 17 *S. epidermidis* izolātiem, kas iegūti no intravaskulāriem katetriem, 76% gadījumu (n-13) saturēja *mecA* gēnu. Līdz ar to, *mecA* gēna klātbūtne *S. epidermidis* izolātos korelē ar rezistenci pret cefoksitīnu. Savukārt, *S. epidermidis* izolātu korelācija starp *mecA* gēna klātbūtni un spēju veidot biofilmu netika novērota.

Atslēgvārdi: *S. epidermidis*, KONS, virulences faktori, biofilma, antibakteriālā rezistence, *mecA* gēns

SUMMARY

Staphylococcus epidermidis is a permanent member of the normal human microbiota commonly found on skin and mucous membranes. As part of human microflora, opportunistic *S. epidermidis* usually has a benign relationship with its host. Due to various virulence factors and unique features, as opposed to its more virulent cousin *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* is respected as a common cause of nosocomial infections. Over recent decades the clinical importance and the emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains have created many challenges in the treatment process.

Therefore, the purpose of this study was phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus epidermidis* strains *in vitro*, based on their methicillin resistance and biofilm formation profiles.

The results from this research suggest that the highest *S. epidermidis* resistance between 43 isolates is against erythromycin (93%, n-39). Relatively high rates of *S. epidermidis* resistance is also against ceftiofur and ciprofloxacin (74%, n-32). Intermediate susceptibility against erythromycin, ciprofloxacin (2%) and clindamycin (4%). The highest *S. epidermidis* susceptibility between 43 isolates is against vancomycin (100%). This research supports that from 17 *S. epidermidis* strains, isolated from intravascular catheters, 11 strains (65%) produce biofilm. The detection of *mecA* gene was investigated from 17 *S. epidermidis* strains, isolated from intravascular catheters, *mecA* gene was detected in 13 isolates (76%). Thereby, resistance to ceftiofur correlates with presence of *mecA* gene in *S. epidermidis* isolates. In contrast, presence of *mecA* gene and ability to form a biofilm were not correlated in *S. epidermidis* isolates.

Keywords: *S. epidermidis*, CONS, virulence factors, biofilm, antibacterial resistance, *mecA* gene

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Aae- nekovalents autolizīns

Aap- akumulācijas saistītais proteīns (no angļu val. – Accumulation-associated protein)

agr- aksesorais gēnu regulators (no angļu val. – Accessory gene regulator)

ALT- antibakteriālā *lock* terapija (no angļu val. – Antimicrobial lock therapy)

AMP- antimikrobiālie peptīdi

AtIE- autolizīns

Bap- biofilmas saistītais proteīns

DDT- disku difūzijas tests

CC- klindamicīns

CDC- Slimību kontroles un novēršanas centrs

CIP- ciprofloksacīns

CRISPR- prokariotu aizsardzības mehānisms, specifiskas DNS sekvences

DDT- disku difūzijas tests

DNS- dezoksiribonukleīnskābe

ECDC- Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs

EPS- ekstracelulārā polimērā substance jeb biofilmas gļotu glikokalikss

ER- eritromicīns

FAME- taukskābju modificējošie enzīmi (no angļu val. – Fatty Acid Modifying Enzymes)

Fbe- fibrinogēnu saistošais proteīns

FOX- cefoksitīns

HAIs- ar veselības aprūpi saistītas infekcijas (no angļu val. – Health care associated infections)

hBD2/3- β-defensīni 2/3

HMM- transpeptidāžu enzīmi

HPLC- analītiskā augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija

IgG- imunoglobulīns G

IS- insercijas sekvenca

IS-256- insercijas sekvenca 256

kDa- kilodaltoni

KONS- koagulāzes negatīvie stafilokoki

LL37- katelicidīns

luxS- signāltransdukcijas sistēma

mecA- metecilīnrezistences gēns

MIC- minimālā inhibējošā koncentrācija

mol/L- molārā koncentrācija litrā

MRSA- meticilīna rezistents *S. aureus*

MRSE- meticilīna rezistents *S. epidermidis*

MSCRAMM- mikroorganismu virsmas sastāvdaļu atpazīstošās adhēzijas matricas molekulas (no angļu val. – Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules)

OprM- mikroorganismu membrānas porīns

PBP- penicilīnu saistošais proteīns (no angļu val. – Penicillin binding protein)

PBP2 α - penicilīnu saistošais proteīns 2 α

PDG- peptidoglikāns

PGA- poli- γ -glutamīnskābe

PIA- polisaharīdu intracelulārais adhezīns

PNAG- poli-N-acetilglikozamīns

PRRs- molekulāro struktūru atpazīšanas receptori

PSM- fenolšķīstošais modulīns (no angļu val. – Phenol Soluble Modulin)

PVC- polivinilhlorīds

QS- starpšūnu komunikācija (no angļu val. – quorum sensing)

RNS- ribonukleīnskābe

rRNS- ribosomālā ribonukleīnskābe

S2- otrais sekvenču tips

SCC*mec*- stafilokoku hromosomālā *mec* kasete (no angļu val. – *Staphylococcal* cassette chromosome *mec*)

SdrF/G/H- virsmas saistītie proteīni F, G, H

SE1L- stafilokoka enterotoksīnam līdzīgais L-toksīns

SEC3- stafilokoku enterotoksīns C3

SNP- viena nukleotīda polimorfisms (no angļu val. – Single Nucleotide Polymorphism)

SSP-1/2- *S. epidermidis* membrānas virsmas saistītie proteīni

SspA- eksoenzīms, serīna proteāze

SspB- cisteīna proteāze

TLRs-1/2/6- Toll-līdzīgie proteīni 1, 2 un 6, membrānas proteīni (no angļu val. – Toll- like receptors)

Tn4001- saliktais transpozons

tRNS- transporta ribonukleīnskābe

UV- ultravioletais starojums

VAN- vankomicīns

WHO- Pasaules Veselības organizācija

SATURS

ANOTĀCIJA	2
SUMMARY	3
DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI.....	4
IEVADS.....	8
1. LITERATŪRAS APSKATS	10
1.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> vispārējs raksturojums	10
1.2. Koagulāzes negatīvie stafilokoki	11
1.3. <i>S. epidermidis</i> epidemioloģija un patoģenēze.....	12
1.4. Saimniekorganisma un <i>S. epidermidis</i> savstarpēja mijiedarbība	13
1.5. <i>S. epidermidis</i> virulences faktori.....	14
1.5.1. Biofilmas	15
1.5.1.1. Biofilmas veidošanās procesu molekulārie mehānismi	16
1.5.1.2. <i>S. epidermidis</i> biofilmas specifiski protektīvo gēnu ekspresijas profils	20
1.5.2. Poli- γ -glutamīnskābes nozīme	21
1.5.3. <i>S. epidermidis</i> producētie toksīni	21
1.5.3.1. Fenolšķīstošie modulīni	22
1.5.3.2. Eksoenzīmi	23
1.5.4. Citi virulences faktori	23
1.6. <i>S. epidermidis</i> ārstniecības terapijā iekļauto antibakteriālo zāļu vielu raksturojums....	24
1.6.1. β -laktāmi	25
1.6.2. Makrolīdi.....	26
1.6.3. Fluorhinoloni.....	26
1.6.4. Linkozamīdi	27
1.6.5. Glikopeptīdi.....	28
1.7. Antibakteriālo zāļu vielu rezistences mehānismi	29
1.7.1. β -laktāmu rezistence	31
1.7.2. Makrolīdu rezistence	32
1.7.3. Fluorhinolonu rezistence.....	33
1.7.4. Linkozamīdu rezistence	33
1.7.5. Glikopeptīdu rezistence	34

1.8. Koagulāzes negatīvo stafilokoku meticilīnrezistence	35
2. MATERIĀLI UN METODES	37
2.1. Pētījuma apraksts	37
2.2. Materiāli.....	38
2.2.1. Aparatūra un trauki.....	38
2.2.2. Mikrobioloģiskās barotnes.....	39
2.2.3. Inokulātu sagatavošana un inokulēšana.....	39
2.3. <i>S. epidermidis</i> fenotipiskās izmeklēšanas metodes	40
2.3.1. Antibakteriālās jutības noteikšana	40
2.3.1.1. Disku difūzijas tests	40
2.3.2. Biofilmas producēšanās noteikšana.....	41
2.3.2.1. Mikrotitru plates metode	41
2.4. <i>S. epidermidis</i> genotipiskās izmeklēšanas metodes	41
2.4.1. DNS izdalīšana	41
2.4.2. Amplifikācija.....	42
2.4.3. Hibridizācija.....	43
2.5. Rezultātu statistiskās apstrādes metodes	43
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	44
3.1. BBL™ DDT metodes rezultāti	44
3.2. Mikrotitru plates rezultāti	50
3.3. Geno Type™ testa rezultāti	55
SECINĀJUMI.....	58
PATEICĪBAS	59
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	60
PIELIKUMI	68
1. pielikums	68
DOKUMENTĀRĀ LAPA	71

IEVADS

Staphylococcus epidermidis ir viens no cilvēka mikrobioma pārstāvjiem. Epidermālais stafilokoks tiek raksturots kā komensāls kolonizators, kas ir normālas, veselas cilvēka ādas un gļotādas dabiskās mikrofloras sastāvdaļa.

S. epidermidis ir viens no KONS, t.i., koagulāzes negatīvo stafilokoku grupas pārstāvjiem, kas neproducē asinsreci veicinošo enzīmu koagulāzi, kas var būtiski ietekmēt fagocitozes procesus. Epidermālajam stafilokokam piemīt oportūnisms, tas var pielāgoties dzīvošanai jebkādos apstākļos, kā arī izvairīties no saimniekorganisma imūnsistēmas mediētām šūnām.

S. epidermidis piemīt manāmi izteikta ģenētiskā un fenotipiskā daudzveidība. Vienas stafilokoku sugas ietvaros var krasi atšķirties specifiskas īpašības, kuras mēdz dēvēt arī par virulences faktoriem, piemēram, biofilmas veidošanās, toksīnu producēšanās u.c. Kaut arī *S. epidermidis* piemīt mazāk virulences faktoru, nekā radniekam *S. aureus*, epidermālais stafilokoks ir kļuvis par vienu no visbiežāk izolētajiem koagulāzes negatīvajiem stafilokokiem intrahospitālajā vidē jeb veselības aprūpē iegūtajos infekciju gadījumos. Tomēr neskatoties uz to, ka epidermālajam stafilokokam ir mazāk virulences faktoru, tas ir viens no nopietnākajiem pārstāvjiem, kas, iekļaujot dažādas cilvēku vecuma grupas, kā arī imūnnovājinātos cilvēkus, var izraisīt ievērojamu infekciju gadījumu skaitu.

Pielietojot praksē fenotipiskās un genotipiskās izmeklēšanas metodes, pieaug varbūtība iespējamo virulences faktoru identificēšanai. Diemžēl, bet ņemot vērā plašo *S. epidermidis* izplatību ārstniecības iestādēs, un, veicot izmeklējumus, arvien biežāk tiek identificēti patogēnie, biofilmu veidojošie, meticilīn- un multi-rezistentie epidermālā stafilokoka celmi.

Darba mērķis: Noteikt izolēto *Staphylococcus epidermidis* celmu meticilīnrezistenci un spēju veidot biofilmu *in vitro*.

Atbilstoši darba mērķim ir izvirzīti uzdevumi:

- 1.) Noteikt antibakteriālo jutību, izmantojot BBL™ DDT metodi.
- 2.) Noteikt *Staphylococcus epidermidis* celmu biofilmas veidošanās spēju *in vitro*, izmantojot mikrotitru plates metodi.
- 3.) Noteikt *mecA* gēna klātbūtni, izmantojot Geno Type™ testu.

Bakalaura darba apjoms – 71 lpp. Tas sastāv no trīs nodaļām: literatūras apskata, materiālu/metožu apraksta un rezultātu/diskusijas sadaļas. Darbā izmantoti 87 bibliogrāfiskie nosaukumi, 2 elektroniskie materiāli, 8 tabulas un 17 attēli.

Bakalaura darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmācijas bakalaura studiju programmā. Bakalaura darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes, kā arī Tuberkulozes un plaušu slimību valsts centra mikrobioloģijas laboratorijās. Darbā tika izmantotas zinātniskās publikācijas, raksti, un LU pieejamie zinātniskie e-resursi.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *Staphylococcus epidermidis* vispārējs raksturojums

S. epidermidis ir Gr(+) koku pārstāvji, kas pieder pie *Staphylococcus* ģints, *Micrococcaceae* dzimtas mikroorganismiem (Le, *et al.*, 2018; Namvar, *et al.*, 2014). *S. epidermidis* raksturo kā sfēriskus, fakultatīvi anaerobus, aerobus, sporas neveidojošus un katalāzes pozitīvus mikroorganismus, kuru diametrs variē no 0,5 līdz 1,5 μm (Ohlsen, *et al.*, 2006). Mikroorganismiem ir raksturīga dalīšanās vairākās plaknēs, veidojot dažādus šūnu sakopojumus, kurus mēdz dēvēt par vīnogu ķekariem (Schoenfelder, *et al.*, 2010).

Aptuveni ap 1882. gadu, Ogstons (A. Ogston) datē pirmos iespējamus minējumus par ķekaru veidojošiem mikroorganismiem. Vārda *Micrococcus* formulējums tika izmantots, lai varētu noteikt atšķirību starp koku ķēdēm un šūnu sakopojumiem jeb ķekariem. Savukārt, ap 1884. gadu, Rozenbahs (F.J. Rosenbach) kokus, kuri veidoja baltas šūnu kolonijas agāra platē, nosauca par *Staphylococcus albus*, pēcāk 1891. gadā tos nosauca par *Staphylococcus epidermidis albus*. Divu dekāžu laikā, koku nosaukums variēja vēl vairākas reizes un 1916. gadā, no vārda *Albococcus epidermidis*, tika izveidots vārdu savienojums *Staphylococcus epidermidis*, kurš tiek izmantots arī mūsdienās (Ohlsen, *et al.*, 2006; Namvar, *et al.*, 2014).

S. epidermidis piemīt īpatnēja šūnu membrāna. Membrānas galvenā sastāvdaļa ir peptidoglikāns (Robertson, *et al.*, 2010). Peptidoglikānam ar fosfodiester saitēm var kovalenti saistīties teihojskābe. Savukārt, teihojskābe sastāv no ribitola vai glicerola, kas regulē katjonu koncentrāciju šūnas membrānā (Otto, 2012; Namvar, *et al.*, 2014). Anaerobos apstākļos *S. epidermidis* kā enerģijas un augšanas avotu var izmantot glikozi, bet anaerobā metabolisma ceļā var veidoties koagulāzes u.c. aģenti, kas negatīvi var iespaidot šūnu augšanu. Savukārt, aerobos apstākļos *S. epidermidis* kā enerģijas avotu var izmantot citus ogļhidrātus, piem., fruktozi, maltozi un glicerolu (Namvar *et al.*, 2014; Kleinschmidt, *et al.*, 2015).

Kā jau iepriekš bija norādīts, *S. epidermidis* ir Gr(+) stafilokoks. *S. epidermidis* ir viens no cilvēka mikrobioma, t.i., visa mikroorganismu kopuma, komensāls kolonizators (Ohlsen, *et al.*, 2006; Otto, 2014). *S. epidermidis* neapšaubāmi tiek uzskatīts par normālas, veselas cilvēka ādas un gļotādas dabiskās mikrofloras sastāvdaļu (Watanabe, *et al.*, 2016). Veiktie pētījumi liek secināt, ka veseram cilvēkam var būt līdz pat 24 dažādiem *S. epidermidis* celmu pārstāvjiem (Fey, Olson, 2010). *S. epidermidis* piemīt oportūnisms, epidermālais stafilokoks ir ārkārtīgi vieds, tas var pielāgoties jebkuriem dzīvošanas apstākļiem, kā arī, tas spēj izvairīties no konfrontācijas ar imūnsistēmas šūnām (Le, *et al.*, 2018). Tiklīdz cilvēkam imūnsistēma novājinās, *S. epidermidis* sāk savu "uzvaras gājieni". Respektīvi, *S. epidermidis* spēj izraisīt

nozokomiālas jeb intrahospitālās, jeb ar veselības aprūpi saistītas infekcijas (Fisher, Mobashery, 2016; Zhu, *et al.*, 2017). Diemžēl, bet koagulāzes negatīvo epidermālo stafilokoku (KONS) izraisītām patoloģijām, kā arī izteiktās antibakteriālās rezistences dēļ, ir komplicēts ārstēšanās process (Cheung, Otto, 2010; Kleinschmidt, *et al.*, 2015).

1.2. Koagulāzes negatīvie stafilokoki

Visus stafilokokus nosacīti var iedalīt divās grupās, iedalot tos kā koagulāzes producējošus vai neproducējošus. Epidermālais stafilokoks pieder pie koagulāzes negatīvajiem stafilokokiem (KONS). Koagulāze ir ferments, kas veicina asinsreci. Ferments būtiski ietekmē fagocitozes procesus, jo, ja stafilokoks ir koagulāzes pozitīvs, tad fibrīns, akumulējoties uz mikroorganismu virsmas, ievērojami samazinās mikroorganisma iespējamo fagocitāro pakļaušanu. Koagulāze tiek producēta stafilokoku eksponenciālajā augšanas fāzē (Ohlsen, *et al.*, 2006; Uçkay, *et al.*, 2009; Cheung, Otto, 2010; Elzi, *et al.*, 2012; Kleinschmidt, *et al.*, 2015).

KONS grupā ir ietvertas apmēram 40 dažādas sugas, no kurām apmēram puse veido obligāto jeb rezidentu mikrofloru. Tie ir normālas, veselas cilvēka ādas un gļotādas dabiskās mikrofloras pārstāvji. Tie ir komensāli kolonizatori, tas nozīmē, ka starp saimniekorganismu un KONS pastāv labvēlīgi neitrālas attiecībās. Saimniekorganisms ir mikroorganismu dzīvesvieta, savukārt, mikroorganismi nodrošina relatīvu konkurenci starp pārliecinoši patogēniem un oportūniskiem mikroorganismiem. *S. epidermidis* sastop 80% gadījumu no visiem identificētajiem KONS celmiem. Šo procentuālo īpatsvaru varētu izskaidrot ar to, ka *S. epidermidis* piemīt specifiski virulences faktori, kuru nav citiem KONS pārstāvjiem (Otto, 2009, 2012; Namvar, *et al.*, 2014).

Savstarpēji KONS var tikt sadalīti divās grupās, atkarībā no to jutības vai rezistences pret novobiocīnu. Novobiocīns ir hinolonu grupas antibakteriāls līdzeklis, kurš Gr(+) mikroorganismos bloķē topoizomerāzes IV darbību, respektīvi, enzīmu, kas procesē DNS replikāciju, reparāciju, kā arī rekombināciju. Novobiocīna jutīgas stafilokoku sugas ir *S. epidermidis*, *hominis*, *haemolyticus* u.c., savukārt, rezistentas sugas ir *S. xylosus* un *saprophyticus* (Vickers, *et al.*, 2007; Namvar, *et al.*, 2014).

Diemžēl, bet KONS tiek iekļauts kā viens no visbiežākajiem slimnīcās iegūto slimību izraisītājiem (Otto, 2009, 2012; Brescò, *et al.*, 2017). KONS izplatīšanās riska faktori ar veselības aprūpi saistītās iestādēs ir gaužām vienkārši. Pirmkārt, nepamatoti ilga pacientu uzturēšanās ārstniecības iestādē un, otrkārt, pārāk ilga antibakteriālo līdzekļu terapijas administrēšana. Visbiežāk KONS patogenitātei tiek pakļautas nosacīti 3 cilvēku grupas, t.i., jaundzimušie, respektīvi, priekšlaikus dzimušie mazuļi, imūnkompromitētie jeb

imūnnovājinātie cilvēki, kā arī, cilvēki, kuri veikuši audu vai orgānu transplantāciju un protezēšanu. KONS var procesēt dažādu iekaisumu rašanos, to attīstību, atkarībā no transplantēto audu vai orgānu, vai implantēto medicīnisko ierīču veida un vietas. Vienas no visbiežāk KONS izraisītajām infekcijām ir septicēmija un sepse, kā arī infekcija var rasties pēc aortokoronārās šuntēšanas (Fey, Olson, 2010; Namvar, *et al.*, 2014; Brescó, *et al.*, 2017).

1.3. *S. epidermidis* epidemioloģija un patoģenēze

S. epidermidis piemīt manāmi izteikta ģenētiskā un fenotipiskā daudzveidība jeb mainība. Neticami, bet vienas stafilokoku sugas ietvaros var krasi atšķirties specifiskas īpašības, kuras mēdz dēvēt arī par virulences faktoriem, piemēram, biofilmas veidošanās, toksīnu producēšanās u.c. Tiek uzskatīts, ka tik izteikta mainība kalpo epidermālajam stafilokokam kā evolucionāra priekšrocība. Evolucionāri iegūtās spējas var palīdzēt *S. epidermidis* pielāgoties apkārtējai videi. Tomēr, lai spētu saprast, kā stafilokokiem ir izveidojušās šādas specifiskas priekšrocības, ir jāiedziļinās diez ko sarežģītos procesos, mehānismos un regulatoros ceļos (Ziebuhr, *et al.*, 2006; Namvar, *et al.*, 2014; Brescó, *et al.*, 2017; Le, *et al.*, 2018).

Kritiska nozīme ir insercijas sekvenču (IS) klātbūtnei. IS ir mazi, mobili, autonomi DNS mikroelementi, kuri ir lokalizēti praktiski visu dzīvo organismu genomos. Pētījumos tiek minēts, ka *S. epidermidis* atšķiras noteiktu IS klātbūtne gan komensāliem, gan klīniskiem celmiem. Rezultātā var secināt, ka IS klātbūtne korelē gan ar stafilokoku virulences faktoriem, gan ar to patogenitāti. IS stafilokokiem spēj ierosināt dažādu secīgu procesu norisi. Nepieciešamības gadījumā, ar IS mutāciju palīdzību var veidoties rekombinanti gēni, mutantas gēnu alēles (Ziebuhr, *et al.*, 2006; Otto, 2009, 2012; Fey, Olson, 2010). Veiktajos pētījumos tiek minēts, ka otrajam sekvenču tipam ((S2) kopā tiek minēti 74 jaunatklāti sekvenču tipi) atbilstošie *S. epidermidis* satur IS-256 un *ica* gēnus. Insercijas sekvenču kopiju un *ica* gēna klātbūtne ir saistīta ar epidermālā stafilokoka invazivitāti (Ziebuhr, *et al.*, 1999; Kozitskaya, *et al.*, 2004; Iorio, *et al.*, 2012)

IS-256 ir viena no saliktā transpozona (Tn4001) daļām, kas spēj piešķirt aminoglikozīdu rezistenci, kā arī sekvenču kopijas piedalās biofilmas veidošanās procesos, savukārt, *ica* gēna jeb iekššūnu adhēzijas gēnu sakopojuma klātbūtne procesē PIA jeb iekššūnu polisaharīdadhezīnu veidošanos (Kozitskaya, *et al.*, 2004; Otto, 2009, 2012).

S. epidermidis heterogenitātes fenomens spēj veicināt savdabīgu ģenētiskā materiāla variāciju iespējamību. IS darbība sekmē mutantu gēnu alēļu veidošanos, kā rezultātā veidojas

jauns, nosacīti elastīgs ģenētiskais materiāls, kas, galu galā, sekmē veiksmīgu epidermālā stafilokoka adaptēšanos apkārtējā vidē (Otto, 2009, 2012).

1.4. Saimniekorganisma un *S. epidermidis* savstarpēja mijiedarbība

Saimniekorganisma imūnsistēmas un epidermālā stafilokoka savstarpējā mijiedarbība ir sava veida spēle, kurā, ja uz brīdi iedomājas, uzvarētāju nav.

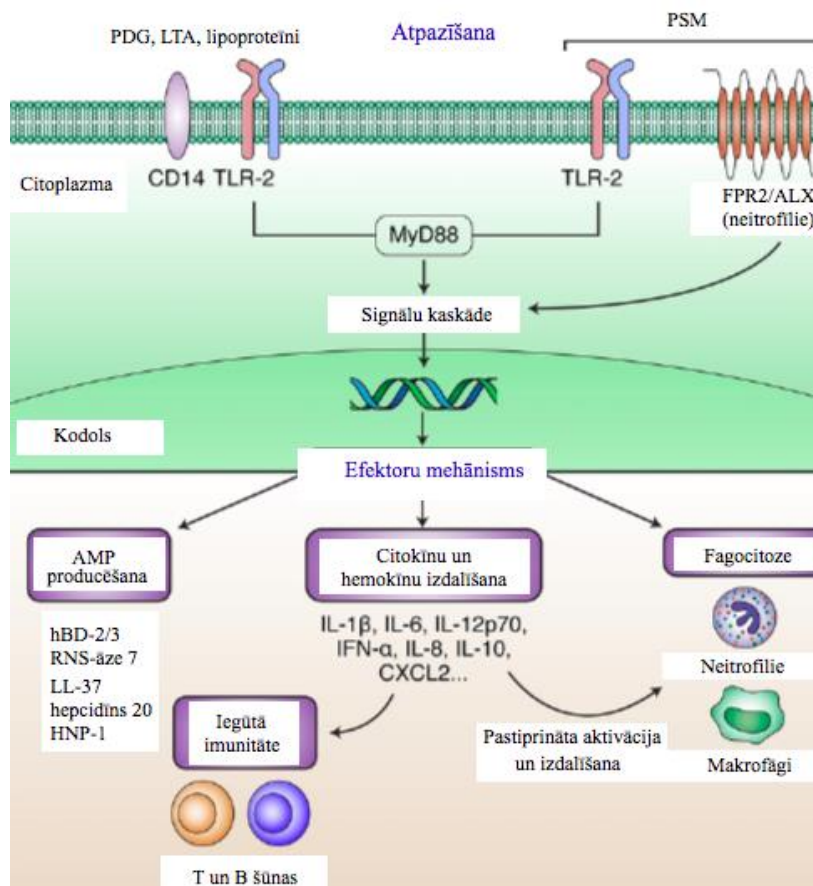
Šajā situācijā, var atrast arī kādu pozitīvu īpašību. Tā kā starp saimniekorganismu un oportūnistu ir komensālas attiecības, rodas imunoloģiskā tolerance. Iegūtās īpašības ļauj imūnsistēmai kontrolēt un atsijāt tos, kuri ir nosacīti neitrālie mikroorganismi, cilvēka mikrobioma pārstāvji, un tos, kuri nebūt nav tik neitrāli un “miermīlīgi”. Tādējādi imūnsistēma tiek uzturēta konkrētu mikroorganismu izraisītā tonusā (Namvar, *et al.*, 2014; Brown, Clarke, 2016; Brescó, *et al.*, 2017). Pētījumos ir aprakstīts, ka komensāli epidermālā stafilokoka celmi spēj aizsargāt no ādas neoplāzijas (Nakatsuji, *et al.*, 2018).

Tomēr situācijās, kurās pazūd divu organismu neitrālās attiecības, imūnsistēmai nākas aktivēt spēcīgāku iedzimtās imunitātes atbildes reakciju (skat. 1.4. att.). Imūnsistēmas atbildes rodas gadījumos, ja tiek konstatētas patogēna- asociētas molekulārās struktūras un vienības caur molekulāro struktūru atpazīšanas receptoriem (PRRs). Vieni no vislabāk izpētītajiem PRRs ir Toll- līdzīgie receptori (TLRs). Tie ir membrānas proteīni, kas spēj aktivēt pirmsiekaisuma citokīnu molekulu sintēzi, kā arī spēj atpazīt mikroorganismu izdalīto makromolekulu specifiskumu. Šī receptora signāla radītās molekulas spēj saistīt nespecifisko ar specifisko imunitāti. Receptori lokalizējas gan keratinocītos, gan endotēlija un fibroblastu šūnās.

S. epidermidis daļēji izraisa imūnās sistēmas atbildi caur TLR2, kas bieži vien veido heterodimērus ar TLR1 un TLR6. TLR2 spēj atpazīt vairākas epidermālā stafilokoka šūnas membrānas molekulas, piemēram, peptidoglikānu (PDG), lipoproteīnus, kā arī lipoteihojskābi. Imūnsistēma spēj atpazīt arī mikroorganismu izdalītos fenolšķīstošos modulīnus (PSM), caur TLR2 un TLR6 heterodimēru sistēmu (Brown, Clarke, 2016; Brescó, *et al.*, 2017).

S. epidermidis spēj inducēt antimikrobiālo peptīdu (AMPs) sintēzi un izdalīšanos. Saimniekorganisma AMPs ir heterogēnu, amfipātisku peptīdu grupa, un atkarībā no to struktūras un funkcijas, tos var iedalīt vairākās grupās. AMPs funkcionalitāte ietver ātru, tiešu mikroorganismu nogalēšanu, imūnās sistēmas atbildes reakcijas modelēšanu, aktivāciju un hemokīnu producēšanu. AMPs mediē β - defensīnu (hBD) izdalīšanos. Veiktajos zinātniskajos pētījumos *in vitro*, izmantojot keratinocītu modeli, tika noteikts, ka *S. epidermidis* vai tā supernatanti var procesēt augstu hBD2 un hBD3 līmeni, kā arī RN-āzes 7 un katelicidīna LL37 klātbūtni šūnās.

Iespējams, ka AMPs signalizēšanas sistēmas indukcija spēj regulēt līdzsvaru, starp komensāliem un izteikti patogēniem mikroorganismiem (Otto, 2009; Agarwal, *et al.*, 2016; Brescó, *et al.*, 2017).



1.4. att. Imūnsistēmas mediēta signālu kaskāde, identificējot *S. epidermidis* (Brescó, *et al.*, 2017; autora tulkots attēls).

1.5. *S. epidermidis* virulences faktori

Epidermālais stafilokoks ir izveidojis vairākus aizsarg- un izdzīvošanas mehānismus. Virulences faktoru jēdziens, formulējums ir plašs, kas sevī ietver dažādu gēnu ekspresiju. Noteiktu gēnu ekspresija veicina epidermālā stafilokoka patogenitāti un invazivitāti (Ohlsen, *et al.*, 2006; Otto, 2009, 2012; Namvar, *et al.*, 2014; Brescó, *et al.*, 2017, Le, *et al.*, 2018).

Virulence tiek definēta vairākos iespējamajos variantos, piemēram, epidermālā stafilokoka patogenitātes pakāpe, ir atkarīga no infekcijas ierosināšanas spējām, kā arī no inficējamā saimniekorganisma uzņēmības (Brescó, *et al.*, 2017, Le, *et al.*, 2018).

Epidermālā stafilokoka patogenitāti veicina virulences faktori, tie sekmē: a) izvairīšanos no saimniekorganisma imūnmehānismiem, b) imūnsistēmas stimulāciju, c) kolonizāciju un d) saimniekorganisma šūnu bojājumus. Kopumā, *S. epidermidis* piemīt mazāk virulences faktoru, kas saimniekorganismam varētu izraisīt tiešus bojājumus, savukārt, virulentajam “radniekam”

S. aureus šo faktoru ir ievērojami vairāk. Respektīvi epidermālā stafilokoka patogenitāte ir strikti atkarīga no tiem virulences faktoriem, kas spēj modelēt saimniekorganisma imūno sistēmu tā, lai vispirms attīstītu un pēc tam uzturētu persistentu iekaisumu (Namvar, *et al.*, 2014; Brescó, *et al.*, 2017, Le, *et al.*, 2018).

Tiek minēta varbūtība, ka zemā *S. epidermidis* agresivitāte, virulences faktoru dēļ, ir evolucionāra priekšrocība. Atkarībā no situācijas, “sadzīvojot” nosacīti neitrāli, komensāli ar saimniekorganismu, virulences faktori netiek ekspresēti, savukārt, gadījumā, ja novājinās imunitāte, sāk izpausties hemotakse, tad virulences faktori uzsāk savu ekspresiju, savu “uzvaras gājieni” (Ohlsen, *et al.*, 2006; Otto, 2009, 2012; Namvar, *et al.*, 2014; Brescó, *et al.*, 2017, Le, *et al.*, 2018).

Pētot un aprakstot virulences faktorus (skat. 1. pielikumā) kļūst skaidrs, ka to klātbūtne ir vitāli nepieciešama *S. epidermidis*.

1.5.1. Biofilmas

Viens no nozīmīgākajiem epidermālā stafilokoka virulences faktoriem ir spēja veidot biofilmu (Büttner, *et al.*, 2015; Algburi, *et al.*, 2017). Biofilmas ir heterogēnas sistēmas, kuras veido savdabīgas mikroorganismu aglomerācijas. Biofilma ir sava veida mikroorganismu civilizācija, kurā mikroorganismi ir pieķērušies viens pie otra un pamatvirsmas. Ekstracelulārā polimērā substance (EPS) jeb biofilmas gļotu glikokaliks aizsargā mikroorganismus, palīdzot tiem pielāgoties mainīgajiem vides faktoriem, saimniekorganisma imūnsistēmai, kā arī, nodrošinot strukturālo stabilitāti (Otto, 2009, 2012; Büttner, *et al.*, 2015; Algburi, *et al.*, 2017).

Biofilmas raksturo telpiski nevienmērīgas struktūras, var atšķirties forma, šūnu blīvums utt. Makroskopiski apskatot biofilmas kontaminēto materiālu kļūst skaidrs, tās izskatās kā biezs, iedzeltens gļotu slānis. Morfoloģiski var novērot kanālus, kas caurvij biofilmu. Kanālu klātbūtne ir vitāli nepieciešama biofilmām, jo caur tiem tiek pārnestas barības vielas, skābeklis, vielmaiņas galaprodukti jeb metabolīti. Mikroorganismu aglomerācijas var savstarpēji mijiedarboties, komunicējot savā starpā, tās var veicināt ķīmisku signālu izdalīšanos (Donlan, 2002; Ziebuhr, *et al.*, 2006; Brescó, *et al.*, 2017, Le, *et al.*, 2018).

Kā jau iepriekš norādīts, biofilmas gļotu glikokaliks aizsargā mikroorganismus no saimniekorganisma imūnsistēmas šūnām. Biofilma tiek aizsargāta no brūču infiltrējošām imūnsistēmas šūnām, piem., fagocītiem un makrofāgiem. Mikroorganismi biofilmas dēļ var labāk tikt galā arī ar mainīgajiem ārējās vides faktoriem, piem., dehidratāciju un UV starojumu. Biofilma var nodrošināt atvieglotu gēnu pārnesi, ģenētisko mainību (notiek ģenētiskās

informācijas (DNS) apmaiņa ar plazmīdu starpniecību), kā arī paaugstināt mikroorganismu invazivitāti un patogenitāti (Otto, 2009, 2012; Schoenfelder, *et al.*, 2010; Decker, *et al.*, 2015).

Medicīniskām ierīcēm piemīt ideāla infrastruktūra mikroorganismu kolonizācijai un invāzijai. Intravaskulārie katetri, ortopēdiskie implanti, kontaktlēcas, kā arī operāciju brūces, kalpo kā inkubators turpmākai biofilmas attīstībai (Gahlot, *et al.*, 2014; Mikroorganismi, oportūnisti, kuri apdzīvo pacienta ādu un citas lokācijas, var piesārņot medicīniskās ierīces to manipulācijas vai implantācijas laikā (Chessa, *et al.*, 2016).

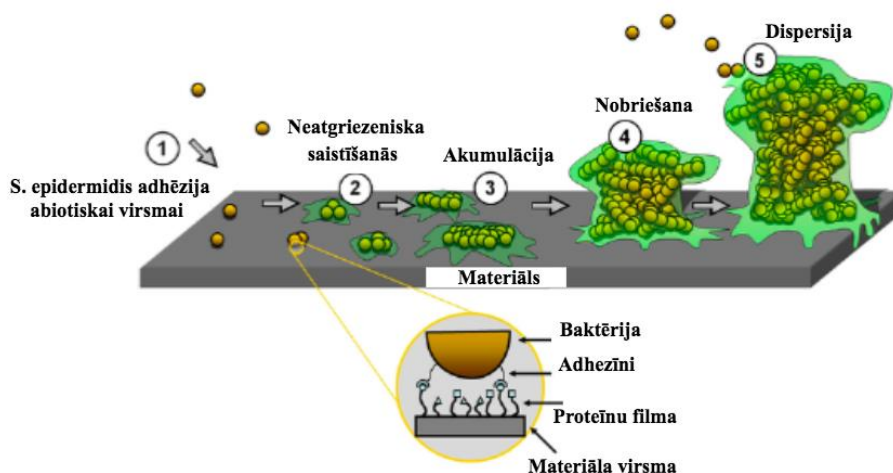
Biofilmas producēšanos var nosacīti iedalīt vairākās cēloņsakarībās:

1. var tikt sasniegts augsts mikroorganismu šūnu blīvums, 10^n šūnu uz katru biofilmas mm;
2. var tikt supresēta mikroorganismu jutība pret saimniekorganisma imunitāti;
3. palielināta un pastiprināta mikroorganismu saistīšanās ar virsmām;
4. pastiprināta EPS produkcija;
5. heterogenitātes variācijas;
6. savstarpējās komunikācijas pastiprināšanās, izmantojot QS sistēmu;
7. pastiprināta ģenētiskā mainība.

1.5.1.1. Biofilmas veidošanās procesu molekulārie mehānismi

Biofilmas veidošanās mehānisms ir komplicēts, biofilmas procesēšana sastāv no trim secīgiem soļiem (skat. 1.5.1.1.1. att.):

1. mikroorganismu adhēzija jeb saistīšanās ar abiotisku (nedzīvu) vai biotisku virsmu;
2. iekššūnu mikroorganismu agregācija un akumulācija;
3. biofilmas nobriešana un *S. epidermidis* dispersija.



1.5.1.1.1. att. *S. epidermidis* biofilmas veidošanās process uz abiotiskas virsmas (Brescó, *et al.*, 2017; autora tulkots attēls).

Biofilmas veidošanās procesa pirmajā solī notiek *S. epidermidis* adhēzija (saistīšanās). Šī soļa laikā, pasīvās adsorbcijas (virsmas sorbcija) ceļā, mikroorganismi atgriezeniski saistās ar, manipulācijās izmantoto, medicīnisko ierīci, saistoties uz tās abiotiskas virsmas (1.1 solis). Tālāk seko jau neatgriezeniska mikroorganismu adhēzija ar saimniekorganisma šūnu membrānas proteīniem, veidojot biofilmu uz biotiskas virsmas (1.2 solis) (Woods, Percival, 2014; Brescó, *et al.*, 2017, Le, *et al.*, 2018).

1.1 solis- *S. epidermidis* atgriezeniska adhēzija abiotiskai virsmai, specifisku molekulu ekspresija. No manipulāciju materiālu un mikroorganismu virsmas fizikāli-ķīmiskām īpašībām ir atkarīga epidermālā stafilokoka saistīšanās. Fizikāli-ķīmisko īpašību dēļ, piemēram, hidrofobiskums, temp., vides pH, lādiņš (mikroorganismi ir negatīvi lādēti), hemotakse, termodinamiski, termostatiski u.c. spēki, epidermālā stafilokoka un materiāla virsmas sākotnējā mijiedarbība ir nespecifiska (Otto, 2009, 2012; Algburi, *et al.*, 2017). Neregulāras piesaistes vietas var veicināt mikroorganismu pieķeršanos pie tām. Materiāli, kuri var veicināt mikroorganismu adhēziju abiotiskai virsmai ir PVC, latekss, silikons, savukārt, adhēziju neveicina nerūsējošā tērauda, titāna u.c. metālu sakausējumi (Gusnaniar, *et al.*, 2017);

Pirmējo mikroorganismu piesaisti abiotiskai virsmai veicina specifiski epidermālā stafilokoka proteīni un skābes. Proteīni, t.i., daudzfunkcionālie autolizīni un adhezīni (Aae, AtlE). Aae spēj mediēt vitronektīna (saimniekorganisma ekstracelulārās matricē molekula) adhēziju, savukārt, AtlE spēj inducēt mikroorganisma šūnas virsmas hidrofobiskumu (Büttner, *et al.*, 2015; Algburi, *et al.*, 2017; Brescó, *et al.*, 2017).

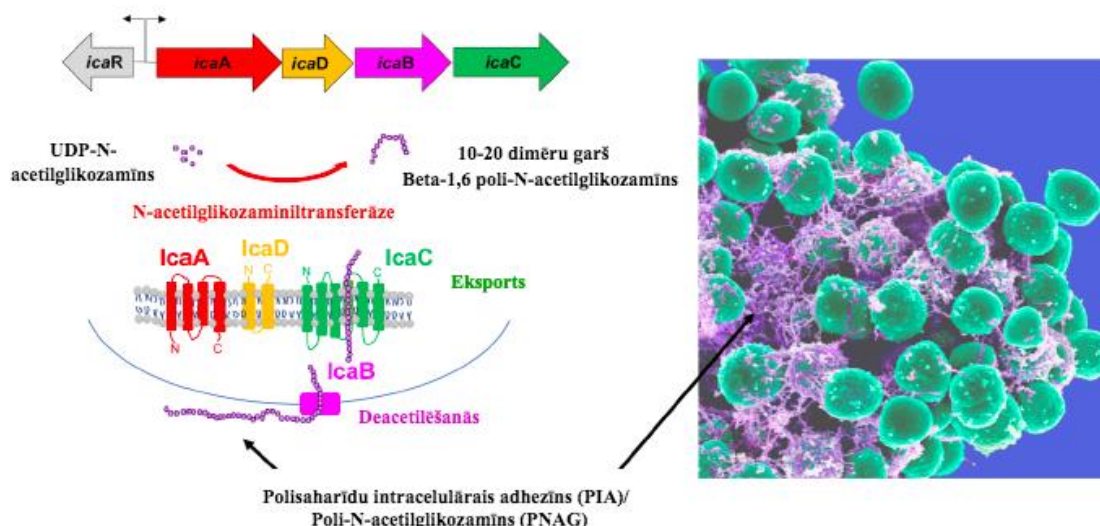
1.2 solis- *S. epidermidis* neatgriezeniska adhēzija biotiskai virsmai, specifisku molekulu ekspresija. Pēc medicīniskas manipulācijas, piem., vainagartēriju šuntēšanas un medicīniskās ierīces, piem., implanta ievietošanas, materiāls nonāk saskarē ar asinīm un citiem šķīdumiem (Woods, Percival, 2014). Ievietotai ierīcei tiek modificētas virsmas īpašības, virsma var saturēt asins seruma OBV, piem., fibrinogēnu, fibronektīnu, vitronektīnu, albumīnu, kolagēnu u.c. Kontaminētā ierīce veido biotisku virsmu *S. epidermidis* adhēzijai. Proteīnu klātbūtne uz ierīces virsmas atvieglo tās kolonizāciju, jo fibrīns, fibrinogēns un fibronektīns ir vieni no visnozīmīgākajiem mikroorganismu adhēzijas veicinātājiem (Christner, *et al.*, 2010; Fey, Olson, 2010; Otto, 2009, 2012; Le, *et al.*, 2018).

Epidermālā stafilokoka saistīšanos ar biotisku virsmu mediē stafilokokam ekspresētās MSCRAMM, t.i., mikroorganismu virsmas sastāvdaļu atpazīstošās adhēzijas matricē molekulas (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). MSCRAMM spēj saistīties un savstarpēji mijiedarboties ar saimniekorganisma šūnu proteīniem, piem., fibrinogēnu un fibronektīnu (Christner, *et al.*, 2010; Viens no vissīkāk izpētītajiem *S. epidermidis* MSCRAMM ir fibrinogēnu saistošais proteīns SdrG, kurš spēj

saistīties ar saimniekorganisma šūnu proteīniem. SdrG veicina trombocītu adhēziju un agregāciju, savukārt, SdrF spēj saistīties ar kolagēnu I (Fey, Olson, 2010; Otto, 2009, 2012).

Polisaharīdu intracelulārais adhezīns (PIA), kuru mēdz dēvēt arī par poli-N-acetilglikozamīnu (PNAG), ir viens no svarīgākajiem biofilmas stabilizējošiem adhezīniem. PIA ir lineārā homopolimēra β -1,6-saistītais N-acetilglikozamīna monomērs, kas, deacetilēšanās procesa laikā, veidojas pozitīvi lādēts. Iegūto lādiņu atšķirīgums sekmē savstarpēju mijiedarbību starp jaunizveidoto biotiskās virsmas ekstracelulāro matricu un epidermālā stafilokoka šūnas membrānu (Schommer, *et al.*, 2011; PIA veidošanos kodē *icaADBC* operons. Operons kodē 3 šūnu membrānas proteīnus- IcaA, IcaD, IcaB un IcaC (skat. 1.5.1.1.2. att.). IcaB ar *S. epidermidis* šūnas membrānu saistās nekovalenti, savukārt, IcaA (N-acetilglikozaminiltransferāze) kopā ar IcaD katalizē UDP-N-acetilglikozamīna pārvēršanu par 10 līdz 20 dimēru garu, β -1,6-saistītu N-acetilglikozamīnu. Savukārt, IcaC ir nepieciešams, lai tālāk paplašinātu N-acetilglikozamīnu oligomēru veidošanos. Kā jau iepriekš bija minēts, IcaB nekovalenti saistās ar *S. epidermidis* šūnu membrānu, kā arī deacetilē poli-N-acetilglikozamīna molekulu, ļaujot lokalizēt jaunizveidoto PIA molekulu uz mikroorganismu šūnu virsmas (Ziebuhr, *et al.*, 2006; Schommer, *et al.*, 2011; Büttner, *et al.*, 2015; Le, *et al.*, 2018).

Adhēziju biotiskai virsmai spēj mediēt arī *S. epidermidis* membrānas virsmas saistītie proteīni, t. i., SSP-1 un SSP-2. Tie interferē ar fibronektīnu, kolagēnu un citiem ekstracelulārā matricsa proteīniem. Tiem iedarbojoties, uz *S. epidermidis* membrānas virsmas tiek izveidotas proteīnu šķiedras, kas procesē, saucamo, šūna pie šūnas adhēziju (Fey, Olson, 2010; Büttner, *et al.*, 2015; Brescó, *et al.*, 2017).



1.5.1.1.2. att. Polisaharīdu intracelulārā adhezīna (PIA) veidošanās, attēlojums elektronmikroskopā (Le, *et al.*, 2018; autora tulkots attēls).

Biofilmas veidošanās procesa otrajā solī notiek *S. epidermidis* iekššūnu agregācija un akumulācija. Procesu realizāciju veic specifiski mikroorganismu šūnu membrānas proteīni un citas polimēru vienības, piemēram, polisaharīdi (Brescó, *et al.*, 2017; Le, *et al.*, 2018).

Otrā soļa laikā veiksmīgi piesaistīties pie abiotiskas vai biotiskas virsmas *S. epidermidis* sāk vairoties. Stafilokoka vairošanās iniciē šūnu klasteru jeb mikrokoloniju veidošanos. Mikrokolonijas sāk sekretēt gļotu glikokaliksu jeb ekstracelulāro polimēro substanci (EPS) (Ziebuhr, *et al.*, 2006; Otto, 2009, 2012; Büttner, *et al.*, 2015).

Lai arī cik svarīga PIA nozīme ir biofilmai, ne visos biofilmu gadījumos ir noteikta PIA klātbūtne. Veicot zinātniskos pētījumus, tika konstatēti *ica* gēna negatīvi *S. epidermidis* biofilmu paraugi. Tika noskaidrots, ka *ica* negatīvos *S. epidermidis* celmos intracelulāro adhēziju mediēja citas specifiskas proteīnu komponentes. Viens no tiem ir akumulācijas asociētais/saistītais proteīns (Aap). Savukārt, otrs ir ekstracelulārā matricas saistītais proteīns (Embp). Tomēr, PIA- atkarīgās biofilmas struktūras ziņā ir strukturizētākas un robustākas (Schommer, *et al.*, 2011; Büttner, *et al.*, 2015; Le, *et al.*, 2018).

Aap ir 240kDa liels proteīns, kas sastāv no A un B domēna. A domēna proteolītiska šķelšana inducē proteīna konformācijas maiņu, dodot B domēnam iespēju, mediēt Aap polimerizēšanu šūnu, piem., korneocītu pavedienos. Rezultātā seko akumulācija un biofilmas agregācija, PIA un *ica* negatīvos *S. epidermidis* celmos. Turpretim Embp ir 1MDa liels proteīns, kas sastāv no 59 dažādiem (FIVAR) un 38 ar G- saistītiem, albumīnu saistošiem (GA) domēniem. Embp piedalās biofilmas gan adhēzijas, gan akumulācijas un agregācijas procesos. Embp FIVAR domēni mediē adhēziju pie fibronektīna, kā arī, iespējams pie PIA. Kaut gan, ir noteikts, ka FIVAR domēni bez GA domēniem ir neefektīvi biofilmu agregācijā (Fey, Olson, 2010; Schommer, *et al.*, 2011; Le, *et al.*, 2018).

Biofilmas veidošanās akumulācijas un agregācijas solī bieži vien tiek minēts vēl viens ekstracelulārā matricas saistītais proteīns Bap. Tas ir 239kDa liels virsmas proteīns. Tā klātbūtne ir noteikta arī *S. epidermidis* radniekam *S. aureus*. Tomēr šim proteīnam nav vitāli svarīgas lomas vai nepieciešamības biofilmas veidošanā (Fey, Olson, 2010; Otto, 2009, 2012).

Viena no pēdējām akumulācijas un agregācijas procesā iesaistītajām biofilmas komponentēm ir teihojskābe. Šī skābe ir raksturīga Gr(+) mikroorganismiem. Tā sastāv no fosfātu un poliolu, t.i., ribitola vai glicerola atlikumiem. Skābei var būt vairākas formas- lipoteihojskābes forma, kas ir saistīta ar šūnas membrānas lipīdiem, un šūnu membrānas teihojskābes forma, kas var būt kovalenti saistīta ar peptidoglikānu. Teihojskābēm piemīt svarīga nozīme *S. epidermidis* fizioloģijā un patoģenēzē, veicinot adhēziju, agregāciju, akumulāciju un sekojošu kolonizāciju (Namvar, *et al.*, 2014; Büttner, *et al.*, 2015; Brescó, *et al.*, 2017; Le, *et al.*, 2018).

Biofilmas veidošanās procesa trešajā solī notiek *S. epidermidis* biofilmas nobriešana un dispersija. Biofilmas nobriešana ir akumulācijas un agregācijas procesa gala rezultāts. Ir izveidojusies tipiskās, raksturīgās pazīmes- 3D biofilmas struktūras, starp kurā atrodas vitāli nepieciešamās ar šķidrums pildītās kanālu sistēmas. Biofilmas 3. solī var sasniegt 50µm biezumu. Tik biezas biofilmas stabilitāti nodrošina EPS EPS, kas, nosacīti, sastāv no polisaharīdiem, proteīniem un teihojskābes aizņem vienīgi 3% no kopējās masas, pārējos 97% aizņem ūdens (Otto, 2009, 2012; Brescò, *et al.*, 2017, Le, *et al.*, 2018). Kā jau iepriekš bija minēts, biofilmas caurvij kanālu sistēmas, līdz ar to, šāds procentuālais sadalījums ir iespējams. Ūdens ir nepieciešams mikroorganismu izdzīvošanai un funkcionēšanai, piem., ūdens nodrošina izšķīdušo barības vielu transportu. Biofilmas ekstracelulārajā matriksā esošie kanāli ne tikai nodrošina vitāli nepieciešamās funkcijas, bet arī veicina *S. epidermidis* adaptīvo rezistenci, piem., akumulējot β-laktamāzes, antibakteriālo līdzekļu degradējošus enzīmus (Fey, Olson, 2010; Schommer, *et al.*, 2011).

Izmantojot specifisku starpšūnu komunikācijas sistēmu jeb kvoruma sajūtu (QS), mikroorganismi spēj nodrošināt savstarpēju komunikāciju (Singh, Ray, 2014). Ar QS palīdzību mikroorganismi spēj pielāgot, sinhronizēt noteiktu gēnu ekspresiju, nodrošinot no mikroorganismu blīvuma atkarīgu gēnu regulāciju (Miller, Bassler, 2001; Otto, 2009; Brescò, *et al.*, 2017). Par savstarpējo komunikāciju atbild divas signālpārneses jeb signāltransdukcijas sistēmas- *agr* un *luxS*. QS sistēma koordinē mikroorganismu metabolismu, pielāgošanos apkārtējai videi un citas vitāli nepieciešamas funkcijas (Yang, *et al.*, 2016).

Savukārt, dispersija jeb biofilmas atslāņošanās veidojas, tad, kad mikroorganismiem sāk pietrūkt izejvielu, uzkrājas vielmaiņas galaprodukti, šūnu blīvums ir sasniedzis, nosacīti, maksimumu (Woods, Percival, 2014).

S. epidermidis dispersiju var inducēt pašu izstrādātie enzimatiskie galaprodukti, biofilmas veidojošu materiālu, piem., polisaharīdu un proteīnu sintēzes pārtraukšana, kā arī veiksmīga arējo faktoru mijiedarbība, piem., saimniekorganisma iejaukšanās (Otto, 2009, 2012; Woods, Percival, 2014; Le, *et al.*, 2018).

1.5.1.2. *S. epidermidis* biofilmas specifiski protektīvo gēnu ekspresijas profils

S. epidermidis biofilmai novēro pavisam citādāku, daudz komplicētāku attīstības modeli, salīdzinot ar citām, piem., planktoniskām jeb peldošām šūnām (iekļaujot arī citu mikroorganismu pārstāvjus). Citu mikroorganismu biofilmas modeli varētu inscenēt tikai laboratorijas apstākļos. Nepārsteidz arī tas, ka epidermālā stafilokoka biofilmas ekspresētais

gēnu profils stipri atšķiras no planktonisko šūnu profila visos veiktajos genoma ekspresijas pētījumos.

S. epidermidis biofilmas protektīvo gēnu ekspresijas profilā ietilpst vismaz 3 dažādi gēni, t.i., jau iepriekš minētais aksesoraais gēnu regulators (*agr*), *agr* kontrolētais PSM peptīdu regulators un *SarA* (Namvar, *et al.*, 2014; Harris, *et al.*, 2017).

Aksesoraais gēnu regulators procesē vairāk nekā 100 gēnu darbību, kuri nodrošina gan abiotiskai, gan biotiskai adhēzijai nepieciešamo receptoru producēšanu. *agr* kontrolētais PSM peptīdu regulators nodrošina virsmas aktīvo vielu jeb surfaktantu- fenolšķīstošo modulīnu (PSM) veidošanu (Pereira, *et al.*, 2018). Modulīniem piemīt citolītiskas īpašības. Savukārt, *SarA* gēns kontrolē virulences faktoru sintēzes regulāciju (Otto, 2009; Fey, Olson, 2010)

Izteikta biofilmas protektīvo gēnu ekspresija kodē izteikti biosintētiskas mašīnērijas izveidi, kas ievērojami paaugstina biofilmas aizsardzības īpašības (Büttner, *et al.*, 2015).

1.5.2. Poli- γ -glutamīnskābes nozīme

Poli- γ -glutamīnskābe jeb glutamīnskābes atlikumu lineārs homopolimērs (PGA) ir peptoīds, ko producē *S. epidermidis*. PGA klātbūtne ir noteikta arī citiem, piem., halofīliem mikroorganismiem. Skābes klātbūtne epidermālajam stafilokokam tika noteikta tikai 2005. gadā, pirms tam, skābes klātbūtne bija noteikta tikai *Bacillus anthracis* (Fey, Olson, 2010; Namvar, *et al.*, 2014).

S. epidermidis PGA sastāv no vienāda daudzuma D- un L- glutamīnskābes atlikumiem, bet, piem., *B. anthracis* PGA sastāv no tikai D- glutamīnskābes atlikumiem. PGA biosintēzi kodē *capBCAD* operons (Otto, 2009, 2012; Brescó, *et al.*, 2017).

S. epidermidis PGA nodrošina aizsardzību pret AMP (antimikrobiāliem peptīdiem), netrofilo leukocītu fagocitozes, kā arī pastiprina virulenci. Spēj līdzsvarot osmotisko gradientu, ārējo faktoru iedarbības rezultātā (Fey, Olson, 2010; Otto, 2009, 2012).

1.5.3. *S. epidermidis* producētie toksīni

Kā jau iepriekš bija minēts, viens no nozīmīgākajiem *S. epidermidis* virulences faktoriem ir spēja veidot biofilmas. *S. epidermidis* spēj izveidot arī citus virulences faktorus un aizsargmehānismus, piem., toksīnus un enzīmus. No šiem faktoriem ir atkarīga epidermālā stafilokoka patogenitāte un invazivitāte (Fey, Olson, 2010; Otto, 2012).

KONS atšķirībā no radnieka *S. aureus* nesintezē daudz toksīnu vai degradējošu eksoenzīmu. Salīdzinoši nesen, sekvencējot *S. epidermidis* celmus, tika noteikta toksīnu

patogenitātes sala, nosacīts gēnu lokuss, ar *SeP* gēna operonu. Gēnu lokuss satur gēnus, piem., *SePI*, kas kodē stafilokoku enterotoksīnu C3 (SEC3) un stafilokoka enterotoksīnam līdzīgo L-toksīnu (SE1L) (Otto, 2012).

Kā jau iepriekš bija minēts, *S. epidermidis* nesintezē ievērojami daudz toksīnu un enzīmu, to varētu izskaidrot ar to, ka *S. epidermidis* ir mazāk gēnu nesēju, kas ekspresētu toksīnu un enzīmu producēšanos. Iespējams, ka šāda epidermālā stafilokoka īpašība ir saistīta ar CRISPR sekvenču klātbūtni. CRISPR ģenētiskie elementi ļauj atpazīt un atšķirt pašizveidotās DNS molekulas un struktūras no svešinieku molekulām, piem., fāgu producētās (Otto, 2012; Namvar, *et al.*, 2014).

1.5.3.1. Fenolšķīstošie modulīni

Pirmo reizi fenolšķīstošie modulīni (PSM) tika atklāti 1999. gadā, pētot *S. epidermidis* celmu virulenci. Tie ir genoma kodētu peptīdu saime ar citolītisku raksturu (Otto, 2012; Le, *et al.*, 2018).

S. epidermidis producē sešus dažādus PSM peptīdus- PSM α , PSM β -1, PSM β -2, PSM δ , PSM ϵ un δ -toksīnu. Īsi pēc 6 peptīdu atklāšanas noteica arī 7 pārstāvi, t. i., PSM-mec (To identificēja, pētot stafilokoku kasešu hromosomu (SCC) mec tipus- II, III un VIII. Tas ir vienīgais PSM, kas satur meticilīna rezistences gēnus (Otto, 2012). Tomēr, līdz mūsdienām, nav vēl īsti skaidrs, vai konkrētam PSM (PSM-mec) piemīt kritiska virulences īpašība (Qin, *et al.*, 2017).

Visi noteiktie PSM satur amfipātisku α -spirāli, kas raksturo surfaktantam līdzīgas īpašības. α -tipa PSM ir visīsākie, tiem ir aptuveni 20-25 aminoskābju gara ķēde, savukārt, β -tipa PSM ir divreiz garāki. δ -toksīns ir vienīgais *S. epidermidis* toksīns ar hemolītisku darbību, toksīna sintēzi nosaka *agr* lokusā lokalizētais *hed* gēns. Visu PSM ekspresiju strikti regulē Agr jeb *agr*-kvoruma sistēma, bet konkrēta PSM sekrēcijas mehānisms nav skaidrs (Schoenfelder, *et al.*, 2010; Otto, 2009, 2012).

Visus iegūtos PSM laboratoriski noteica, izmantojot reversās fāzes analītisko augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfiju (HPLC)/masspektrometriju un N-terminālās aminoskābes sekvencēšanu (Otto, 2012).

Salīdzinoši nesen tika analizēts *S. epidermidis* producēto PSM peptīdu potenciālās iedarbības spektrs. PSM piemīt citolītiskas un iekaisumu veicinošas īpašības, veicina neitrofilo leukocītu hemotaksi, aktivāciju un citokīnu atbrīvošanu. Līdzīgi kā *S. aureus*, *S. epidermidis* PSM- β formai nav citolītiskas iedarbības, savukārt, α -formai tās irniecīgas. Vienīgais izņēmums ir PSM- δ , kam piemīt spēcīgas citolītiskas īpašības. PSM- δ ir pirmais noteiktais un

pats spēcīgākais *S. epidermidis* toksīns, bet epidermālais stafilokoks sintezē ļoti niecīgos daudzumos (Otto, 2012; Namvar, *et al.*, 2014; Brescó, *et al.*, 2017).

Diemžēl, bet detalizētāki un sīkāki pētījumi par *S. epidermidis* PSM nav veikti. Radušos situāciju var skaidrot ar to, ka mutantu *S. epidermidis* celmu iegūšanas process laboratorijas apstākļos ir dikti komplicēts, kā arī, nav konstruēti šāda veida pētījuma dizaini (Otto, 2012).

1.5.3.2. Eksoenzīmi

Daži no sekretētiem *S. epidermidis* eksoenzīmiem ir skaitāmi pie virulences faktoriem. *S. epidermidis* spēj producēt vairākus eksoenzīmus t. i., proteāzes, piem., termonukleāzi, serīna un cisteīna proteāzes, elastāzes, glutamilendopeptidāzes un lipāzes. Visi minētie enzīmi spēj degradēt saimniekorganisma šūnas, respektīvi, proteīnus. Zinātniskajā literatūrā tiek minēts vēl viens iespējama eksoenzīmu pārstāvis, t. i., FAME jeb taukskābju modificējošie enzīmi. FAME spēj detoksificēt mikroorganismam kaitīgās taukskābes. Nav skaidrs, kādas gēnu sistēmas un proteīni ir iesaistīti FAME producēšanā (Fey, Olson, 2010; Otto, 2012).

Vieni no sīkāk pētītajiem eksoenzīmiem ir serīna proteāze V8 (SspA) un glutamilendopeptidāze (Esp), abas proteāzes kodē *spsA* gēna lokuss. Tie spēj degradēt gan AMP, gan fibrinogēnu, gan komplementa faktoru C5. Tiek minēta iespējamība, ka Esp varētu būt iesaistīts arī *S. epidermidis* kolonizācijas procesā (Fey, Olson, 2010; Otto, 2012).

1.5.4. Citi virulences faktori

Lantibiotikas

S. epidermidis lantibiotiku producēšana ir viens no virulences faktoriem, to iedalot, atsevišķā virulences faktoru grupā. Lantibiotikas ir bakteriocīni, ko producē arī citi Gr(+) mikroorganismi, piem., *B. subtilis* (Bierbaum, *et al.*, 2009).

Lantibiotikas ir peptīdu dabas antibakteriāli līdzekļi, kas satur tioētera aminoskābes-lantionīnu un metilalantionīnu. *S. epidermidis* producētās lantibiotikas var iedalīt divās grupās, t. i., epidermīna grupa un Pep5 grupa. Epidermīna grupā ietilpst epidermīns, Vall un Leu6 epidermīns, savukārt Pep5 (lantionīnu saturošs tricikliskais pepīds) grupā ietilpst Pep5, epilancīns K7, epicidīns 280 un epilancīns 15X (Götz, *et al.*, 2014).

Būtiska nozīme mikroorganismu izplatībai un sekojošai kolonizācijai ir *S. epidermidis* spēja producēt lantibiotikas. Lantibiotiku producēšana nodrošina konkurenci ar citiem

mikroorganismiem, cīnoties gan par kolonizējošo “telpu” jeb nišu, gan par barības vielām (Götz, *et al.*, 2014; Field, *et al.*, 2015).

1.6. *S. epidermidis* ārstniecības terapijā iekļauto antibakteriālo zāļu vielu raksturojums

S. epidermidis ir tipisks infekciju un sekojošu antibakteriālo līdzekļu terapijas lietošanas ierosinātājs. Ierosinātāja infekcijas terapija ir aktuāls un komplikēts medicīnas, un farmācijas nozares jautājums. Cīņā ar oportūnistu pielieto antibakteriālos līdzekļus, zāļu vielas, kas spēj destruktīvi iedarboties uz infekciju izraisītāju (Otto, 2009, 2012; Namvar, *et al.*, 2014; Munita, Arias, 2016; Brescò, *et al.*, 2017).

Antibakteriālās zāļu vielas ir vielu grupa, kam piemīt inhibējoša iedarbība uz mikroorganismiem. Zāļu vielas var būt citu mikroorganismu, augu vai dzīvnieku šūnu metabolisma produkti un atvasinājumi (Ventola, 2015; Zaman, *et al.*, 2017). Atkarībā no antibakteriālās iedarbības un koncentrācijas, zāļu vielas var iedarboties gan baktericīdi, gan bakteriostatiski. Baktericīdi nozīmē spēcīgu, ātru zāļu vielas iedarbību un efektivitāti, izraisot mikroorganismu līzi, savukārt, bakteriostatiski nozīmē zāļu vielas iedarbību, kas spēj kavēt mikroorganismu diferenciaciju (Davies, Davies, 2010).

Epidermālā stafilokoka antibakteriālās terapijas laikā izmanto zāļu vielas, kas, galvenokārt, iedarbojas uz Gr(+), kā arī zāļu vielas, kurām piemīt plašs iedarbības spektrs, gan pret Gr(+), gan Gr(-) mikroorganismiem. Antibakteriālo zāļu vielu iedarbības spējas ir atkarīgas no iedarbības mehānisma (Kleinschmidt, *et al.*, 2015; Munita, Arias, 2016; Gupta, Birdi, 2017), izšķir trīs galvenos darbības mehānismus, kas izraisa:

1. mikroorganismu šūnas membrānas sintēzes traucējumus ar sekojošu inhibīciju, šādi spēj iedarboties glikopeptīdi, piem., vankomicīns, cefalosporīni, piem., cefoksitīns;
2. mikroorganismu šūnas membrānas caurlaidības pārmaiņas, rezultātā no šūnas izplūst nepieciešamās barības vielas, šādi spēj iedarboties lipopetīdi, piem., daptomicīns.
3. mikroorganismu metabolisma traucējumus, rezultātā tiek kavēta proteīnu sintēze, šādi spēj iedarboties makrolīdi, piem., eritromicīns, linkozamīdi, piem., klindamicīns, fluorhinoloni, piem., ciprofloksacīns.

1.6.1. β -laktāmi

β -laktāmu grupā ietilpst savienojumi, kuru struktūrmolekulā ietilpst β -laktāma gredzens. β -laktāmi un citas penicilīna antibakteriālās zāļu vielas ir specifiski transpeptidāzes, karboksipeptidāzes un transglikozilāzes inhibitori, tie spēj nomākt β -laktāmu jutīgo *S. epidermidis* šūnas membrānas veidošanos (Fisher, Mobashery, 2016; Kong, *et al.*, 2010).

Peptidāzes un glikozilāzes spēj saistīt β -laktāmus, tāpēc enzīmus, bieži vien, dēvē par penicilīnu saistošajiem proteīniem (PBP). *S. epidermidis* PBP nodrošina trīs funkcijas, t.i., sintezē šūnas membrānas komponentes-enzīmus-, β -laktamāzes un regulatoros proteīnus. Katrai β -laktāmu zāļu vielai piemīt specifiska afinitāte pret katru PBP.

β -laktāmu darbības pamatā ietilpst spējas, veidot kovalentas saites ar serīnu, kas atrodas transpeptidāzes domēna enzimatiskajā zonā. Rezultātā tiek pārtraukta peptidoglikāna saišu veidošanās starp peptīdiem. Šūnu bojāeju potenci arī autolizīnu sintēze, tiem degradējot, šūnas peptidoglikāna slāni. Tomēr šāds bojāejas scenārijs ir reti, kad iespējams esošo regulatoro gēnu mutāciju dēļ (Kong, *et al.*, 2010).

No β -laktāmu grupas savienojumiem bieži *S. epidermidis* antibakteriālajā terapijā izmanto cefalosporīnus, kas pēc uzbūves ir līdzīgi penicilīnam. Cefalosporīni atšķiras no penicilīniem molekulārās struktūras līmenī. Cefalosporīniem β -laktāma gredzens ir saistīts ar sešu, nevis, piecu locekļu gredzenu (Munita, Arias, 2016).

Cefalosporīni ir plaša un sen atklāta antibakteriālo līdzekļu grupa, ko producē *Cephalosporium acremonium*. Galvenokārt, tie iedarbojas baktericīdi, jo, būdams β -laktāms, inhibē transpeptidāžu darbību. Cefalosporīnus iedala piecās paaudzēs. Pirmās paaudzes cefalosporīni, galvenokārt, ir aktīvi pret Gr(+) mikroorganismiem, piem., cefazoļins. Otrās paaudzes cefalosporīni, galvenokārt, ir aktīvi pret Gr(+) un (-) mikroorganismiem, piem., cefoksitīns. Trešās paaudzes cefalosporīniem ir izteiktāka izturība pret mikroorganismu producētajām laktamāzēm, galvenokārt, ir aktīvi pret multirezistentiem Gr(-) mikroorganismiem, piem., ceftriaksons. Ceturtās paaudzes cefalosporīni, galvenokārt, ir aktīvi pret multirezistentiem Gr(+) mikroorganismiem- epidermālo stafilokoku, kā arī ir izteiktāka izturība pret mikroorganismu producētajām laktamāzēm, piem., cefepims. Piektās paaudzes cefalosporīni tiek pielietoti smagu, abdominālu u.c. pseidomonu izraisītu iekaisumu gadījumos, piem., ceftarolīns (Page, 2007).

Viena no galvenajām cefalosporīnu lietošanas indikācijām ir ar veselības aprūpi saistītu infekciju ārstēšana, gadījumos, ja infekciju nav izraisījis meticilīna rezistentais *S. epidermidis*.

Medicīnas praksē, cefalosporīnu lietošanu cenšas ierobežot, jo tie ir spēcīgi β -laktāmāžu inducētāji, to lietošana var izveidot krustenisku rezistenci (Page, 2007; Munita, Arias, 2016).

1.6.2. Makrolīdi

Makrolīdu antibakteriālie līdzekļi pieder vienai no visbiežāk izmantojamām klīniski svarīgu antibakteriālo līdzekļu grupas, kurus izmanto, lai ārstētu Gr(+) mikroorganismu izraisītus, piem., epidermālā stafilokoka radnieka *S. aureus* iekaisumus (Vester, Douthwaite, 2001; Gaynor, Mankin, 2003).

Makrolīdu grupas savienojumi ir poliketīdu atvasinājumi, tie ir dabīgi mikroorganismu, augu un dzīvnieku metabolīti. Makrolīdu grupas savienojumiem ir tipisks un grupai raksturīgs makrolīdu gredzens, t. i., masīvs, makrociklisks laktona gredzens, kas savstarpēji ir saistīts ar ogļhidrātiem (Pechère, 2001).

Makrolīdu darbības mehānisms ir saistīts ar spēju inhibēt proteīnu sintēzi, proti, elongācijas posmā bloķē mikroorganismu RNS-atkarīgo proteīnu biosintēzi. Atgriezeniski saistoties ar 50S subvienību mikroorganismu ribosomās, tiek bloķēta transpeptidācija un peptidil-tRNS translācija. Galvenokārt, makrolīdi iedarbojas bakteriostatiski, bet augstās koncentrācijās- baktericīdi (Vester, Douthwaite, 2001; Gaynor, Mankin, 2003; Juda, *et al.*, 2016).

Viens no visbiežāk pielietotajiem makrolīdu grupas savienojumiem *S. epidermidis* izraisītu iekaisumu ārstēšanas terapijā ir eritromicīns. Savienojums jau diez ko sen tika izdalīts un atklāts, t.i., tālajā 1952. gadā no *Streptomyces erythreus*. Mediē Gr(+) mikroorganismu bojāeju, izmanto strutainu, septisku infekciju gadījumos. Būdam makrolīdu grupas savienojums, iedarbojas bakteriostatiski, traucējot proteīnu sintēzi, efekts tiek panākts eritromicīnam saistoties ar ribosomām, kavējot peptīdtranslokācijas reakciju (Vester, Douthwaite, 2001; Tenson, *et al.*, 2003).

1.6.3. Fluorhinoloni

Plaša iedarbības spektra, sintētiskas dabas antibakteriāls līdzeklis. Vislielāko afinitāti novēro pret aerobajiem Gr(-) un Gr(+) mikroorganismiem, piem., stafilokokiem. Pirmais hinolonu prototips nalidikskskābe, kā antibakteriāls līdzeklis tika apstiprināts lietošanai 1964. gadā (King, *et al.*, 2000).

Fluorhinolonu darbības mehānisma pamatā ir spēja tieši inhibēt mikroorganismu DNS un topoizomerāzes enzīmus- DNS girāzi (topoizomerāze II, topoizomerāze IV).

Topoizomerāzēm ir būtiska loma DNS replikācijā, respektīvi, fluorhinoloniem iedarbojoties uz topoizomerāzēm, tiek mediēti DNS bojājumi ar sekojošu mikroorganisma bojāeju (Munita, Arias, 2016; Jackson, *et al.*, 2016).

Atkarībā no iedarbības spektra, fluorhinolonus iedala 4 paaudzēs. Pirmās paaudzes fluorhinolonus izmanto ļoti reti, galvenokārt pret Gr(-) mikroorganismiem, bet ne pret pseidomonām, piem., nalidiksskābe. Otrās paaudzes fluorhinolonus lieto, galvenokārt, pret Gr(-) mikroorganismiem, iekļaujot arī pseidomonas, kā arī pret Gr(+) stafilokokiem, piem., ciprofloksacīns. Trešās paaudzes fluorhinoloniem piemīt līdzīgas īpašības kā otrai paaudzei tikai iedarbības lokā papildus iekļaujot Gr(+) un penicilīna rezistentus *S. pneumoniae* mikroorganismus, piem., levofloksacīns. Ceturtās paaudzes fluorhinoloniem piemīt līdzīgas īpašības kā trešai paaudzei tikai iedarbības lokā papildus iekļaujot plašu anaerobo mikroorganismu klāstu, piem., trovafloksacīns (King, *et al.*, 2000).

Viens no visbiežāk pielietotajiem fluorhinolonu grupas savienojumiem *S. epidermidis* izraisītu iekaisumu ārstēšanas terapijā ir ciprofloksacīns. Ciprofloksacīnam piemīt baktericīdas īpašības, darbības mehānisma pamatā ir topoizomerāžu darbību ierobežošana, kas ietekmē gan transkripcijas, gan replikācijas un rekombinācijas procesu izpildi. Rezultātā tiek mediēta DNS spirāles pārraušana ar sekojošu šūnas bojāeju (Jacoby, 2005; Munita, Arias, 2016; Jackson, *et al.*, 2016).

1.6.4. Linkozamīdi

Linkozamīdu grupas savienojumi gan pēc iedarbības spektra, gan pēc iedarbības mehānisma ir līdzīgi makrolīdu grupas savienojumiem. Linkozamīdi sākotnēji ir cēlušies no *Streptomyces lincolnensis*. Iedarbības spektrs sevī ietver Gr(-) un Gr(+) kokus (Tenson, *et al.*, 2003).

Kā jau iepriekš bija minēts, linkozamīdiem piemīt ar makrolīdiem līdzīgs iedarbības mehānisms, kas ir saistīts ar zāļu vielas spēju inhibēt mikroorganisma diferenciaciju, saistoties ar 23S un 50S RNS ribosomālo subvienību (Juda, *et al.*, 2016).

Viens no visbiežāk pielietotajiem linkozamīdu grupas savienojumiem *S. epidermidis* izraisītu iekaisumu ārstēšanas terapijā ir klindamicīns. Tika atklāts 1966. gadā. Klindamicīna darbības pamatā ir tā spēja saistīties ar mikroorganismos esošo 50S ribosomālo subvienību. Rezultātā, tiek traucēta transpeptidācijas reakcija proteīnu ķēdes elongācijas posmā, kas rezultējas ar proteīnu sintēzes inhibīciju. Izjaucot proteīnu sintēzi, tiek mediētas pārmaiņas mikroorganismu šūnas membrānā, kas samazina adhēzijas spējas biofilmas veidošanās laikā. Klindamicīnam piemīt arī specifiskas īpašības, tas var pastiprināt mikroorganismu

opsonizāciju, t. i., mikroorganismu fagocitozes veicināšanu, piesaistot virsmas asins seruma proteīnus vai citas makromolekulas (Tenson, *et al.*, 2003).

1.6.5. Glikopeptīdi

Glikopeptīdu grupas antibakteriālo līdzekļu nozīme ir kritiska mūsdienu medicīnas praksei. Grupas antibakteriālais iedarbības spektrs ietver Gr(+) mikroorganismus un patogēnus, piem., *S. epidermidis* un *aureus*, un to MRSE un MRSA formas. Glikopeptīdus uzskata kā pēdējos izvēles antibakteriālos līdzekļus dzīvībai bīstamo iekaisumu un infekciju ārstēšanai (Binda, *et al.*, 2014;

Glikopeptīdu grupas zāļu vielas ir sēņu producēti metabolīti- glikozilēti peptīdi. Peptīdi var sastāvēt no tricikliskiem vai tetracikliskiem heptapeptīdu kodoliem ar hidrofobām taukskābju sānu ķēdēm.

Līdzīgi kā citas antibakteriālo zāļu vielu grupas, glikopeptīdu darbības mehānisms ir saistīts ar spēju inhibēt mikroorganismu šūnas membrānu, precīzāk, spēj inhibēt peptidoglikāna veidošanos. Glikopeptīdi spēj saistīties ar augošo peptidoglikāna acil-D-alanil-D-alanīna daļu (D-Ala-D-Ala) mikroorganisma šūnas membrānas virspusē (Courvalin, 2006).

Praktiski vienīgais pielietotais glikopeptīdu grupas savienojums *S. epidermidis* izraisītu iekaisumu ārstēšanas terapijā ir vankomicīns. Tā ir izvēles zāļu viela, kas spēj cīnīties ar KONS un mec rezistentiem stafilokokiem. Savienojums tika atklāts 20. gs. 50. gados, kā sekundārais *Streptomyces orientalis*, ko mūsdienās sauc par *Amycolatopsis orientalis*, metabolīts. Ātri vien savienojums ieguva popularitāti, jo bija vienīgais, kas spēja tikt galā ar iekaisuma un infekciju izraisītājiem (Pootoolal, *et al.*, 2002; Nunes, *et al.*, 2006).

Vankomicīns sastāv no divām vai trijām lineārām heptapeptīdu struktūrām, kurām sānu ķēdēs var pievienoties disaharīdu molekulas, kas var saturēt D-glikozi, vankozamīnu un cukurus. Esošās struktūras var tikt glikozilētas, lai iegūtu atšķirīgus heptapeptīdu savienojumus. Esošo proteīnu struktūras veido raksturīga aminoskābju, piem., asparagīna (Asn) un leicīna (Leu) klātbūtne, bet glikopeptīdi savās proteīnu struktūras spēj inkorporēt citas, netipiskas aminoskābes, piem., 3,5-dihidroksifenilglicīnu (DHPG), β-hidroksitirozīnu (β-OHTyr) un *p*-hidroksifenilglicīnu (HPG).

Vankomicīnam piemīt baktericīda iedarbība. Līdzīgi kā citi antibakteriālie līdzekļi, vankomicīns traucē mikroorganismu šūnas membrānas- peptidoglikāna- sintēzi. Vankomicīns iedarbojas uz šūnas membrānas sintēzes procesa otro stadiju, kā jau iepriekš bija minēts, iedarbojoties uz D-Ala-D-Ala daļu jeb termināli, kas kavē transpeptidāzes darbību, kas rada mikroorganismu šūnu membrānas stiepes izturību. Vankomicīns spēj inhibēt arī

transglikozilāzes darbību, kas arī ietekmē peptidoglikāna veidošanos (Pootoolal, *et al.*, 2002; Courvalin, 2006; Binda, *et al.*, 2014).

1.7. Antibakteriālo zāļu vielu rezistences mehānismi

Konkrētas mikroorganismu grupas nejutīgums pret zāļu vielu vai, citādi sakot, mikroorganismu rezistence, diemžēl, ir kļuvusi par nopietnu un dikti sarežģītu gan medicīnas, gan farmācijas nozares problēmu (Otto, 2009, 2012; Ventola, 2015; Zaman, *et al.*, 2017).

Antibakteriālā rezistence ir sava veida mikroorganismu aizsarg- un pielāgošanās veids, šo nosacīto mikroorganismu adaptāciju potenci mainīgie ārējie faktori. Adaptējoties apkārtējai videi, mikroorganismi ir spējīgi pretoties antibakteriālo zāļu vielu iedarbībai (Davies, Davies, 2010; Munita, Arias, 2016; Gupta, Birdi, 2017).

Mikroorganismu rezistence var būt arī iekšēja jeb iedzimta un kā iepriekš bija minēts- iegūta, adaptējoties apkārtējai videi (Namvar, *et al.*, 2014; Kleinschmidt, *et al.*, 2015). Iegūtā rezistence var veidoties gadījumos, ja mikroorganismiem ir notikušas specifiskas ģenētiskās pārmaiņas. Mikroorganismi spēj būt tik viedi, ka tie var izveidot krustenisko rezistenci. Uzskata, ka mikroorganismu antibakteriālās rezistences veidošanos var iedalīt 2 lielās cēloņsakarībās (Munita, Arias, 2016):

1. Pārmaiņas mikroorganismu ģenētiskajā informācijā:

1.1.ir notikušas gēnu mutācijas *de novo* (spontāni)- ģenētiskās pārmaiņas visbiežāk ir nejaušas, piem., “snipu” gadījumos, respektīvi, viena nukleotīda polimorfisma (SNPs) gadījumā, kā arī, ja ir modificēta zāļu vielu receptoru afinitāte, samazināta zāļu vielu uzņemšana, zāļu vielu efluksa mehānisma pārekspresija un, ja ir notikušas vispārējas pārmaiņas metabolisma procesos;

1.2.ir notikusi horizontālā gēnu pārnese- šāds scenārijs ir iespējams, ja ir notikusi gēnu transformācija (inkorporācija “tīrā” DNS struktūrā), fāgu mediēta transdukcija un savstarpēja mikroorganismu konjugācija jeb “sekss”.

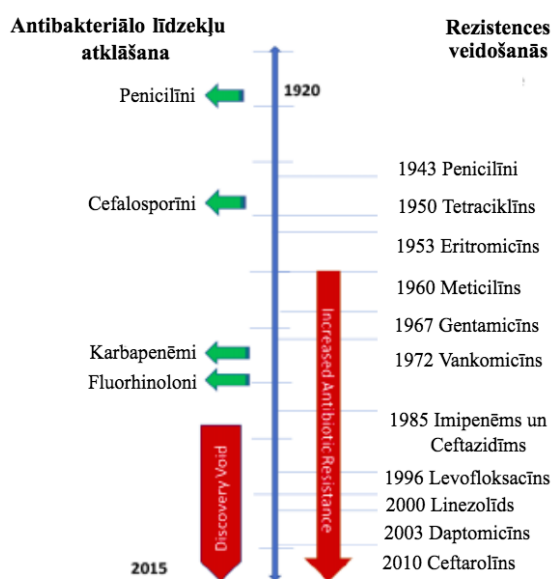
2. Pārmaiņas mikroorganismu bioķīmiskajos aizsardzības mehānismos:

2.1.antibakteriālās zāļu vielas molekulas modifikācija- notikusi zāļu vielas enzimatiskā degradācija un destrukcija, degradācija rodas adenilācijas, fosforilēšanās, un acetilēšanās gadījumā, savukārt, destrukcija- laktamāžu, karbapenemāžu, oksacilināžu iedarbībās rezultātā;

2.2.samazināta mikroorganismu membrānas caurlaidība, penetrācija- notikušas izmaiņas porīnos;

- 2.3. antibakteriālo zāļu vielu mērķšūnu izmaiņas- var izveidoties targetēta jeb konkrēta mikroorganisma mērķšūnas aizsardzība, piem., ir notikusi mērķšūnas enzimatiska modifikācija (tika pievienota metilgrupa);
- 2.4. ir notikusi mikroorganisma pielāgošanās apkārtējai videi- ārējo faktoru izraisīta adaptīva stresa atbildes reakcija.

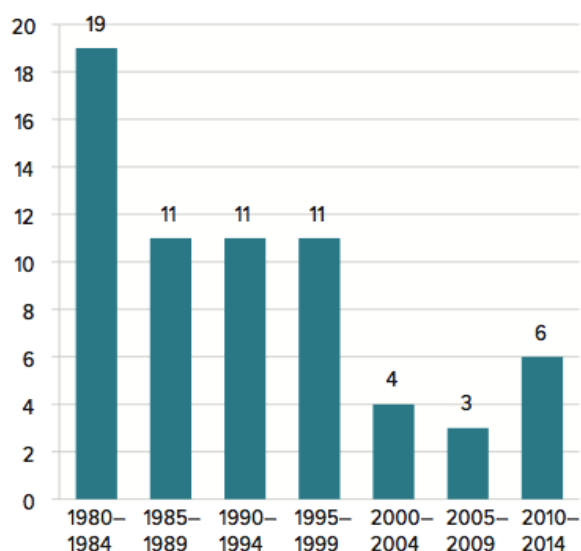
Mūsdienās mikroorganismu rezistence ir kļuvusi par nopietnu problēmu. Tiek apgalvots, ka radušos problēmu dēvē par antibakteriālo līdzekļu rezistences krīzi (skat. 1.7.1. att.) (Ventola, 2015; Zaman, *et al.*, 2017).



1.7.1. att. Antibakteriālo līdzekļu atklāšanas un rezistences veidošanās skala (Zaman, *et al.*, 2017; autora tulkots attēls).

ASV Slimību kontroles un novēršanas centra (CDC) jau 2013. gada ziņojumā teikts, ka civilizācija dzīvo post- antibakteriālo līdzekļu laikmetā. Savukārt, 2014. gada Pasaules Veselības organizācijas (WHO) ziņojumā tika minēts, ka radusies antibakteriālo līdzekļu rezistences krīze ir šausmīga un biedējoša, kā arī, jauno antibakteriālo līdzekļu ieviešana praksē ir krasi samazinājusies (skat. 1.7.2. att.) (Ventola, 2015).

Meticilīnrezistentie stafilokoki, precīzāk, meticilīnrezistentais *S. aureus* (MRSA) nogalina vairāk cilvēku (minēts amerikāņus), nekā kopsummā HIV/ AIDS, Parkinsona u.c. slimības (Ventola, 2015).



1.7.2. att. Jaunu lietošanā apstiprinātu antibakteriālo zāļu vielu skaits (Ventola, 2015).

Rezistentu mikroorganismu izplatīšanos veicina antibakteriālo līdzekļu nepārdomāta lietošana, t. i., nekorekts administrēšanas biežums, devas, lietošanas starplaiki un kopējais lietošanas ilgums. Viens no rezistences izplatīšanās nosacījumiem arī ir nenormāla daudzuma un iedarbības spektra antibakteriālo līdzekļu izmantošana lauksaimniecībā (Otto, 2009, 2012; Ventola, 2015).

1.7.1. β -laktāmu rezistence

Mūsdienās Gr(+) mikroorganismiem tiek klasificēti četri antibakteriālās rezistences mehānismi pret β -laktāmu grupas antibakteriāliem līdzekļiem, tie būtu:

1. antibakteriālās zāļu vielas modifikācija, inaktivēšana un destrukcija, ko veicina β -laktamāzes;
2. mainīta zāļu vielas mērķšūnu konfigurācija, ko veicina mikroorganisma šūnas membrānas transpeptidāzes;
3. mainīta antibakteriālo līdzekļu penetrācija caur šūnas membrānu, ko veicina šūnu membrānas porīni;
4. zāļu vielu efluksa pumpju darbība.

β -laktamāžu producēšana ir viens no galvenajiem Gr(+) mikroorganismu rezistences mehānismiem (Otto, 2012; Fisher, Mobashery, 2016; Brescó, *et al.*, 2017). β -laktamāzēm piemīt enzimatiskas īpašības, kas, hidrolizējot β -laktāma gredzenu, inaktivē zāļu vielas (Wilke, *et al.*, 2005). β -laktamāzes molekulāri klasificē pēc to nukleotīdu un aminoskābju sekvenču daudzuma. Visbiežāk β -laktamāzes iedala pēc Amblera klasifikācijas 4 klasēs no A līdz D. A,

C un D β -laktamāzes formas ir savstarpēji līdzīgas, mēdz dēvēt arī par serīna- aktīvajām β -laktāzēm. B klases β -laktamāzes ir strukturāli atšķirīgas, kuras mēdz dēvēt par metalo- β -laktamāzēm (Hall, Barlow, 2005).

β -laktamāžu ekspresiju inducē β -laktāmu grupas zāļu vielas, tām iedarbojoties uz BlaR šūnu membrānas receptoriem. BlaR ir transmembrānu proteīns, β -laktāmu iedarbības rezultātā tas acilējas jeb aktivējas, kas rezultējas ar laktamāžu ekspresiju (Fisher, Mobashery, 2016).

Tranpeptidāzes (PBS) spēj mainīt β -laktāmu mērķšūnu konfigurāciju. PBS iedala atkarībā no molekulārās masas- LMM un HMM enzīmos. HMM sīkāk iedala A klases daudzfunkcionālos un B klases monofunkcionālos transpeptidāžu enzīmos. LMM nepiemīt rezistences veicinošas īpašības. PBS spēj ietekmēt zāļu vielu saistīšanās spējas, kas samazina zāļu vielas afinitāti un sekojošu antibakteriālu efektu (Poole, 2004).

Izmainīta zāļu vielu pentetrācija un eflukss vienlaicīgi konfigurē β -laktāmu rezistenci. Viena no labāk izpētītajām šāda veida konfigurācijām ir MexAB-OprM zāļu vielu efluksa sistēma. Šī sistēma satur šūnas iekšējās membrānas RND transportiera “pumpi” MexB, šūnas ārējās membrānas porīnu OprM, kā arī šķīstošu, periplazmatisku MexA “pumpi”. Šādas konfigurācijas efluksa “pumpji” iesaistās arī citu zāļu vielu izvadīšanā un rezistences veidošanā (Wilke, *et al.*, 2005; Hall, Barlow, 2005).

1.7.2. Makrolīdu rezistence

Makrolīdi ir bieži administrēti, diez gan droši un efektīvi antibakteriālie līdzekļi. Tos izmanto arī gadījumos, ja pacientam novēro penicilīna intoleranci. Diemžēl, mikroorganismi samērā ātri iegūst rezistenci, tāpēc makrolīdu izmantošana ārstēšanās praksē ir ierobežota (Vester, Douthwaite, 2001; Gaynor, Mankin, 2003).

Makrolīdu grupas savienojumu rezistenci iedala divos potenciālos rezistences veidošanās mehānismos:

1. zāļu vielu eflukss;
2. mainīta zāļu vielas mērķšūnu konfigurācija, precīzāk, mainīta ribosomas subvienības konformācija.

Gr(+) mikroorganismos, kā arī stafilokokos ir noteiktu plazmīdu procesēti zāļu vielu efluksa mehānismi, kurus mediē *eprA* gēna ekspresija. Savukārt, epidermālā stafilokoka radniekam *S. aureus* zāļu vielu efluksu koordinē *msrA* gēna ekspresija. Zāļu eflukss ir atkarīgs no enerģijas daudzuma, ko var patērēt mikroorganisms (Zhong, Shortridge, 2000; He, *et al.*, 2016).

Kā jau iepriekš bija minēts, makrolīdu grupas savienojumu rezistence var veidoties, ja ir notikusi zāļu vielas mērķšūnu konfigurācija. Būtiska nozīme ir *erm* gēnu lokusam. Visbiežāk, konfigurāciju maiņu izraisa 23S rRNS nukleotīda demetilēšanās reakcijas. Reakcijas procesē Erm- tipa metiltransferāzes. Demetilēšanās reakcijas drastiski samazina makrolīdu afinitāti jeb spēju saistīties ar mērķšūnām (Pechère, 2001; Gaynor, Mankin, 2003).

1.7.3. Fluorhinolonu rezistence

Tiek minēts, ka Gr(+) un Gr(-) mikroorganismi diez gan ātri var kļūt rezistenti pret fluorhinoloniem (King, *et al.*, 2000). Fluorhinolonu rezistences veidošanās mehānismi var būt:

1. mainīta zāļu vielas mērķšūnu konfigurācija, t. i., DNS girāzēm un topoizomerāzēm;
2. zāļu vielu eflukss.

Fluorhinolonu grupas zāļu vielu mērķis Gr(+) mikroorganismiem, piem., epidermālajam stafilokokam, galvenokārt, ir topoizomerāze IV. Gadījumā, ja notiek mutācija fluorhinolonu rezistences noteicošajā gēna reģionā (quinolone resistance determining region), kurā atrodas gan, *gyrA*, *gyrB*, gan *parC* un *parB* gēni. Rezistence var veidoties, ja topoizomerāzes kodējošā gēnā *parC*, notiek mutācija, precīzāk, viena nukleotīda polimorfisms (Jacoby, 2005; Jackson, *et al.*, 2016).

Iedarbojoties uz Gr(+) mikroorganismiem, zāļu vielām ir jāspēj šķērsot šūnu citoplazmatisko membrānu. Zāļu vielu rezistence var veidoties gadījumos, ja ir notikušas mutācijas *norA* gēnā. Gēna pārekspresija pastiprināti stimulēs fluorhinolonu transportierus, kas arī sekmēs eflukšu (Jacoby, 2005; Jackson, *et al.*, 2016; Costa, *et al.*, 2018).

1.7.4. Linkozamīdu rezistence

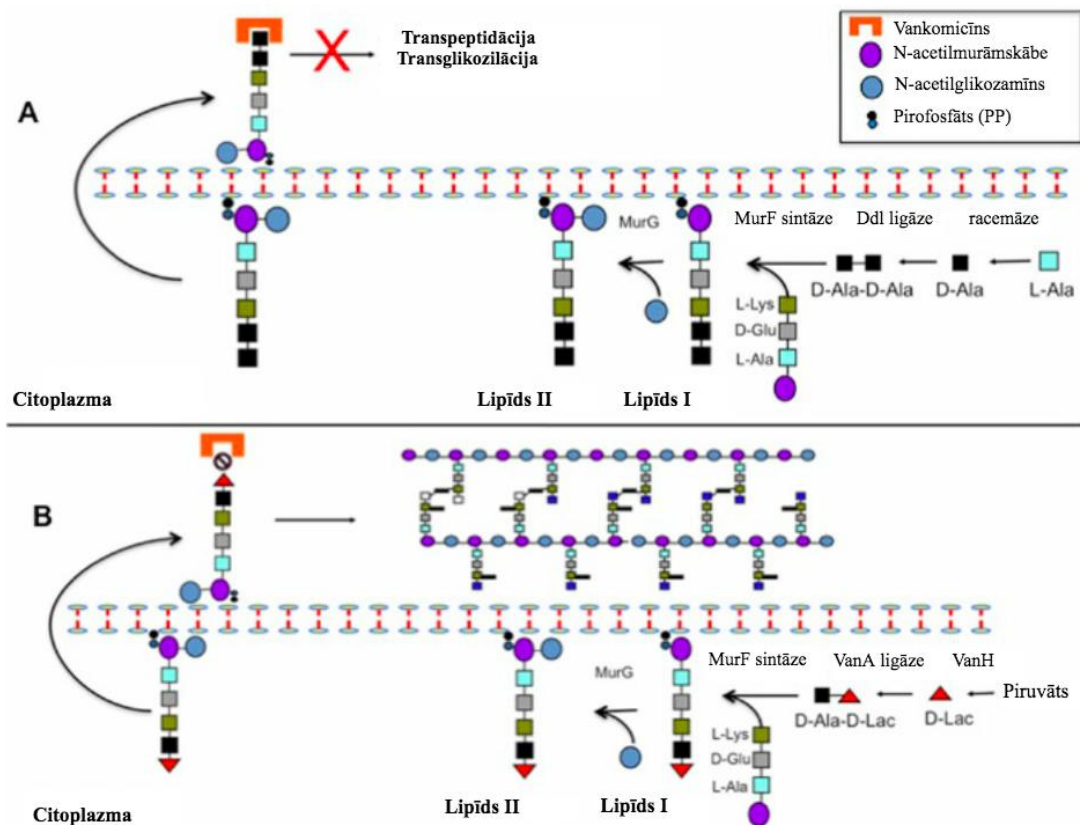
Linkozamīdu grupas savienojumu rezistenci līdzīgi kā makrolīdu gadījumā mediē *erm* gēna lokuss. *erm* gēna lokuss ekspresē klindamicīna rezistences potencējošo metilāzes aktivitāti. Pēc līdzīgas makrolīdu rezistences shēmas, rRNS metilāze pievieno vienu vai divas metilgrupas adenīnam 23S ribosomālajā subvienībā. Rezultātā izraisot, ribosomālās subvienības konformācijas izmaiņu, kas rezultējas ar samazinātu zāļu vielas spēju saistīties ar mērķšūnām. Erm- tipa metiltransferāžu skaits variē ap 33 dažādām gēnu secībām (Roberts, 2008; Munita, Arias, 2016). Kopš 1999. gada kopumā konstatētas 14 dažādas gēnu secības, kas kodē zāļu vielu eflukša pumpja pastiprinātu darbību, piem., *lsaA* un *lsaB*. Kā arī linkozamīdu rezistenci mediē dažādu enzīmu, piem., esterāžu, transferāžu, liāžu un fosforilāžu pārekspresija (Roberts, 2008).

1.7.5. Glikopeptīdu rezistence

Glikopeptīdu grupas savienojumu pieaugošā rezistence pēdējās dekādes laikā ir kļuvusi par nopietnu problēmu. Glikopeptīdi ir šaura spektra zāļu vielas, medicīnas praksē tos izmanto gadījumos, ja infekcijas dēļ, tiek apdraudēta pacienta dzīvība. Pirmie glikopeptīdu grupas savienojuma- vankomicīna- rezistences minējumi sāka parādīties 20. gs. 80. gadu beigās (Nunes, *et al.*, 2006; Binda, *et al.*, 2014).

Glikopeptīdu rezistence var veidoties gadījumos, ja pentapeptīda struktūras D-Ala terminālo galu mutāciju rezultātā (par to atbild mutants *van* gēna lokuss mikroorganismu hromosomās) aizvietos ar D-Lac (D-laktātu) vai D-Ser (skat. 1.7.5. att.). Jaunizveidotais pentapeptīds ar D-Lac nukleotīdu secību nodrošinās visaugstāko rezistences pakāpi, savukārt, D-Ser nukleotīdu secība- zemāku. Mutācija ir arī priekšnosacījums mikroorganismu šūnas membrānas sabiezēšanai (Courvalin, 2006; Binda, *et al.*, 2014).

No 2002. gada, kad krasi sāka pieaugt pirmās paaudzes glikopeptīdu rezistences gadījumu skaits, sāka meklēt risinājums, kā varētu radušos situāciju uzlabot. Tika izveidota otrā glikopeptīdu paaudze, kas ir pussintētiski dabasvielu atvasinājumi. ASV Pārtikas un zāļu pārvalde 2009. gadā apstiprināja lietošanai pirmo jaunās paaudzes zāļu vielu, t.i., telavancīnu. Strukturāli no vankomicīna, telavancīns atšķiras ar to, ka telavancīna struktūrā ir pievienotas hidrofobas un hidrofilas funkcionālās grupas. Hidrofobās funkcionālās grupas garums tika piemeklēts tā, lai optimizētu antibakteriālo iedarbību gan pret MRSA (metecilīnrezistentu *S. aureus*), gan pret VRE (vankomicīna rezistentu enterokoku). Savukārt, hidrofilā funkcionālā grupa nodrošina labāku zāļu vielas uzsūkšanās spēju, izplatīšanos, metabolismu un ekskreciju (uzlabotāks ADME profils) (Pootoolal, *et al.*, 2002; Courvalin, 2006; Binda, *et al.*, 2014).



1.7.5. att. Vankomicīna darbības mehānisms (A) un sekojošs rezistences mehānisms (B) (Munita, Aries, 2016; autora tulkots attēls).

1.8. Koagulāzes negatīvo stafilokoku meticilīnrezistence

Kā jau iepriekš attēlā bija norādīts (skat. 1.7.1. att.), mikroorganismu meticilīnrezistence ir izveidojusies jau diez cik sen un, diemžēl, pēc penicilīnu atklāšanas- ātri (Ventola, 2015). Meticilīns ir šaura darbības spektra β -laktāmu grupas antibakteriāls līdzeklis (Rolo, *et al.*, 2017;

Viens no svarīgākajiem koagulāzes negatīvo stafilokoku rezistences mehānismiem tiek asociēts ar *mecA* gēnu, kas, savukārt, koordinē rezistences veidošanos visā, lielajā β -laktāmu grupā (Namvar, *et al.*, 2014; Kleinschmidt, *et al.*, 2015; Fisher, Mobashery, 2016; Rolo, *et al.*, 2017). *mecA* gēns kopā ar regulatorajiem elementiem ir lokalizēts masīvā un mobilā DNS struktūrelementā, ko sauc par stafilokoku hromosomu kaseti *mec* (*SCCmec*) (Otto, 2009, 2012; Namvar, *et al.*, 2014). *mecA* gēna atrašanās vieta hromosomas lokusā ir vienmēr viena un tā pati, t.i., 3' *orfX* galā (kodē RNS metiltransferāzi) (Rolo, *et al.*, 2017).

KONS meticilīnrezistence var izpausties gadījumos, ja *SCCmec* hromosomālā kasete spēs iekļūt stafilokoku genomā. *mecA* ir determinantais jeb noteicošais gēns, kas kodē penicilīnu saistošos proteīnus (PBP, galvenokārt, meticilīnrezistentu PBP2 α). PBP2 α raksturo zema β -laktāmu afinitāte. Veiktie zinātniskie pētījumi pierādīja to, ka jau tā zemo PBP2 α

acilēšanās pakāpi (pastiprinātu acilēšanu vajadzētu izraisīt β -laktāmiem), papildus samazina transpeptidāžu (TP) aktivitāti, jo tās nodrošina šūnas membrānas elastīgumu. Tiek minēts, ka serīna atrašanās vietai 403. pozīcijā piemīt kritiska nozīme β -laktāmu antibakteriālās terapijas efektivitātei (Ohlssen, *et al.*, 2006; Wang, *et al.*, 2016).

Mūsdienās meticilīnrezistence un meticilīnrezistentā *S. epidermidis* (MRSE) izplatība pasaulē ir sasniegusi teju 90% robežu (Cheung, Otto, 2010). Neskatoties uz *mecA* nozīmi rezistentu stafilokoku epidemioloģijā, joprojām, gēna evolūcija un izplatīšanās ir palikusi jautājumu un noslēpumu apvīta (Otto, 2009, 2012; Qin, *et al.*, 2017).

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Pētījuma apraksts

Bakalaura darbs tika izstrādāts Tuberkulozes un plaušu slimību valsts centra (vad. Dr. Norvaiša) un Latvijas Universitātes mikrobioloģijas laboratorijās.

Bakalaura darba laikā tika analizēti 2017. gadā ievākti 43 *Staphylococcus epidermidis* baktēriju paraugi. Paraugi tika ievākti no asinīm (hemokultūra) un intravaskulāriem katetriem, operāciju materiāliem. Izolētās baktērijas pēc identifikācijas tika uzglabātas stobriņos, kas piemēroti ilgstošai uzglabāšanai saldētavā (*CryoBank*TM).

Baktēriju paraugiem- izolātiem tika noteikta antimikrobiālā rezistence pret ciprofloksacīnu, klindamicīnu, eritromicīnu, cefoksitīnu un vankomicīnu, izmantojot BBLTM DDT. Tālāk tika noteikta *S. epidermidis* izolātu biofilmas veidošanās spējas, izmantojot mikrotitru plates metodi. *mecA* gēna klātbūtne izolātos tika noteikta, izmantojot *S. epidermidis* DNS un Geno TypeTM testu, tas ir, lietojot PCR (amplifikācija) ar sekojošu hibridizāciju uz nitrocelulozes stripa.



2.1. att. Darba vide mikrobioloģijas laboratorijā (autora attēls)

2.2. Materiāli

2.2.1. Aparatūra un trauki

Bakalaura darba pētnieciskajā daļā tika izmantotas dažādas aparatūras un to sistēmas. Visi izmantotie materiāli apkopoti tabulās (skat. 2.2.1.1. un 2.2.1.2. tabulu).

2.2.1.1. tabula

Pētījumā izmantotā aparatūra, autora sastādīta tabula

Nosaukums	Modelis	Ražotājs, ražotājvalsts
Autoklāvs	MLS- 302011	Sanyo, Japāna
Centrifūga	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Vācija
Elektroniskie svāri	Precisa	Precisa Gravimetrics AG, Šveice
Laminārās plūsmas skapis	Biowizard 130	Kosair KR, Somija
Ledusskapis	Electrolux	Electrolux, Zviedrija
Maināma tilpuma pipetes	P1000, 200, 100, 10	Gilson, Vācija
PCR termocikleris	Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems, ASV
Saldētava	Indesit	Indesit, Vācija
Termostats	Heraeus	Function Line, Vācija
Turbidimetrs (duļķainības mērītājs)	BioMérieux	BioMérieux, Francija
Ultraskaņas vanna	Emag EMMI 30HC	Emag AG, Vācija
Vorteksers	Vortex V- 01/3	Labotek, Dānija

2.2.1.2. tabula

Pētījumā izmantotie materiāli un trauki, autora sastādīta tabula

Nosaukums	Apraksts	Ražotājs, ražotājvalsts
Autoklavējamās tvertnes	500mL, 1000mL	Boeco, Vācija
E- testa sloksnītes	30 gab. iepakojumā	BioMérieux, Francija
Eppendorf mikromēģenes (centrifūgas stobriņi)	1,5mL	Deltalab, Spānija

Kriobankas	Stobriņi ilgstošai uzglabāšanai saldētavā	Copan, ASV
Petri plates	Ø 10cm	Anumbra, Čehija
Pipešu uzgaļi	100µL, 200µL, 1000µL	Finntip, Somija
Plastmasas inokulācijas cilpas	20 gab. iepakojumā	LP Italiana, Itālija
Sterili vates kociņi	10 gab. iepakojumā	Deltalab, Spānija

2.2.2. Mikrobioloģiskās barotnes

S. epidermidis kultivēšanai un antibakteriālās rezistences noteikšanai tika izmantotas specifiskas barotnes. Mikroorganismu kultivēšanai izmantoja triptikāzes sojas agāru (TSA, *Oxoid CM0131*) ar 5% aitas asins klātbūtni. Barotnes sastāvs ir gramos uz litru, t. i., 50mL aitas asins, 15,0 triptona, 15,0 agāra, 5,0 sojas peptona, 5,0 nātrija hlorīda. 40,0 sausās barotnes šķīdina 1000mL destilētā ūdenī, pēcāk autoklavē 15 min. 121°C temp. Atdzisusiai barotnei (47-49°C) pievieno 50mL 5% aitas asinis. Barotnes pH svārstās no 7,1 līdz 7,5.

Savukārt, antibakteriālās rezistences noteikšanai izmantoja *Mueller- Hinton* agāru (*Scharlau, 01- 136*). Barotnes sastāvs ir gramos uz litru, t.i., 17,5 peptona, 17,0 agāra, 2,0 liellopa gaļas ekstrakta, 1,5 cietes. 38,0 sausās barotnes šķīdina 1000mL destilētā ūdenī, autoklavē 15 min. 21°C temp. Barotnes pH svārstās no 7,1 līdz 7,3.

2.2.3. Inokulātu sagatavošana un inokulēšana

Inokulāts jeb mikroorganismu suspensija tika sagatavots, izmantojot *S. epidermidis* kolonijas, kuras vairojušās neselektīvā agāra platē, izvēlēto koloniju, pārvietojot fizioloģiskā šķīduma mēģenē. Inokulāta turbiditāti standartizē, izmantojot automātisku ierīci, kas paredzēta mikroorganismu turbiditātes noteikšanai fizioloģiskā šķīduma mēģenē. Inokulāta turbiditāti izsaka *McFarland* vienībās, to salīdzinot ar 0,5McF standartvērtību. 0,5McF standartvērtība ir ekvivalenta $1,5 \times 10^6$ kvv/mL.

Plašu inokulēšanā tika izmantots ar inokulātu piesūcināts vates tampons. Ar tampona palīdzību, *Mueller- Hinton* agāra plates tika rūpīgi inokulētas, tamponu maigi piespiežot pie plates virsmas. Inokulēšana tika veikta 3 reizes, katrā no reizēm, plati pagriežot par 60° leņķi.

2.3. *S. epidermidis* fenotipiskās izmeklēšanas metodes

2.3.1. Antibakteriālās jutības noteikšana

2.3.1.1. Disku difūzijas tests

Antibakteriālās jutības noteikšanai izmanto disku difūzijas jeb *Kirby-Bauer* antibakteriālo līdzekļu testu. Testa būtība ir vienkārša- ar antibakteriālu vielu piesātināta papīra diska (Ø 6mm) difūzija agāra gēlā.

Jutības noteikšanai izmanto jau sagatavoto 0,5McF inokulātu. Tālāk seko *Mueller-Hinton* agāra plašu inokulēšana. Pēdējais solis, uz inokulētās plates ar disku dispensera palīdzību, ar antibakteriālu līdzekli piesātinātie diski tiek novietoti vienādā attālumā, vismaz 24mm atstatumā no viena diska centra līdz otrā diska centram. Plates tiek inkubētas 24 stundas 36°C temperatūrā, pēc inkubācijas, nosakot diametru, seko savdabīgo inhibīcijas zonu mērīšana. Atbilstoši interpretācijas kritērijiem M100-S26 2018 tiek novērtēti iegūtie rezultāti, R- rezistents, I- vidēji jutīgs, S- jutīgs.

Izmantotie 5 antibakteriālo līdzekļu diski satur- vankomicīnu, cefoksitīnu, eritromicīnu, ciprofloksacīnu un klindamicīnu. Disku difūzijas testā izmantotie diski, to saīsinājumi un koncentrācijas ir apkopotas 2.3.1.2. tabulā.

2.3.1.2. tabula

BBL™ DDT metodē izmantotie diski, autora sastādīta tabula

Nr.p.k.	Antibakteriāls līdzeklis, saīsinājums	Diska koncentrācija, µg (Ø 6mm)
1.	Vankomicīns, VA	30
2.	Cefoksitīns, FOX	30
3.	Eritromicīns, ER	15
4.	Ciprofloksacīns, CIP	5
5.	Klindamicīns, CC	2

2.3.2. Biofilmas producēšanās noteikšana

2.3.2.1. Mikrotitru plates metode

S. epidermidis biofilmu veidošanas spēju nosaka, izmantojot mikrotitru plates metodi. Pētījumā lietota modificēta *Christensen et al.*, 1987 metode. Veicot testēšanu, tika izmantoti *S. epidermidis* references celmi, ņemot ATCC 35984 (RP62A) kā biofilmas veidojošu un ATCC 12228 kā biofilmas neveidojošu.

S. epidermidis suspensija tika inkubēta 24 stundas 37°C temperatūrā 10% triptikāzes sojas buljonā (*Oxoid CM 1065*). Pēc inkubācijas tika sagatavots atšķaidījums, attiecībā 1: 100, ņemot. 200µL atšķaidījuma tika inokulēti trijos lauciņos, izmantojot sterilu 96 lauciņu polistirēna mikrotitru plati (*Sarstedt, Inc, Newton, ASV*). Kā negatīvā kontrole tika ņemts sterils triptikāzes sojas buljons bez *S. epidermidis* tīrkultūras suspensijas. Sagatavotā plate tiek inkubēta 24 stundas 37°C temperatūrā. Pēc inkubācijas, tiek nolieta suspensija un plate tiek divreiz skalota ar 0,9% NaCl šķīdumu. Pēc skalošanas plati žāvē 45 minūtes 55°C temperatūrā. Pēc nožūšanas mikrotitru plates lauciņus krāso 10 minūtes, izmantojot 0,5% safranīna šķīdumu. Pēc krāsošanas plate tiek vēlreiz skalota ar 0,9% NaCl šķīdumu. Vizuāli tika novērtēti biofilmu veidojošie vai neveidojošie *S. epidermidis* paraugi.

2.4. *S. epidermidis* genotipiskās izmeklēšanas metodes

2.4.1. DNS izdalīšana

DNS izdalīšana tika veikta no *S. epidermidis* tīrkultūras. Vispirms no barotnes, kurā tika kultivētas *S. epidermidis* kolonijas, ar plastmasas cilpas palīdzību tiek paņemtas *S. epidermidis* kolonijas un pārnestas uz paraugiem- stobriņiem, stobriņos kolonijas tiek suspendētas 200µL TE buferī. Nākamajā solī, stobriņi tika ielikti termoblokā karsēties 20 minūtes 80°C temperatūrā. Pēc karsēšanas stobriņi tiek atdzesēti līdz laboratorijas temperatūrai. Atdzisušiem stobriņiem tika pievienots 50µL lizocīma ūdens šķīdums, iegūto maisījumu samaisa ar vortekseri. Stobriņi tiek ievietoti termostatā, tos inkubē 1 līdz 2 stundas 37°C temperatūrā. Pēc inkubēšanas katram stobriņam tiek pievienots maisījums, kas sastāv no 75µL proteīnkināzes K un 10% SDS. Pēc maisījuma pievienošanas stobriņi tiek atkārtoti karsēti termoblokā 10 minūtes 65°C temperatūrā. Pēc karsēšanas, katram stobriņam pievieno 100µL 5M NaCl šķīdumu un 75µL CTAB, ar vorteksera palīdzību stobriņa saturs tiek lēni samaisīts, un, atkal, tie tiek likti

karsēties termoblokā 10 minūtes 65°C temperatūrā. Pēc karsēšanās, katram stobriņam tiek pievienots 750µL hloroforma- izoamilspirta maisījums. Rūpīgi samaisot, stobriņus centrifugē 30 minūtes pie 14 000 apgr./min. Pēc centrifugēšanas augšējā jeb alikvotā fāze tiek pārnesta jaunā stobriņā, un katram jaunajam stobriņam ar alikvoto fāzi tiek pievienotas trīs piektdaļas, no esošā apjoma, izopropanola. Pēc rūpīgas samaisīšanas stobriņus liek centrifugēt 30 minūtes pie 14 000 apgr./min. Pēc tam tiek nolieta augšējā fāze, savukārt, radušās nogulsnes tiek skalotas ar 500µL etanola. Stobriņi tiek atkārtoti centrifugēti 30 minūtes pie 14 000 apgr./min. Pēc pēdējās centrifugēšanas tiek nolieta augšējā fāze un izveidojušās nogulsnes žāvē laboratorijas temperatūrā. Pēdējā solī katram stobriņam tiek pievienots 50µL TE buferis. Izšķīdusī DNS turpmāk var tikt izmantota polimerāzes ķēdes reakcijai (PCR), Geno Type™ testam.

2.4.2. Amplifikācija

Amplifikācijas maisījumi (50µL) tiek sagatavoti sterilā telpā. Katram pētāmajam DNS paraugam tiek sagatavots atsevišķs amplifikācijas maisījums. Maisījums satur- 35µL PNM jeb praimeru nukletīdu kombināciju, 5µL polimerāzes inkubācijas bufera, 5µL pētāmā DNS parauga (20- 100ng DNS), 1µL MgCl₂ šķīdumu, vienu līdz divām termostabilas DNS polimerāzes, dejonizēta ūdens, to pievieno, lai kopējais amplifikācijas maisījuma tilpums sanāktu 50µL. Amplifikāciju veic programmējamā termociklerī, veiktie cikli apkopoti 2.4.2. tabulā.

2.4.2. tabula

Amplifikācijas cikli, autora sastādīta tabula

Laiks, s	Temperatūra, °C	Ciklu skaits, n
300	95	1
30	95	10
120	58	
25	95	20
40	53	
40	70	
480	70	1

2.4.3. Hibridizācija

Amplifikācijas procesā radušies produkti tiek ķīmiski denaturēti. Biotīna iezīmēti, komplementāri amplifikācijas fragmenti hibridizējas ar zondēm. Seko skalošanas procesi, tiek atsijāti nespecifiskie amplifikācijas produkti. Pēc skalošanas tiek pievienots CON-C koncentrāts (streptavidīna konjugēta sārmainā fosfatāze), kurš neatgriezeniski saistās ar biotīnu. Hibridizācijas rezultātā, uz nitrocelulozes stripa oligonukleotīdu zondēm parādās purpurkrāsas precipitāts.

GenoType *Staphylococcus* (Hain Lifescience GmbH, Vācija) testa komplektā ietilpst:

1. nitrocelulozes stripi, kuri satur 7 imobilizētas oligonukleotīdu, t. i., (CC) konjugācijas kontroles, (UC), lokusu kontroles- *mecA* un *mecC*, PVL, kā arī *S. epidermidis*, *S. aureus* zondes;
2. PNM;
3. denaturācijas šķīdums (DEN), satur <2% NaOH un krāsvielu <0,001% timolzilo;
4. hibridizācijas buferis (HYB), satur surfaktantus;
5. skalošanas šķīdums (STR), satur 1,5% NaCl šķīdumu un surfaktantus;
6. skalošanas šķīdums (RIN), satur 1,0% NaCl šķīdumu;
7. koncentrēts konjugāta šķīdums (CON-C), satur streptavidīna konjugēto sārmaino fosfatāzi;
8. konjugāta buferis (CON-D), satur 1,0% apstādinošo reaģentu;
9. substrāta koncentrāts (SUB-C), satur dimetilsulfoksīdu;
10. substrāta buferis (SUB-D), satur <1,0% MgCl₂ un NaCl.

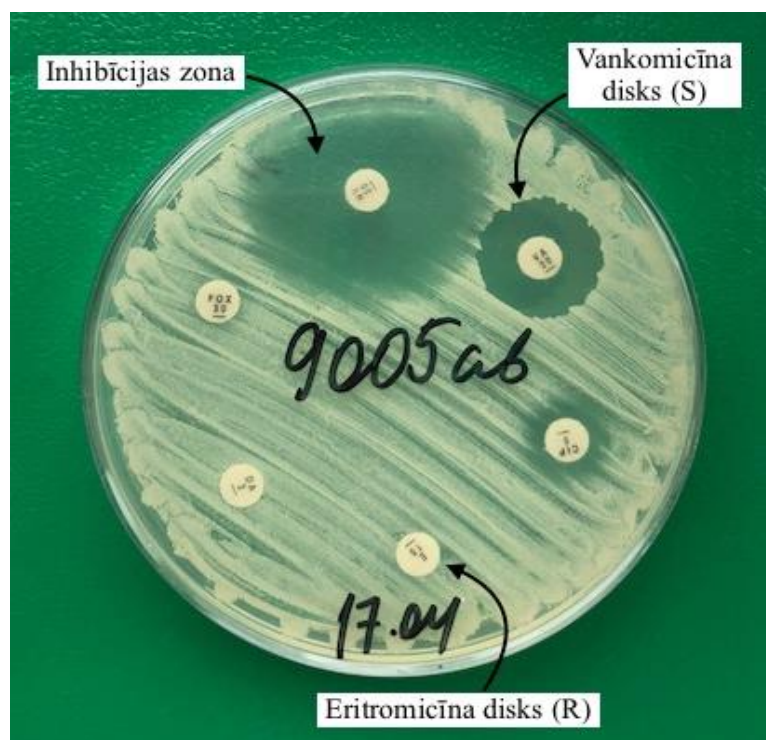
2.5. Rezultātu statistiskās apstrādes metodes

Rezultātu apstrāde un analīze tika veikta, izmantojot *MS Excel 2017* un LIS (laboratorijas informācijas sistēmas) statistiskos datus.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. BBL™ DDT metodes rezultāti

Izmantojot disku difūzijas jeb *Kirby-Bauer* antibakteriālo līdzekļu jutības testu, tika noteikta *S. epidermidis* jutība pret piecām antibakteriālām zāļu vielām. Testa laikā tika analizēti no 01.01.2017. līdz 31.12.2017. ievākti 43 epidermālā stafilokoka izolāti. Pēc diennakts ilgas plašu inkubēšanas tika iegūti rezultāti un atbilstoši pēc interpretācijas kritērijiem M100-S26-2018 tika interpretēti sekojoši rādītāji (skat. 3.1. tabulu). S (jutīgs)- nozīmē, ka mikroorganisma izraisīto iekaisumu un patoloģiju terapijas efektivitāte būs efektīva, administrējot antibakteriālo līdzekli ierastās devās. I (vidēji jutīgs)- nozīmē, ka mikroorganisma izraisīto iekaisumu un patoloģiju terapijas efektivitāte būs vidēji efektīva, administrējot antibakteriālo līdzekli ierastās devās, jo tiks novērota mikroorganismu rezistence. R (rezistents)- nozīmē, ka mikroorganisma izraisīto iekaisumu un patoloģiju terapijas efektivitāte būs neefektīva, administrējot antibakteriālo līdzekli ierastās devās, attiecīgi notiks devu korekcijas vai arī, tiks administrēta cita zāļu viela.



3.1.1. att. BBL™ DDT metodes rezultātu attēlojums, *Mueller-Hinton* agāra plate pēc 24h inkubēšanas (autora attēls)

Lai uzskatāmāk un vieglāk varētu gan uztvert, gan analizēt izmantotās metodes rezultātus, iegūtos datus nosacīti jāsadala divās grupās, datus sagrupējot, pēc rezistences un jutīguma rādītājiem.

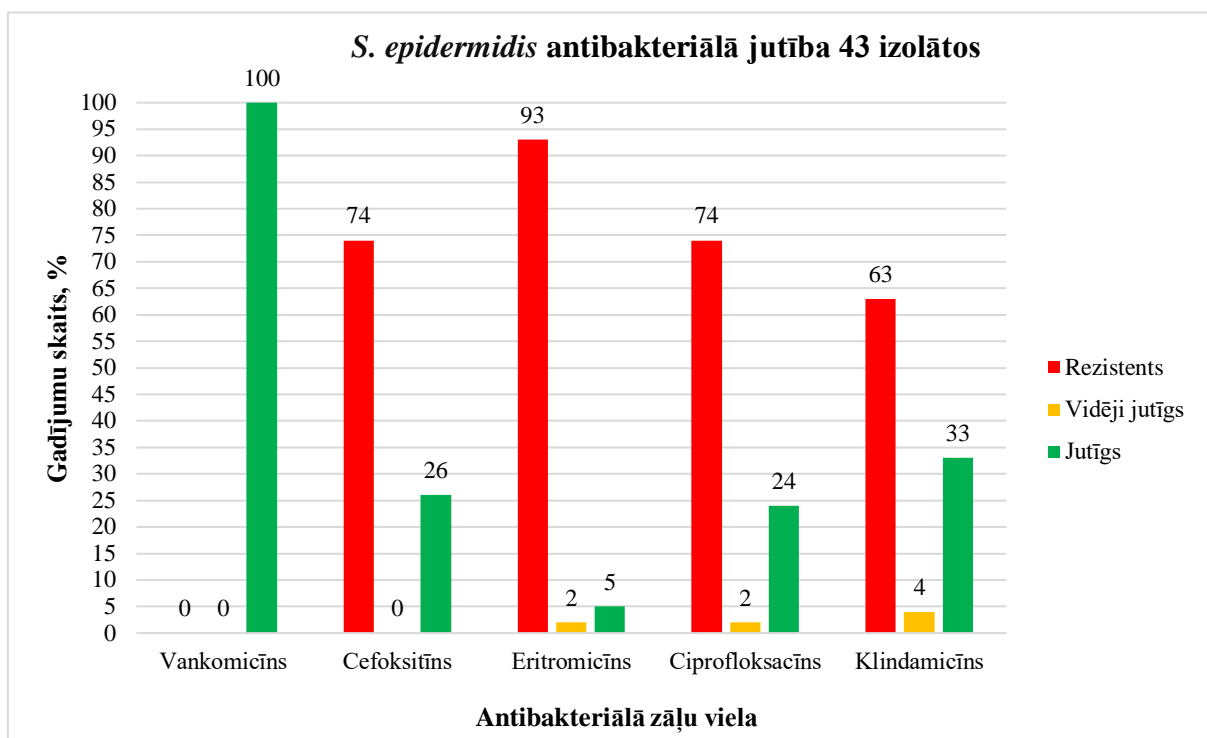
3.1. tabula

***S. epidermidis* antibakteriālā jutība 43 izolātos**

Antibakteriālā zāļu viela Interpretācijas kritērijs	Vankomicīns, VA (30µg)	Cefoksitīns, FOX (30µg)	Eritromicīns, ER (15µg)	Ciprofloksacīns, CIP (5µg)	Klindamicīns, CC (2µg)
Rezistents (R)	0	32 (74%)	39 (93%)	32 (74%)	27 (63%)
Vidēji jutīgs (I)	0	0	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)
Jutīgs (S)	43 (100%)	11 (26%)	2 (5%)	10 (24%)	14 (33%)

Tabulā atspoguļotie BBL™ DDT testa rezultāti liecina, ka visaugstākā *S. epidermidis* rezistence, 93% gadījumu (39 no 42 izolātiem, eritromicīns ir vienīgā zāļu viela, kuru pētot, tika izmantoti 42, nevis 43 *S. epidermidis* izolāti), ir novērojama pret eritromicīnu. Zemāku *S. epidermidis* rezistenci novēro pret cefoksitīnu un ciprofloksacīnu, 74% gadījumu (32 no 43 izolātiem). Otrā viszemāko epidermālā stafilokoka rezistenci 63% gadījumu (27 no 43 izolātiem) novēro pret klindamicīnu. Savukārt, pret vankomicīnu nenovēro nevienu epidermālā stafilokoka rezistences gadījumu.

Analizējot epidermālā stafilokoka jutīguma rādītājus nākas secināt, ka visaugstākā *S. epidermidis* jutība, 100% gadījumu, ir novērojama pret vankomicīnu. Zemāku *S. epidermidis* jutību, 33% gadījumu (14 no 43 izolātiem), novēro pret klindamicīnu. Nākamā zemāko epidermālā stafilokoka jutību, 26% gadījumu (11 no 43 izolātiem), novēro pret cefoksitīnu un 24% gadījumu (10 no 43 izolātiem) pret ciprofloksacīnu. Savukārt, viszemāko *S. epidermidis* jutību, 5% gadījumu (diviem no 43 izolātiem), novēro pret eritromicīnu.



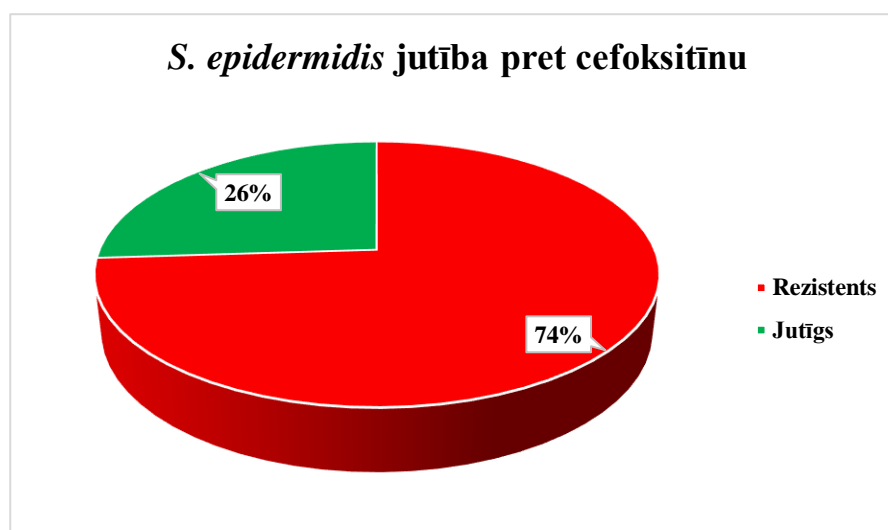
3.1.2. att. *S. epidermidis* izolātu jutība pret antibakteriālām zāļu vielām

Diagrammā (skat. 3.1.2. att.) var uzskatāmāk redzēt izmantotās BBL™ DDT metodes rezultātus. Diagrammā ir atspoguļotas arī tās zāļu vielas, pret kurām epidermālais stafilokoks ir vidēji jutīgs. *S. epidermidis* vidēju antibakteriālo līdzekļu jutību uzrādīja pret klindamicīnu (4% gadījumu, diviem no 43 izolātiem), kā arī, pret eritromicīnu un cipprofloksacīnu, t.i., 2% gadījumu, vienam no 43 izolātiem.

Manis veiktajā pētījumā, izmantojot BBL™ DDT metodi, secināju, ka vankomicīns ir vienīgā zāļu viela, pret kuru *S. epidermidis* piemīt visaugstākā jutība. Visi epidermālā stafilokoka izolāti bija jutīgi pret pirmās paaudzes glikopeptīdu grupas zāļu vielu. Salīdzinot manis iegūtos rezultātus, ar citiem veiktajiem pētījumiem un zinātniskajām publikācijām, nākas secināt, ka visaugstāko jutību pret vankomicīnu novēroja un apstiprināja Tunisijā veiktā pētījumā starp 74 *S. epidermidis* izolātiem, no kuriem 55 izolāti bija hemokultūras un 22 izolātu paraugi no intravaskulāriem katetriem (Bouchami, *et al.*, 2006), Zviedrijā veiktā pētījumā starp 173 *S. epidermidis* izolātiem, no kuriem 73 izolāti bija hemokultūras, 55 izolātu paraugi no ķirurģiskām brūcēm un pārējie 45 izolātu paraugi no citām virsmām, piem., intravaskulāriem katetriem, abscesa un bronhu skalojumiem (Widerström, *et al.*, 2009), kā arī ASV veiktā pētījumā starp 71 *S. epidermidis* izolātiem, no kuriem 49 izolāti bija hemokultūras (Mendes, *et al.*, 2012).

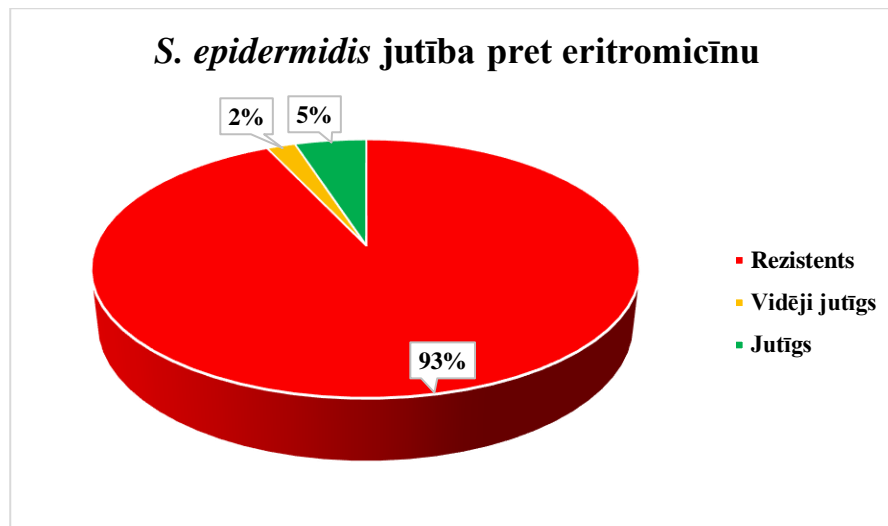
Kā jau iepriekš bija minēts, vankomicīnu uzskata kā vienu no pēdējās izvēles antibakteriāliem līdzekļiem dzīvībai bīstamo iekaisumu un infekciju ārstēšanā. Vankomicīna administrēšana KONS izraisītu patoloģiju gadījumos ir efektīva un terapijas pozitīva, jo *S. epidermidis* jutības pakāpe pret zāļu vielu ir ievērojami augsta.

Sīkāk apskatot otrās paaudzes cefalosporīnu grupas savienojumu, cefoksitīnu, var novērot, ka *S. epidermidis* jutība pret cefoksitīnu, salīdzinot ar vankomicīnu, ir ievērojami samazinājusies (skat. 3.1.3. att.).



3.1.3. att. Procentuāls *S. epidermidis* jutības atspoguļojums pret cefoksitīnu

Viens no salīdzinoši visaugstākajiem rezistences un zemiem jutīguma rādītājiem bija cefoksitīnam. Salīdzinot manis iegūtos rezultātus, ar citiem veiktajiem pētījumiem un zinātniskajām publikācijām, nākas secināt, ka līdzīgus rādītājus un rezultātus ieguva, un apstiprināja Zviedrijā veiktā pētījumā starp 33 *S. epidermidis* izolātiem, 84% gadījumu (28 no 33 izolātiem) bija rezistenti pret zāļu vielu, un 16% gadījumu (pieci no 33 izolātiem) bija jutīgi pret cefoksitīnu (Hellmark, *et al.*, 2009). Manuprāt, šajā gadījumā ir svarīgi atzīmēt to, ka Zviedrijā veiktā pētījumā, tika izmantota 10µg cefoksitīna deva, savukārt, manis veiktajā pētījumā tika izmantota 30µg deva. Līdzīgus rādītājus un rezultātus ieguva, un apstiprināja Beļģijā veiktā pētījumā starp 74 *S. epidermidis* izolātiem, 54% gadījumu (40 no 74 izolātiem) bija rezistenti pret cefoksitīnu (Argudín, *et al.*, 2015).



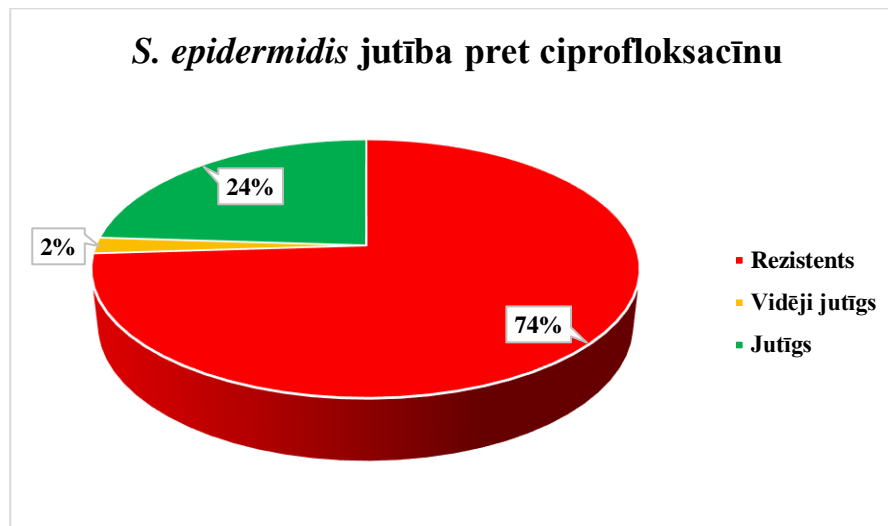
3.1.4. att. Procentuāls *S. epidermidis* jutības atspoguļojums pret eritromicīnu

Visaugstākā epidermālā stafilokoka rezistence un zemākā jutība tika novērota pret makrolīdu grupas savienojumu- eritromicīnu (skat. 3.1.4. att.).

Pētījuma rezultāti liecina, ka eritromicīns ir viena no zāļu vielām, pret kuru *S. epidermidis* uzrāda vidēju jutību. Salīdzinot manīs iegūtos rezultātus, ar citiem veiktajiem pētījumiem un zinātniskajām publikācijām, nākas secināt, ka līdzīgus rādītājus un rezultātus ieguva, un apstiprināja Tunisijā veiktā pētījumā starp 77 *S. epidermidis* izolātiem, 62% gadījumu (48 no 77 izolātiem) (Bouchami, *et al.*, 2006), Zviedrijā veiktā pētījumā starp 33 *S. epidermidis* izolātiem, 67% gadījumu (22 no 33 izolātiem) (Hellmark, *et al.*, 2009), kā arī Beļģijā veiktā pētījumā starp 74 *S. epidermidis* izolātiem, 67% gadījumu (50 no 74 izolātiem) (Argudín, *et al.*, 2015).

Visos minētajos pētījumos, visaugstāko antibakteriālo līdzekļu rezistenci novēroja pret eritromicīnu. Procentuāli salīdzinot, var novērot redzamu atšķirību starp maniem iegūtiem rezultātiem un publikācijās minētajiem. Tomēr visos gadījumos, eritromicīns bija viena no tām zāļu vielām, pret ko *S. epidermidis* bija pats nejutīgākais.

Sīkāk apskatot fluorhinolonu grupas savienojumu ciprofloksacīnu, var novērot, ka līdzīgi kā cefoksitīna gadījumā, ciprofloksacīnam ir salīdzinoši augsti rezistences un salīdzinoši zemi epidermālā stafilokoka jutības rādītāji (skat. 3.1.5. att.).

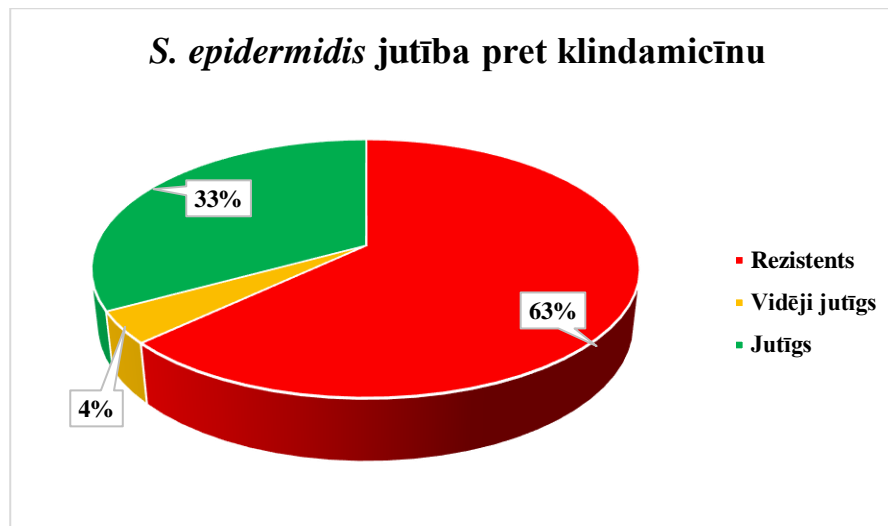


3.1.5. att. Procentuāls *S. epidermidis* jutības atspoguļojums pret ciprofloksacīnu

Pētījuma rezultāti liecina, ka ciprofloksacīns ir viena no zāļu vielām, pret kuru *S. epidermidis* uzrāda vidēju jutību. Salīdzinot manis iegūtos rezultātus, ar citiem veiktajiem pētījumiem un zinātniskajām publikācijām, nākas secināt, ka līdzīgus rādītājus un rezultātus ieguva, un apstiprināja Zviedrijā veiktā pētījumā starp 134 *S. epidermidis* izolātiem, 81% gadījumu (109 no 134 izolātiem) (Hamad, *et al.*, 2015). Atšķirīgi rezultāti tika sasniegti Beļģijā veiktā pētījumā starp 74 *S. epidermidis* izolātiem, kur ciprofloksacīna rezistenci novēroja 49% gadījumu (36 no 74 izolātiem) (Argudín, *et al.*, 2015). Rezistenci novēro nosacīti retāk, nekā manis veiktajā pētījumā. Savukārt, vēl vienā Zviedrijā veiktā pētījumā, ciprofloksacīna rezistences klātbūtne epidermālā stafilokoka izolātos tika noteikta procentuāli vēl augstāk, t.i., 79% gadījumu (26 no 33 izolātiem) (Hellmark, *et al.*, 2009).

Analizējot gan savus iegūtos datus, gan publikācijās minētos varu secināt, ka ciprofloksacīns ir tā zāļu viela, kas tomēr var būt efektīva KONS izraisītu infekciju terapijā. Varbūtība, ka *S. epidermidis* būs jutīgs pret ciprofloksacīnu ir augstāka, nekā pret to pašu eritromicīnu.

Sīkāk apskatot linkozamīdu grupas savienojumu klindamicīnu, var novērot, ka zāļu vielai ir salīdzinoši zemāki rezistences un salīdzinoši augstāki epidermālā stafilokoka jutības rādītāji (skat. 3.1.6. att.).



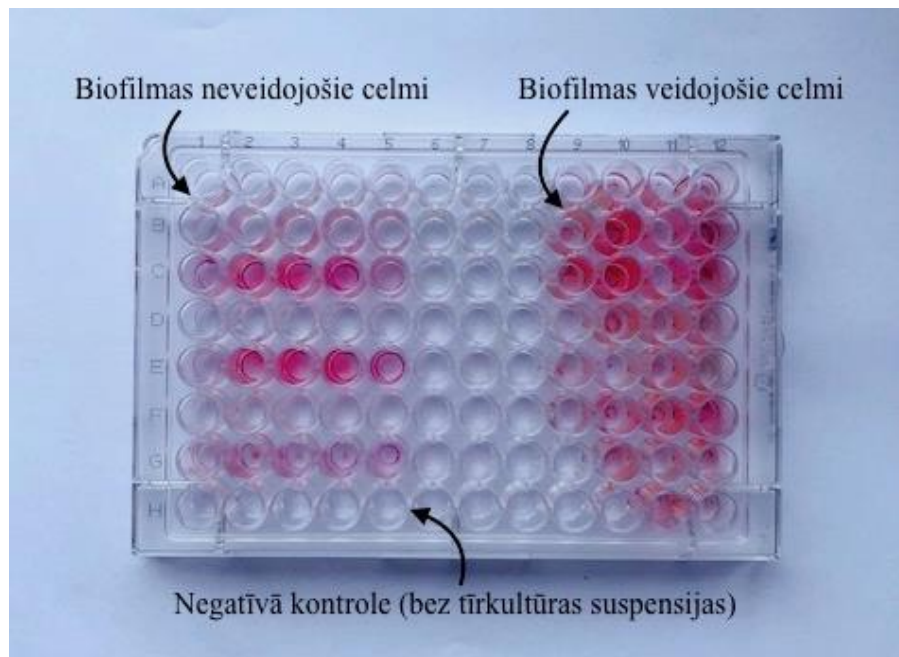
3.1.6. att. Procentuāls *S. epidermidis* jutības atspoguļojums pret klindamicīnu

Pētījuma rezultāti liecina, ka klindamicīns ir viena no zāļu vielām, pret kuru *S. epidermidis* uzrāda vidēju jutību. Salīdzinot manis iegūtos rezultātus, ar citiem veiktajiem pētījumiem un zinātniskajām publikācijām, nākas secināt, ka līdzīgus rādītājus un rezultātus ieguva, un apstiprināja Zviedrijā veiktā pētījumā, starp 33 *S. epidermidis* izolātiem, 67% gadījumu (22 no 33 izolātiem) (Hellmark, *et al.*, 2009), Beļģijā veiktā pētījumā, starp 74 *S. epidermidis* izolātiem, 45% gadījumu (33 no 74 izolātiem) (Argudín, *et al.*, 2015), vēl vienā Zviedrijā veiktā pētījumā, starp 134 *S. epidermidis* izolātiem, 58% gadījumu (78 no 134 izolātiem) (Hamad, *et al.*, 2015). Vienā publikācijā ir minēts gadījums, kad tika noteikta 94% *S. epidermidis* rezistence pret klindamicīnu, kas ir ievērojami lielāks rādītājs, nekā manis veiktajā pētījumā (Widerström, *et al.*, 2009).

Analizējot gan savus iegūtos datus, gan publikācijās minētos varu secināt, ka klindamicīns var būt ievērojami efektīvāks KONS izraisītu infekciju terapijā, nekā eritromicīns, ciprofloksacīns un cefoksitīns. Varbūtība, ka *S. epidermidis* būs jutīgs pret klindamicīnu būs viena no augstākajām.

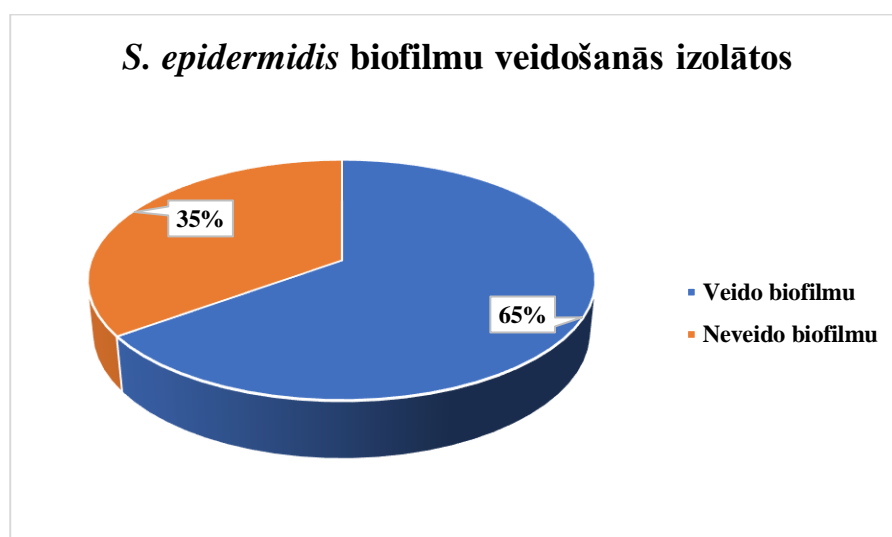
3.2. Mikrotitru plates rezultāti

Pētījumā lietota modificēta *Christensen* metode (Christensen, *et al.*, 1987). Lai noteiktu biofilmas veidošanās spēju, tika analizēti 17 klīniskie *S. epidermidis* celmi. Mikroorganismu izolāti tika iegūti no intravaskulāriem katetriem.



3.2.1. att. Mikrotitru plates metodes rezultātu attēlojums (autora attēls)

Pētījuma rezultāti norāda, ka 65% gadījumu, t.i., 11 no 17 *S. epidermidis* izolātiem spēj veidot biofilmu (skat. 3.2.1. att.).



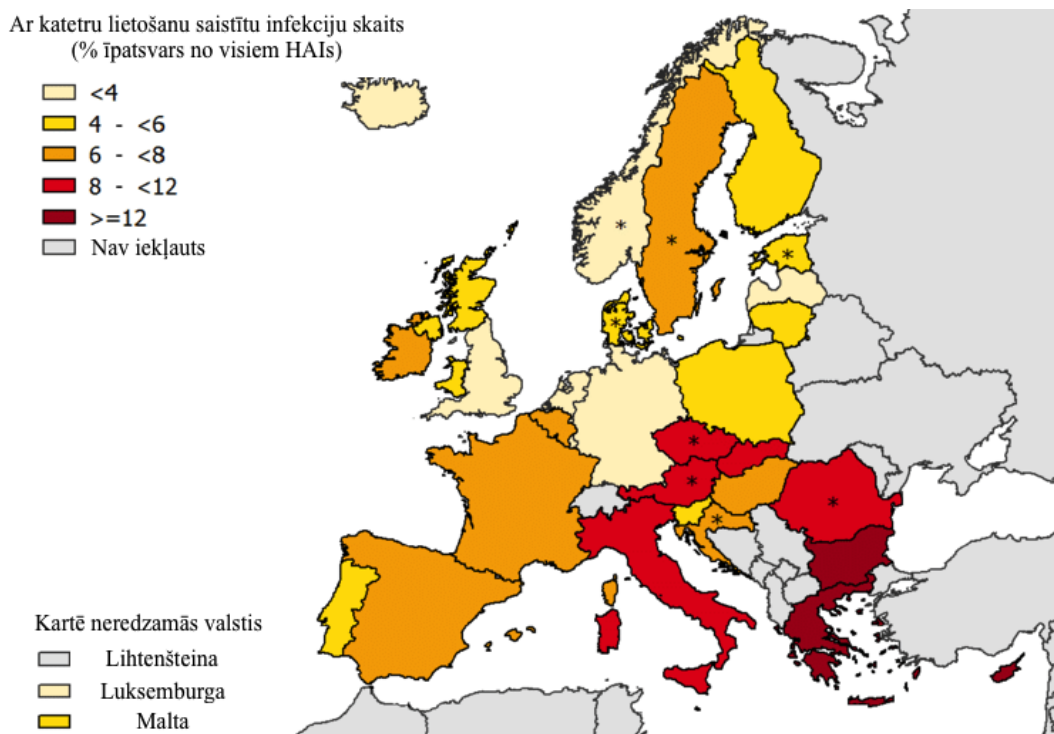
3.2.2. att. Procentuāls *S. epidermidis* biofilmu veidošanās salīdzinājums

Analizējot gan savus iegūtos, gan publikācijās minētos rezultātus varu secināt, ka procentuāli augstāki rezultāti, izmantojot tādu pašu modificētu *Christensen* metodi, tika iegūti Brazīlijā veiktā pētījumā, t.i., 81% gadījumu (Oliveira, *et al.*, 2010). Vajag atzīmēt, ka pētījumā 54% gadījumu (44 no 82 izolātiem) biofilmu veidoja tie izolāti, kuri tika iegūti no intravaskulāriem katetriem, savukārt, pārējie izolāti tika tika iegūti no hemokultūrām. Turpretim Pakistānā veiktā pētījumā biofilmu veidošanos konstatēja retāk, t.i., 37% gadījumu,

kā arī, tikai 10% no izolātiem tika iegūti no intravaskulāriem katetriem, pārējo izolātu īpatsvaru veidoja no urīnkatetriem un urīna iegūtie paraugi (Hassan, *et al.*, 2011). Indijā veiktā pētījumā tika izmantota cita biofilmas veidošanās metode, nevis *Christensen* metode, bet *Moretro* protokols. Pārsvārā pētāmie izolāti tika iegūti no hemokultūrām. Rezultāti sanāca līdzīgi, respektīvi, 74% gadījumu (74 no 100 izolātiem) veidojās biofilma (Jain, *et al.*, 2009).

Pēdējās dekādes laikā ir veikti vairāki pētījumi, kas tieši ir vērsti uz vienu no *S. epidermidis* virulences faktoru, t.i., biofilmas veidošanos. Pielietojot praksē fenotipiskās izmeklēšanas metodes, pieaug varbūtība iespējamā virulences faktora identificēšanai. Diemžēl, bet ņemot vērā plašo *S. epidermidis* izplatību ārstniecības iestādēs, un, veicot izmeklējumus, arvien biežāk tiek identificēti patogēnie, biofilmu veidojošie epidermālā stafilokoka celmi.

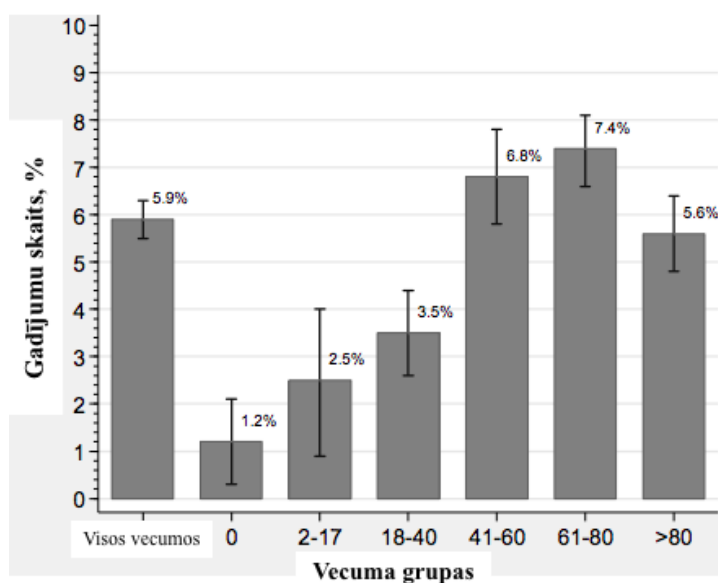
Viens no nozīmīgākajiem epidermālā stafilokoka virulences faktoriem ir spēja veidot biofilmu. Bieži vien, mikroorganismu kontaminācijas dēļ, ir grūti atšķirt īsto infekcijas ierosinātāju no viltus ierosinātāja. Epidermālā stafilokoka spēja kontaminēt dažādus klīniskos pacienta materiālus un paraugus var rast grūtības un dažādas, ar sekojošu terapiju saistītas, komplikācijas (skat. 3.2.3. att.). Katru gadu pieaug HAIs, t.i., ar veselības aprūpi saistītu infekciju skaits (health care associated infections) (Suetens, *et al.*, 2017).



3.2.3. att. Ar katetru lietošanu saistītu infekciju prevalences, procentuālais salīdzinājums (ar izmaiņām no Suetens, *et al.*, 2013).

Analizējot Eiropas Slimību profilakses un kontroles centra (ECDC) statistiskos datus, var secināt, ka Latvijas prevalences dati uz kopējā Eiropas valstu fona, it īpaši Bulgārijas, Grieķijas, Rumānijas, Itālijas u.c., ir vieni no labākajiem. Kas varētu liecināt par tik krasu atšķirību, iespējams pacientu, t.i., aprūpējamo skaits, infekciju kontrole, epidemioloģiskā uzraudzība, ārstu un ārstniecības iestādes personāla izglītošana. Salīdzinot iedzīvotāju skaitu, Latvijā 2012 gadā bija virs 2 miljoniem, savukārt, Bulgārijā virs 7,3 miljoniem. Diemžēl, bet jaunāku datu, kas liecinātu par šī brīža situāciju vēl nav publicēti (Suetens, *et al.*, 2013).

Kā jau iepriekš bija minēts, epidermālā stafilokoka izraisītu patoloģiju un ar katetru lietošanu saistītu infekciju gadījumu skaits korelē ar pacientu vecumu. Šveicē veiktajā pētījumā tika noskaidrots, ka visbiežāk ar veselības aprūpi saistītu infekciju gadījumu skaits, ir vecumā grupā no 41 līdz pat 80 gadiem (skat. 3.2.4. att.) (Hôpitaux Universitaires de Genève, 2018).



3.2.4. att. Ar veselības aprūpi saistītu infekciju prevalence dažādās vecuma grupās (ar izmaiņām no Hôpitaux Universitaires de Genève, 2018).

Kādi varētu būt racionāli scenāriji un stratēģijas, lai cīnītos ar epidermālā stafilokoka producētām biofilmām un sekojošām infekcijām. Uz doto brīdi zinot un izprotot, kā veidojas biofilmas gan molekulārā, gan ģenētiskā līmenī, var improvizēt iespējamus “cīņas” variantus.

Tiek minētas vairākas klīniskās stratēģijas, kā varētu mazināt epidermālā stafilokoka kolonizāciju un sekojošu biofilmas veidošanos, pirmkārt, lietot katetru *lock* šķīdumus, otrkārt, izmantot katetrus ar inkorporētām zāļu vielām. Antibakteriālā *lock* terapija (ALT, antimicrobial lock therapy) tiek pielietota visbiežāk, lai reducētu un kontrolētu katetru iespējamo kolonizāciju un biofilmas veidošanos (Algburi, *et al.*, 2017). ALT terapijas pamatā ir intravaskulārā katetra, nosacīta, sterilizācija ar antibakteriālās zāļu vielas šķīduma infūziju. Viens no būtiskākajiem

terapijas momentiem ir zāļu vielas koncentrācija, tai ir jābūt vismaz 100 līdz 1000 reižu lielākai, nekā minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) (Woods, Percival, 2014). Šāda veida terapijai ir gan pozitīvas, gan arī izteikti negatīvas īpašības. Pirmkārt, pārsvarā terapijā tiek izmantots vankomicīns, kas ir spēcīgs, šaura spektra antibakteriāls līdzeklis, iespējamie rezistences izveidošanās riski ir pārāk kritiski un absolūti nevēlami. Kā arī pētījumos tiek aprakstīts, ka vankomicīns ir neefektīvs "cīņā" jau ar izveidotajām *S. epidermidis* biofilmām (Claessens, *et al.*, 2015).

ALT var izmantot ne tikai antibakteriālos līdzekļus, bet arī helātus, piem., EDTA. Iedarbības pamatā ir nešķīstošu kompleksu savienojumu veidošanās ar biofilmas Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{+2} joniem. Percival, *et al.*, pētījumā *in vitro* modelī tika noteikts, ka 40mg/mL EDTA šķīdums spēj ievērojami samazināt biofilmas veidošanos intravaskulāros katetros, īpaši centrālos venozos katetros (Percival, *et al.*, 2005).

Viena no visbiežāk izmantotajām stratēģijām ir *lock* šķīdumu izmantošana, bet bieži vien tiek izmantoti arī katetri ar inkorporētām zāļu vielām, ārstniecības praksē izmantojot, antibakteriālos katetrus. Katetros var būt iekļautas hlorheksidīna, sudraba sulfadiazīna, kā arī 5-fluorouracila molekulas. Tomēr, šādu katetru pielietošana praksē ir samērā ierobežota, jo efekts ir diez ko īslaicīgs, kā arī, šādu katetru lietošana nederēs gadījumos, ja ir nepieciešams izmantot katetru ilglaicīgi.

Viena no jaunākajām klīniskajām stratēģijām un alternatīvām ir antibakteriālo līdzekļu lietošana kopā ar citām specifiskām antibakteriālām komponentēm, kurām iedarbojoties, piemīt sinerģisks efekts. Piemēram, antimikrobiālie peptīdi, biofilmas degradējošie enzīmi, QS inhibitori, ēteriskās eļļas, kā arī nanodaļiņas (Gupta, Birdi, 2017). No antibakteriālo peptīdu grupas varētu izmantot tahiplezīnu III, indollicidīnu, mellitīnu u.c. kopā ar antibakteriālām zāļu vielām, piem., vankomicīnu, ciprofloksacīnu. No degradējošo enzīmu grupas *in vivo* un *in vitro* modeļos izmanto dispersīnu B, piem., kombinācijā ar triklozānu, algināta liāzi kombinācijā ar gentamicīnu. No QS inhibitoru grupas patulīnu, kombinācijā ar tobramicīnu, baikalīna hidrātu komb. ar vankomicīnu, ajoēnu komb. arī ar tobramicīnu. No ēterisko eļļu grupas izmanto eugenolu komb. ar ampicilīnu, smaržīgās pelargonijas ēterisko eļļu komb. ar norfloksacīnu. Savukārt, no nanodaļiņu grupas varētu izmantot sudraba, kā arī *green* sintēzes sudraba nanodaļiņas komb. ar vankomicīnu, selenāta nanodaļiņas komb. ar oksacilīnu, kā arī citrāt-iekļautas sudraba nanodaļiņas komb. ar aztreonamu. Šādu specifisku, sinerģisku vielu izmantošana praksē ir tikai sākuma stadijā, turklāt pētījumos izmantoti nevis epidermālā stafilokoka celmi, bet gan *S. aureus* un *P. aeruginosa* (Algburi, *et al.*, 2017).

Atklājot un ārstniecības terapijā iekļaujot arvien jaunas biofilmas supresējošas zāļu vielas un *lock* šķīdumus, varēs būtiski samazināt ar katetru lietošanu saistītu infekciju incidenci.

3.3. Geno Type™ testa rezultāti

Epidermālo stafilokoku izolātu meticilīnrezistences apstiprināšanai tika izmantots Geno Type™ tests. Pētījumā tika analizēti 17 *S. epidermidis* izolāti, kas iegūti no intravaskulāriem katetriem, rezultātā tika noskaidrots, ka 76% gadījumu, t.i., 13 no 17 izolātiem, ir pozitīvs *mecA* gēns (skat. 3.3.1. tabulu).

3.3.1. tabula

mecA gēna klātbūtne *S. epidermidis* izolātos

Izolātu skaits, n	<i>mecA</i> (+), n (%)	<i>mecA</i> (-), n (%)
17	13 (76)	4 (24)

Pielietojot genotipisko izmeklēšanas metodi, tika noteikta meticilīnrezistences izraisošā *mecA* gēna klātbūtne, kas *S. epidermidis* izolātos redzami dominē. Pētījumā laikā, tika konstatēta korelācija starp *mecA* gēna klātbūtni, antibakteriālo rezistenci (īpaši pret FOX kā β-laktāmu grupas zāļu vielu) (skat. 3.3.2. tabulu).

3.3.2. tabula

S. epidermidis izolātu biofilmu, rezistences un *mecA* gēna klātbūtnes apkopojums

Nr.p.k.	Biofilma	FOX	<i>mecA</i>
1.	V	R	Poz
2.	V	R	Poz
3.	V	R	Poz
4.	V	R	Poz
5.	V	R	Poz
6.	V	R	Poz
7.	V	R	Poz
8.	N	S	Neg
9.	V	R	Poz
10.	N	S	Neg
11.	N	R	Poz
12.	N	R	Poz
13.	V	R	Poz
14.	N	S	Neg
15.	V	R	Poz
16.	N	S	Neg

17.	V	R	Poz
-----	---	---	-----

V – biofilma veidojas

N – biofilma neveidojas

FOX – cefoksitīns

Interpretācija: S – jutīgs, R – rezistents

Poz – pozitīva *mecA* gēna klātbūtne izolātos

Neg – negatīva *mecA* gēna klātbūtne izolātos

Analizējot iegūtos datus var secināt, ka *mecA* gēna neesamība *S. epidermidis* izolātos korelē ar epidermālā stafilokoka jutību pret cefoksitīnu (FOX). Respektīvi, ja nav meticilīnrezistences kodējošā gēna, tad mikroorganismi būs jutīgi pret antibakteriālo zāļu vielu, vai arī otrādi, ja ir meticilīnrezistences kodējošais gēns, tad mikroorganismi būs nejutīgi pret antibakteriālo zāļu vielu. Savukārt, ja apskata biofilmas producēšanu un *mecA* gēna klātbūtnes savstarpēju saistību, tad nenovēro korelāciju, jo ne visos gadījumos, piem., kad veidojas vai otrādi neveidojas biofilma, ir pozitīva vai otrādi negatīva *mecA* gēna klātbūtne.

Salīdzinot gan savus iegūtos, gan publikācijās minētos rezultātus varu secināt, ka Brazīlijā veiktā pētījumā 85% gadījumu (126 no 149 izolātiem) tika konstatēta gēna klātbūtne, kas veido meticilīnrezistenci. Izolāti tika iegūti no hemokultūras (69% gadījumu), kā arī no katetriem (Iorio, *et al.*, 2011). Vēl vienā Brazīlijā veiktā pētījumā 72,5% gadījumu (116 no 160 izolātiem) tika konstatēta *mecA* gēna klātbūtne (Martins, *et al.*, 2013). Indijā veiktā pētījumā 67% gadījumu tika konstatēta *mecA* gēna klātbūtne, bet iegūtie izolāti bija nevis no hemokultūrām vai intravaskulāriem katetriem, bet no iekaisušas acs konjunktīvas (Jena, *et al.*, 2017). Dienvidāfrikā veiktā pētījumā, Ehlers, *et al.*, komanda visos pētāmajos *S. epidermidis* izolātos (n=59) konstatēja *mecA* gēnu, līdzīgi kā manis veiktajā pētījumā, izolātu iegūšanai tika izmantoti intravaskulārie katetri (Ehlers, *et al.*, 2018). Savukārt, Wang, *et al.*, pētījuma rezultāti bija ievērojami citādāki, tikai 34,4% gadījumu tika konstatēta gēna klātbūtne (Wang, *et al.*, 2016). Līdzīgus rezultātus ieguva arī Watanabe, *et al.*, gēna klātbūtne tika konstatēta ievērojami zemāk, nekā manis veiktajā pētījumā, t.i., 36% gadījumu. Interesanti liekas tas, ka abi pētījumi ir veikti vienā valstī, t.i., Japānā, kā arī vienā laika posmā, 2016. gadā. Kas nebūt nav mazsvarīgi, epidermālā stafilokoka celmus neizolēja no intravaskulāriem katetriem, bet gan no citām lokācijām (Watanabe, *et al.*, 2016). Salīdzinoši līdzīgi rezultāti sanāca arī Kitao, *et al.*, veiktajā pētījumā, 42,9% gadījumu tika noteikta *mecA* gēna klātbūtne *S. epidermidis* izolātos, kas iegūti no hemokultūrām (Kitao, *et al.*, 2010). Savukārt, Cabrera-Contreras, *et al.*, komanda, veicot pētījumu Meksikā, nonāca pie secinājuma, ka biofilmu neveidojošie *S. epidermidis* izolāti 64% gadījumu bija *mecA* gēna pozitīvi, savukārt, biofilmu veidojošie izolāti 91% gadījumu bija *mecA* gēna pozitīvi, šajā gadījumā var novērot korelāciju starp spēju veidot

biofilmu un *mecA* gēna klātbūtni, jo ir skaidri redzama procentuālā atšķirība, ka biofilmu veidojošajiem izolātiem ir procentuāli izteiktāka gēna klātbūtne (Cabrera-Contreras, *et al.*, 2013).

Bieži vien publikācijās tiek aprakstīts, ka *S. epidermidis* izolāti aptuveni no 75 līdz pat 90% gadījumu ir rezistenti pret meticilīnu. Šāda procentuāla prevalence tika noteikta arī manis veiktajā pētījumā, respektīvi, 76% gadījumu tika konstatēts *mecA* gēns, kas mediē meticilīnrezistenci. Pastāv cieša saistība starp antibakteriālo zāļu vielu rezistenci un *mecA* gēna klātbūtni mikroorganismu genomā. Vienīgi atšķirība ir novērojama starp gēna klātbūtni un spēju veidot biofilmu, jo ne visos gadījumos, abi raksturlielumi, korelē savā starpā.

Publikācijās ir aprakstīti gadījumi, kad meticilīnrezistentajam *S. epidermidis* var izpausties multi-rezistence, t.i., gadījumos, ja tiek noteikta rezistence ne tikai pret β -laktāmu grupas antibakteriāliem līdzekļiem, bet arī fluorhinoloniem, glikopeptīdiem u.c. zāļu vielu grupām. Pētījumos tiek aprakstīti gadījumi, ka biofilmu veidojošiem *S. epidermidis* izolātiem piemīt izteiktāka rezistence pret antibakteriāliem līdzekļiem, nekā tiem epidermālā stafilokoka izolātiem, kuri neveido biofilmas (Sahal, Bilkay, 2014). Kā jau iepriekš bija minēts, šo korelāciju starp meticilīnrezistenci, *mecA* gēna klātbūtni un biofilmas veidošanos es savā pētījumā nenovēroju.

Mehānismu un secīgu procesu noteikšanai, kas mediē antibakteriālo līdzekļu, tostarp meticilīna rezistenci, piemīt kritiska nozīme. Pielietojot ārstniecības praksē genotipiskās izmeklēšanas metodes, varēs ātrāk reaģēt un priekšlaikus administrēt tās nepieciešamās zāļu vielas, pret kurām *S. epidermidis* būs jutīgs, nevis rezistents.

Runājot un skatoties retrospektīvi par paveikto pētījumu vēlos ieskicēt to, ka pētījums izdevās un pētījumā izmantotās metodes tika veiksmīgi realizētas. Atbildot uz jautājumu, vai es gribētu kaut ko mainīt, papildināt, tad atbilde būs viennozīmīgi jā, jo, intereses pēc, vēlētos izmantot vēl citu biofilmas veidošanās noteikšanas, piem., Congo red agāra metodi. Sīkāk iedziļinoties epidermālā stafilokoka genomā, varētu un gribētu izmantot citas genotipiskās izmeklēšanas metodes, piem., multilokusu sekvenču tipēšanu. Drīzāk tā varētu būt kā nākotnes perspektīva. Kas varbūt ne tik labi un ne ar pirmo reizi izdevās, tā droši vien bija mikrotitru plates metode, biofilmas veidošanās noteikšanai. Esmu ieskicējis iespējamās nākotnes pētījumu plānus.

SECINĀJUMI

1. No 43 *S. epidermidis* izolātiem visaugstāko rezistenci, 93% gadījumu (n-39), novēro pret eritromicīnu.
2. No 43 *S. epidermidis* izolātiem visaugstāko jutību, 100% gadījumu (n-43), novēro pret vankomicīnu.
3. No 43 *S. epidermidis* izolātiem vidēju jutību, 2% gadījumu, novēro gan pret eritromicīnu, gan ciprofloksacīnu, 4% gadījumu pret klindamicīnu.
4. No 17 *S. epidermidis* izolātiem, kas iegūti no intravaskulāriem katetriem, 65% gadījumu (n-11) veidojas biofilma.
5. No 17 *S. epidermidis* izolātiem, kas iegūti no intravaskulāriem katetriem, 76% gadījumu (n-13) tika noteikta *mecA* gēna klātbūtne.
6. *mecA* gēna klātbūtne *S. epidermidis* izolātos korelē ar rezistenci pret cefoksitīnu.
7. *S. epidermidis* izolātos nenovēro korelāciju starp *mecA* gēna klātbūtni un spēju veidot biofilmu.

PATEICĪBAS

Vēlos izteikt lielu pateicību savai darba vadītājai Dr. med. Ivetai Līdumai par atsaucību, vērtīgiem padomiem, ieteikumiem un palīdzību darba tapšanas laikā!

Liels paldies manai ģimenei par sapratni un atbalstu visa bakalaura darba rakstīšanas laikā!

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Agarwal, S., Sharma, G., Dang, S., et al.** Antimicrobial Peptides an Anti-Infectives against *Staphylococcus epidermidis*. *Medical Principles and Practice*, 2016, 25(4): 301-08.
2. **Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., et al.** Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. *Applied and environmental microbiology*, 2017, 83(3): 1-15.
3. **Argudín, M.A., Vanderhaeghen, W., Vandendriessche, S., et al.** Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus epidermidis* recovered from animals and humans. *Veterinary microbiology*, 2015, 178(1-2): 105-13.
4. **Bierbaum, G., Sahl, H.G.** Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2009, 10(1): 2-18.
5. **Binda, E., Marinelli, F., Marcone, G.L.** Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance. *Antibiotics*, 2014, 3(4): 572-94.
6. **Bouchami, O., Achour, W., Hassen, B.** Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. *Clinical microbiology and infection*, 2007, 13(1): 103-06.
7. **Brescó, M.S., Harris, L.G., Thompson, K., et al.** Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Frontiers in microbiology*, 2017, 1401(8): 1-24.
8. **Brown, R., Clarke, T.B.** The regulation of host defences to infection by the microbiota. *Immunology*, 2017, 150(1): 1-6.
9. **Büttner, H., Mack, D., Rohde, H.** Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2015, 14(5): 1-15.
10. **Cabrera-Contreras, R., Morelos-Ramírez, R., Galicia-Camacho, A.N., et al.** Antibiotic Resistance and Biofilm Production in *Staphylococcus epidermidis* Strains, Isolated from a Tertiary Care Hospital in Mexico City. *ISRN microbiology*, 2013, (2013): 1-5.
11. **Chessa, D., Ganau, G., Spiga, L., et al.** *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Virulence Strains as Causative Agents of Persistent Infections in Breast Implants. *PLoS one*, 2016, 11(1): 1-15.
12. **Cheung, G.Y., Otto, M.** Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. *Current opinion in infectious diseases*, 2010, 23(3): 208-16.

13. **Christner, M., Franke, G.C., Schommer, N.N., et al.** The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Molecular microbiology*, 2010, 75(1): 187- 207.
14. **Claessens, J., Roriz, M., Merckx, R., et al.** Inefficacy of vancomycin and teicoplanin in eradicating and killing *Staphylococcus epidermidis* biofilms in vitro. *International journal of antimicrobial agents*, 2015, 45(4): 368-75.
15. **Costa, S.S., Viveiros, M., Pomba, C., et al.** Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(2): 320-24.
16. **Courvalin, P.** Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42(1): 25-34.
17. **Davies, J., Davies, D.** Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2010, 74(3): 417-33.
18. **Decker, R., Burdelski, C., Zobiak, M., et al.** An 18kDa scaffold protein is critical for *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *PLoS pathogens*, 2015, 23(11): 1-32.
19. **Donlan, R.M.** Biofilms microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 2002, 8(9): 881-90.
20. **Ehlers, M.M., Strasheim, W., Lowe, M., et al.** Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Implicated in Catheter-Related Bloodstream Infections at an Academic Hospital in Pretoria, South Africa. *Frontiers in microbiology*, 2018, 417(9): 1-11.
21. **Elzi, L., Babouee, B., Vögeli, N., et al.** How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(9): 355-61.
22. **Fey, P.D., Olson, M.E.** Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future microbiology*, 2010, 5(6): 917-33.
23. **Field, D., Cotter, P.D., Hill, C., et al.** Bioengineering Lantibiotics for Therapeutic Success. *Frontiers in microbiology*, 2015, 1363(6): 1-8.
24. **Fisher, J.F., Mobashery, S.** β -Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2016, 6(5) 1-19.
25. **Gahlot, R., Nigam, C., Kumar, V., et al.** Catheter-related bloodstream infections. *International journal of critical illness and injury science*, 2014, 4(2): 162-67.

26. **Gaynor, M., Mankin, A.S.** Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current topics in medicinal chemistry*, 2003, 3(9): 949-61.
27. **Götz, F., Perconti, S., Popella, P., et al.** Epidermin and gallidermin: Staphylococcal antibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(1): 63-71.
28. **Gupta, P.D., Birdi, T.J.** Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 2017, 8(4): 266-75.
29. **Gusnaniar, N., Sjollem, J., Nuryastuti, T., et al.** Structural changes in *S. epidermidis* biofilms after transmission between stainless steel surfaces. *Biofouling*, 2017, 33(9): 712-21.
30. **Hall, B.G., Barlow, M.** Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 55(6): 1050-52.
31. **Hamad, T., Hellmark, B., Nilsson-Augustinsson, A., et al.** Antibiotic susceptibility among *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections, with focus on doxycycline. *Apmis*, 2015, 123(12): 1055-60.
32. **Harris, L.G., Dudley, E., Rohde, H., et al.** Limitations in the use of PSM γ , agr, RNAIII, and biofilm formation as biomarkers to define invasive *Staphylococcus epidermidis* from chronic biomedical device-associated infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 2017, 307(7): 382-87.
33. **Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., et al.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2011, 15(4): 305-11.
34. **He, H.J., Sun, F.J., Wang, Q., et al.** Erythromycin resistance features and biofilm formation affected by subinhibitory erythromycin in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2016, 49(1): 33-40.
35. **Hôpitaux Universitaires de Genève.** Point Prevalence Survey 2017 of healthcare-associated infections and antimicrobial use in Swiss acute care hospitals. *Coordination Center Prevalence Study CH*, 2017. [tiešsaiste] – [atsauce 28.04.2018.] Pieejams: https://www.swissnoso.ch/fileadmin/swissnoso/Dokumente/5_Forschung_und_Entwicklung/2_Punktpraevalenzstudie/Report_Point_Prevalence_Survey_2017_of_HAI_and_antimicrobial_use_in_Swiss_acute_care_hospitals.pdf
36. **Yang, T., Tal-Gan, Y., Paharik, A.E., et al.** Structure-Function Analyses of a *Staphylococcus epidermidis* Autoinducing Peptide Reveals Motifs Critical for AgrC-type Receptor Modulation. *ACS chemical biology*, 2016, 11(7): 1982-91.

37. **Iorio, N.L.P., Azevedo, M.B., Frazão, V.H., et al.** Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. *Int Microbiol*, 2011, 14(1): 13-17.
38. **Iorio, N.L.P., Caboclo, R.F., Azevedo, M.G., et al.** Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2012, 72(1): 32-40.
39. **Jackson, M.A., Schutze, G.E.** The Use of Systemic and Topical Fluoroquinolones. *Pediatrics*, 2016, 138(5): 1-15.
40. **Jacoby, G.A.** Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical infectious diseases*, 2005, 41(2): 120-26.
41. **Jain, A., Agarwal, A.** Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of microbiological methods*, 2009, 76(1): 88-92.
42. **Jena, S., Panda, S., Nayak, K.C., et al.** Identification of Major Sequence Types among Multidrug-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Infected Eyes and Healthy Conjunctiva. *Frontiers in microbiology*, 2017, 1430(8): 1-12.
43. **Juda, M., Rza, B.C., Malm, A.** The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2016, 111(3): 155-60.
44. **King, D.E., Malone, R., Lilley, S.H.** New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *American family physician*, 2000, 61(9): 2741-48.
45. **Kitao, T., Ishimaru, M., Nishihara, S.** Detection of biofilm-producing and methicillin resistance genes in *Staphylococcus epidermidis* isolated from healthy humans and in blood culture tests. *Journal of infection and chemotherapy*, 2010, 16(3): 170-73.
46. **Kleinschmidt, S., Huygens, F., Faoagali, J., et al.** *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future microbiology*, 2015, 10(11): 1859-79.
47. **Kong, K.F., Schneper, L., Mathee, K.** Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *Apmis*, 2010, 118(1): 1-36.
48. **Kozitskaya, S., Cho, S., Dietrich, K., et al.** The Bacterial Insertion Sequence Element IS256 Occurs Preferentially in Nosocomial *Staphylococcus epidermidis* Isolates: Association with Biofilm Formation and Resistance to Aminoglycosides. *Infection and immunity*, 2004, 72(2): 1210-15.

49. **Le, K.Y., Park, M.D., Otto, M.** Immune Evasion Mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Infection. *Frontiers in microbiology*, 2018, 359(9): 1-8.
50. **Martins, A., Riboli, D.F.M., Camargo, C.H., et al.** Antimicrobial resistance and persistence of *Staphylococcus epidermidis* clones in a Brazilian university hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2013, 77(2): 164-68.
51. **Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Costello, A.J., et al.** Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Clinical isolates from U.S. Hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, 56(9): 4656-61.
52. **Miller, M.B., Bassler, B.L.** Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 2001, 55(1): 165-99.
53. **Munita, J.M., Arias, C.A.** Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, 2016, 4(2): 1-37.
54. **Nakatsuji, T., Chen, N.H., Butcher, A.M., et al.** A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Science Advances*, 2018, 4(2): 1-10.
55. **Namvar, A.E., Bastarahang, S., Abbasi N., et al.** Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS hygiene and infection control*, 2014, 9(3): 1-10.
56. **Nunes, A.P., Teixeira, L.M., Iorio, N.L., et al.** Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *International journal of antimicrobial agents*, 2006, 27(4): 307-15.
57. **Ohlsen, K., Eckart, M., Hüttinger, C., et al.** Chapter 9. Pathogenic Staphylococci: Lessons from Comparative Genomics. **In:** *Genome Analysis of Pathogenic Microbes*, 2006, 175-210.
58. **Oliveira, A., Maria de Lourdes, R.S.** Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC research notes*, 2010, 3(1): 260-68.
59. **Otto, M.** Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in immunopathology*, Springer- Verlag, 2012, 34(2): 201-14.
60. **Page, M.** Emerging cephalosporins. *Expert opinion on emerging drugs*, 2007, 12(4): 511-24.
61. **Pechère, J.C.** Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *International journal of antimicrobial agents*, 2001, 18(1): 25-28.

62. **Percival, S.L., Kite, P., Eastwood, K., et al.** Tetrasodium EDTA as a novel central venous catheter lock solution against biofilm. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2005, 26(6): 515-19.
63. **Pereira, V.C., Pinheiro, L., Oliveira, A., et al.** Expression of superantigens and the agr system in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial pathogenesis*, 2018, 115: 19-24.
64. **Poole, K.** Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2004, 61(17): 2200-23.
65. **Pootoolal, J., Neu, J, Wright, G.D.** Glycopeptide Antibiotic Resistance. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 2002, 42(1): 381-408.
66. **Qin, L., Da, F., Fisher, E.L., et al.** Toxin Mediates Sepsis Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS pathogens*, 2017, 13(2): 1-16.
67. **Roberts, M.C.** Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS microbiology letters*, 2008, 282(2): 147-59.
68. **Robertson, J., Lang, S., Lambert, P., et al.** Peptidoglycan derived from *Staphylococcus epidermidis* induces Connexin43 hemichannel activity with consequences on the innate immune response in endothelial cells. *Biochemical Journal*, 2010, 432(1): 133-43.
69. **Rolo, J., Worning, P., Boye Nielsen, J., et al.** Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*- mediated β -lactam resistance in staphylococci. *PLoS genetics*, 2017, 13(4): 1-22.
70. **Sahal, G., Bilkay, I.S.** Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 45(2): 539-44.
71. **Schoenfelder, S.M.K, Lange, K., Eckart, M., et al.** Success through diversity – How *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *International Journal of medical microbiology*, 2010, 300(6): 380-86.
72. **Schommer, N.N., Christner, M., Hentschke, M., et al.** *Staphylococcus epidermidis* Uses Distinct Mechanisms of Biofilm Formation To Interfere with Phagocytosis and Activation of Mouse Macrophage-Like Cells 774A.1. *Infection and immunity*, 2011, 79(6): 2267-76.
73. **Singh, R., Ray, P.** Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future microbiology*, 2014, 9(5): 669-81.
74. **Suetens, C., Hopkins, S., Kolman, J., et al.** ECDC surveillance report: point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals, 2011-2012. *Stockholm: European Centre for Disease Prevention*

- and Control*, 2013. [tiešsaiste] – [atsauce 27.04.2018.] Pieejams: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>
75. **Tenson, T., Lovmar, M., Ehrenberg, M.** The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of molecular biology*, 2003, 330(5): 1005-14.
 76. **Uçkay, I., Pittet, D., Vaudaux, P., et al.** Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Annals of medicine*, 2009, 41(2): 109-19.
 77. **Ventola, C.L.** The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, 2015, 40(4): 277-83.
 78. **Vester, B., Douthwaite, S.** Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(1): 1-12.
 79. **Vickers, A.A., Chopra, I., O'Neill, A.J.** Intrinsic Novobiocin Resistance in *Staphylococcus saprophyticus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007, 51(12): 4484-85.
 80. **Wang, P.J., Xie, C.B., Sun, F.H., et al.** Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* on the Abdominal Skin of Females before Laparotomy. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17(6): 1-11.
 81. **Watanabe, K., Nakaminami, H., Azuma, C., et al.** Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Is Part of the Skin Flora on the Hands of Both Healthy Individuals and Hospital Workers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 39(11): 1868-75.
 82. **Widerström, M., Monsen, T., Karlsson, C., et al.** Clonality among multidrug-resistant hospital-associated *Staphylococcus epidermidis* in northern Europe. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 2009, 41(9): 642-49.
 83. **Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C.** β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current opinion in microbiology*, 2005, 8(5): 525-33.
 84. **Woods, E., Percival, S.L.** Chapter 11. Biofilms' Role in Intravascular Catheter Infections. **In:** *Biofilms in Infection Prevention and Control*, 2014, 185-98.
 85. **Zaman, S.B., Hussain, M.A., Nye, R., et al.** A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 2017, 9(6): 1-9.
 86. **Zhong, P., Shortridge, V.D.** The role of efflux in macrolide resistance. *Drug resistance updates*, 2000, 3(6): 325-329.

87. **Zhu, T., Zhao, Y., Wu, Y., et al.** The *Staphylococcus epidermidis gdpS* regulates biofilm formation independently of its protein-coding function. *Microbial pathogenesis*, 2017, 105: 264-71.
88. **Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., et al.** Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into pathogen. *International journal of antimicrobial agents*, 2006, 28(1): 14-20.
89. **Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., et al.** A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular microbiology*, 1999, 32(2): 345-56.

PIELIKUMI

1. pielikums

S. epidermidis virulences faktori, to gēni un funkcijas (ar izmaiņām no Fey, Olson, 2010; Otto, 2012).

Virulences faktors	Gēns	Funkcija
Biofilmas veidošanās:		
<u>Primārā saistīšanās ar virsmu</u>		
AtIE	<i>atlE</i>	Daudzfunkcionāls adhezīns, ietekmē virsmas hidrofobitāti
Aae	<i>aae</i>	Daudzfunkcionāls adhezīns
Teihojskābe	Multipli biosintēzes gēni (<i>tag</i>)	Ietekmē saistīšanos, biofilmas komponente
SdrF	<i>sdrF</i>	Saistās ar kolagēnu
SdrG (Fbe)	<i>sdrG</i>	Saistās ar fibrinogēnu
SdrH	<i>sdrH</i>	Iespējams ietekmē saistīšanos
Ebp	<i>ebp</i>	Saistās ar elastīnu
Embp	<i>ebp</i>	Saistās ar fibronektīnu
AtIE/ Aae	<i>atlE/ aae</i>	Saistās ar vairākiem šūnapvalka proteīniem
Aap	<i>aap</i>	Saistās ar korneocītiem
<u>Iekššūnu agregācija</u>		
PNAG/ PIA	<i>icaA, D, B, C</i>	Iekššūnu polisaharīdu adhezīns
Bap	<i>bap</i>	Iekššūnu proteīnu adhezīns
Aap	<i>aap</i>	Iekššūnu proteīnu prekursors
Embp	<i>ebp</i>	Iekššūnu proteīnu adhezīns
Teihojskābe	Multipli biosintēzes gēni (<i>tag</i>)	Ietekmē saistīšanos, biofilmas komponente
<u>Iekššūnu agregācija:</u>		
<i>Protektīvie eksopolimēri</i>		
PNAG/ PIA	<i>icaA, D, B, C</i>	Aizsargā no IgG, AMPs un fagocitozes
PGA	<i>capABCD</i>	Aizsargā no AMPs un fagocitozes
<u>Iekššūnu agregācija:</u>		

<i>Antimikrobiālo peptīdu (AMPs) rezistence</i>		
SepA proteāze	<i>sepA</i>	Degradē AMPs
Dlt, MprF, VraFG	<i>dltA, B, C, D, mprF, vraFG</i>	<i>vraFG</i> iesaistās AMPs izvadē, savukārt, <i>dlt</i> teihojskābju D-alanilācijas procesā, bet <i>mprF</i> -fosfolipīdu lizēšanā
Aps sistēma	<i>ApsR (graR), apsS (graS), apsX</i>	Regulē AMPs rezistences mehānismus
Toksīni: <i>Enterotoksīni</i>		
SEC3, SE1L	<i>sec3, selL</i>	Enterotoksīnu gēnu patogenitātes saturošie genoma rajoni (gēnu salas)
β- hemolizīns	<i>hly</i>	Hemolītiska un dermanekrotiska iedarbība
<i>Fenolšķīstošie modulīni (PSMs)</i>		
PSMα	<i>psmA</i>	Mērenas iedarbības citolizīns
PSMβ1, PSMβ2	<i>psmβ1, psmβ2</i>	Biofilmas surfaktans, virsmas aktīvā viela
PSMδ	<i>psmδ</i>	Spēcīgas iedarbības citolizīns
PSMε	<i>psmε</i>	Mērenas iedarbības citolizīns
δ- toksīns	<i>hly</i>	Mērenas iedarbības citolizīns
PSM- mec	<i>psm- mec</i>	Mērenas iedarbības citolizīns
Eksoenzīmi: <i>Proteāzes</i>		
Termonukleāze (nuc)	<i>nuc</i>	Nav zināma
Serīna proteāze HtrA, serīna proteāze V8 SspA	<i>htrA, sspA</i>	Nav zināma
Cisteīna proteāzes (SspB, Ecp)	<i>sspB, sspC</i>	Nav zināma, iespējams veicina audu bojājuma rašanos
Metaloproteāze/ elastāze (SepA)	<i>sepA</i>	Citolītiska iedarbība
Glutamilendopeptidāzes (GluSe, SspA, Esp)	<i>sspA</i>	Piedalās fibrinogēna degradācijā, veicina proteolīzi

Lipāzes (GehC, GehD)	<i>gehC, gehD, lipA</i>	Nav zināma
Citi faktori		
Lantibiotikas (epidermīns, Pep5)	Nav zināms	Bakteriocīnas īpašības, kavē citu mikroorganismu attīstību
Taukskābju modificējošie enzīmi (FAME)	Nav zināms	Procesē baktericīdo taukskābju detoksifikāciju, iekļauj arī pie eksoenzīmu grupas
Stafiloferrīni A un B	<i>sfna</i> gēna lokusā	Iesaistās sidereforu iegūšanā, pastiprina vairošanos

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs

izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

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

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

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

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

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2018., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts)