

Rīgas Stradiņa universitāte
Medicīnas fakultāte
Akadēmiskā maģistra studiju programma
„Biomedicīna”

MAĢISTRA DARBS
Nitrofurānu un bakteriofāgu mijiedarbība pret
***Klebsiella pneumoniae*: stabilitāte un**
antibakteriālais efekts

Darba autors:
Ilva Stepīņa
Studenta apliecības Nr. 23-063058

/paraksts/
2025. gada 01. jūnijā

Darba vadītājs:
Aigars Reinis
Dr. med., docents
RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra

/paraksts/
2025. gada 01. jūnijā

Rīga, 2025

1. KOPSAVILKUMS

Pieaugošās antimikrobiālās rezistences dēļ, *Klebsiella pneumoniae*, kuras multirezistence pieaug, būtiski sarežģi infekciju ārstēšanu. Darba mērķis ir izvērtēt nitrofurānu un bakteriofāgu kombinētās terapijas efektivitāti pret *K. pneumoniae*. Kā nitrofurāns tika izvēlēts Furasols jeb furagīns. Furasols ir medikaments, kas tiek ražots Latvijā un to var iegādāties aptiekā bez receptes. Tika veikta padziļināta literatūras apskate par nitrofurāniem, antimikrobās rezistences problēmu, bakteriofāgiem, kā arī bakteriofāgu un nitrofurānu stabilitātes aspektiem. Veiktajos eksperimentos tika noteikta furagīna minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) pret *K. pneumoniae* kā arī, fāga-antibiotikas mijiedarbība izmantojot režģveida atšķaidījuma testu. Baktēriju augšana tika noteikta pēc optiskā blīvuma vērtībām.

Rezultāti uzrāda, ka bakteriofāga-furagīna sinerģija pastāv, kombinācija kavē baktērijas augšanu efektīvāk nekā katrs līdzeklis atsevišķi. Kombinētai terapijai ar nitrofurānu un bakteriofāgu ir perspektīva cīņā pret multirezistentiem *K. pneumoniae* celmiem. Antagonisms starp bakteriofāgu un furagīnu netika novērots. Bakteriofāgs furagīna klātbūtnē saglabāja virulenci.

Atslēgas vārdi: *Klebsiella pneumoniae*; nitrofurāns; bakteriofāgi; kombinēta terapija; antibiotiku rezistence; furagīns.

SUMMARY

Due to the increasing antimicrobial resistance, *Klebsiella pneumoniae*, whose multidrug resistance is on the rise, significantly complicates infection treatment. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of combined nitrofurantoin and bacteriophage therapy against *K. pneumoniae*. Furasol, also known as furagin, was chosen as the nitrofurantoin. Furasol is a medication produced in Latvia and available over-the-counter in pharmacies. An extensive literature review on nitrofurantoin, antimicrobial resistance issues, bacteriophages, nitrofurantoin-phages stability was conducted. Experiments determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of furagin against *K. pneumoniae*, and the interaction of phage-antibiotic using the checkerboard assay. Bacterial growth was assessed through optical density measurements.

Results indicated the existence of synergism between bacteriophage and furagin; the combination inhibited bacterial growth more effectively than either agent alone. Combined nitrofurantoin and bacteriophage therapy shows promise against multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains. No antagonism was observed between the bacteriophage and furagin. The bacteriophage retained its virulence in the presence of furagin.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; nitrofurantoin; bacteriophage; combination therapy; antimicrobial resistance; furazolidin.

2. SATURA RĀDĪTĀJS

1.	KOPSAVILKUMS	2
2.	SATURA RĀDĪTĀJS	4
3.	SAĪSINĀJUMU SARAKSTS	6
4.	IEVADS	8
5.	LITERATŪRAS APSKATS	10
5.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> kā nozīmīgs patogēns un antibakteriālā rezistence	10
5.2.	Alternatīvas terapijas nozīme	11
5.3.	Nitrofurānu potenciāls izmantošanai pret <i>K.pneumoniae</i>	13
5.4.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> bioloģija un klīniskā nozīme.....	14
5.5.	Tipiskās infekciju slimības, kuras izraisa <i>K.pneumoniae</i>	15
5.6.	Antibakteriālās rezistences situācija Latvijā <i>K.pneumoniae</i> kontekstā	16
5.7.	Nitrofurāni kā antibakteriālie līdzekļi.....	16
5.7.1.	Galvenie nitrofurānu pārstāvji	17
5.8.	Bakteriofāgi un to pielietošana antibakteriālā terapijā	18
5.8.1.	Nitrofurānu un fāgu terapijas iespējas	18
5.9.	Nitrofurānu un fāgu stabilitātes jautājums	20
6.	MATERIĀLS UN METODES	23
6.1.	Baktēriju atlase	23
6.2.	Antibakteriālās jutības noteikšana ar Vitek 2 Systems iekārtu.....	23
6.3.	MIC noteikšana <i>Klebsiella pneumoniae</i> Furasolā pēc EUCAST standartiem	24
6.3.1.	512 mg/L furagīna atšķaidījuma sagatavošana.....	24
6.3.2.	Baktēriju inokulāta sagatavošana	25
6.3.3.	Mikroplates sagatavošana un MIC noteikšana	26
6.3.4.	MIC rezultātu interpretācija.....	27
6.4.	Spotu tests (Spot test) bakteriofāga aktivitātes noteikšanai	27

6.4.1.	Spotu testa rezultātu interpretācija	28
6.5.	Bakteriofāga titra noteikšana	28
6.5.1.	Bakteriofāga titra noteikšanas rezultātu interpretācija	30
6.6.	Bakteriofāga un antibiotikas mijiedarbības noteikšana	31
6.6.1.	Mikroplates sagatavošana priekš checkerboard assay	32
6.6.2.	Rezultātu interpretācija priekš checkerboard assay	33
7.	REZULTĀTI.....	34
7.1.	Baktēriju atlase	34
7.2.	Antibakteriālās jutības noteikšana ar VITEK 2 Systems iekārtu	34
	Izvēlētajiem <i>K.pneumoniae</i> celmiem tika veikts antimikrobās jutības tests, rezultāti apkopoti 7.2.1.tab. Šie rezultāti sniegs ieskatu vai furagīna MIC līmenis būs līdzīgs citiem nitrofurāniem.	34
7.3.	Spotu tests (Spot test) bakteriofāga aktivitātes noteikšanai	35
7.4.	MIC noteikšana <i>Klebsiella pneumoniae</i> Furasolā pēc EUCAST standartiem	37
7.5.	Bakteriofāga titra noteikšana	40
7.6.	Bakteriofāga un antibiotikas mijiedarbības noteikšana	43
8.	DISKUSIJA	48
9.	SECINĀJUMI (t.sk. rekomendācijas)	50
10.	LITERATŪRAS SARAKSTS	51
11.	PIELIKUMI.....	59

3. SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

μL – mikrolitri

blaKPC - beta laktamāzes *Klebsiella pneumoniae* karbapenemāze

CFU/mL - Colony Forming Unit / Koloniju veidojošā vienība mililitrā (KVV/mL)

DNS - dezoksiribonukleīnskābe

ESBL – extended spectrum beta-lactamase – paplašināta spektra beta laktamāzes

ESPKC - Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; Eiropas antimikrobiālās jutības testēšanas komiteja ir zinātniska komiteja

FIC – frakcionālā inhibējošā koncentrācija

FICI - frakcionālās inhibējošās koncentrācijas indekss

F_x - nezināmās koncentrācijas fāga šķīdums

g – grams

h – stunda

K.pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*

L – litri

McFarland – optiskās duļķainas etalons, standarts

mg – miligrams

MHB - Mueller-Hinton buljons

MIC – minimālā inhibējošā koncentrācija

min – minūte

mL - mililitri

MOI - *Multiplicity of Infection* vidējais fāgu (vīrusu) skaits uz vienu baktēriju.

NaCl – nātrija hlorīds

nfsA – gēns, kas kodē primāro nitroreduktāzi

nfsB – gēns, kas kodē sekundāro nitroreduktāzi

OD – Optical Density, optiskais blīvums.

PFU – plaque forming units; plaku veidojošās vienības

PVO - Pasaules Veselības Organizācija

RNS - ribonukleīnskābe

rpm – revolutions per minute; apgriezieni minūtē

SPKC - Slimību profilakses un kontroles centrs

TSA - Tryptic Soy Agar; triptikāzes sojas agars

TSB - Tryptic Soy Broth; triptikāzes sojas buljons

WHO – World Health Organisation

4. IEVADS

Klebsiella pneumoniae multirezistentu celmu izplatība ir nopietns drauds slimnīcās un sabiedrībā. Meta analīzē, kas publicēta 2024. gadā uzrāda, ka globāli 28,7% no *K.pneumoniae* izraisītajām pneimonijām ir karbapenēmu rezistentas baktērijas, kur, piemēram, Dienvidāfrikā >66% baktērijas bijušas rezistentas. [60] Karbapenēmu rezistentu baktēriju izraisītas infekcijas ir cieši saistītas ar augstākiem mirstības procentiem un limitētās ārstēšanas iespējām. [61] Ar 2024.gadu, Pasaules Veselības Organizācija ir pasludinājusi *K.pneumoniae* kā augstas prioritātes patogēnu. [45]

Ārstēšana tikai ar antibiotikām pret rezistentām baktērijām bieži ir neveiksmīga, tādēļ, ieteicams būtu izmantot bakteriofāgus. Bakteriofāgi it vīrusi, kas specifiski inficē un lizē baktērijas. Fāgiem ir vairākas priekšrocības – tie ir specifiski mērķa šūnām, neiznīcinot normālu mikrofluoru, spēj patstāvīgi replicēties infekcijas vietā un attīstīties, lai pārvarētu baktērijas aizsargsistēmu. [12]

Bakteriofāgu un antibiotikas kombinēšana ir stratēģija, lai uzlabotu antibakteriālo efektivitāti un mazinātu rezistences attīstību. Zhao 2024.gada pētījumā demonstrēts, ka antibiotiku-fāgu kombinācijas spēj ievērojami uzlabot baktēriju iznīcināšanu dzīvnieku modeļos.[62] Fāga-antibiotikas sinerģijai ir potenciāls iznīcināt rezistentas baktērijas, kur, fāgs iznīcinātu antibiotikas rezistentu baktēriju un antibiotika – fāga rezistentu baktēriju. Šie atklājumi izceļ kombinētās terapijas potenciālo klīnisko vērtību. [51]

Nitrofurantoīns un tam līdzīgie nitrofurānu derivāti ir interesējoša antibiotika kombinētajai terapijai. Nitrofurantoīns ir 70 gadus veca antibiotika, kas pārsteidzoši ir spējusi saglabāt salīdzinoši zemas antibakteriālās rezistences izplatīšanos, neskatoties uz to, ka to bieži izmanto urīnceļu infekciju ārstēšanā.[13] Tas ir izskaidrojams ar to, ka nitrofurantoīnu baktērijā aktīvi reducē nitroreduktāzes, kuras bojā vairākas baktērijas struktūras. Piemēram, pētījums Anglijā uzrāda, ka neatkarīgi no tā, ka nitrofurāni tiek aktīvi izrakstīti urīnceļu infekcijas ārstēšanai, rezistences attīstību nenovēro. [13] Atšķirībā no citiem bakteriostatiskiem medikamentiem, kas strauji pārtrauc baktērijas proteīnu sintēzi, nitrofurāni to dara pakāpeniski izraisot metabolisko stresu un veidojot apstākļus, kurā fāgi var replicēties.[48] 2025.gada fāgu-antibiotikas mijiedarbības pētījumā tika novērots, ka nitrofurantoīns un fāgs kombinācijā konstanti uzrāda sinerģiju. Turklāt, doksiciklīns, kas darbojas kā proteīnu sintēzes inhibitors, kombinācijā ar fāgu - novēro antagonismu.[48]

Ņemot vērā *K.pneumoniae* globālos multirezistences draudus, ir nepieciešams meklēt jaunus terapijas veidus. Maģistra darbā tika izmantots Furasols, kas ir Latvijā ražots medikaments, kurš pieejams aptiekās bez receptes. Furasola aktīvā viela ir furazidīns jeb furagīns, kas ir nitrofurāna derivāts. Furasols tika izmantots kā antibiotika visos veiktajos eksperimentos. Dati par furazidīnu antibakteriālo efektu literatūrā nav daudz aprakstīti, bet tas neliecina par to, ka tādēļ furazidīns būtu mazāk efektīvs.

Pētījuma mērķis

Pētīt nitrofurānu un bakteriofāgu mijiedarbību pret *Klebsiella pneumoniae*, to stabilitāti un antibakteriālo efektu.

Darba uzdevumi

1. Noteikt minimālo inhibīcijas koncentrāciju (MIC) izvēlētajiem *Klebsiella pneumoniae* celmiem, analizēt iegūtos rezultātus.
2. Veikt spot testu izvēlētajiem *Klebsiella pneumoniae* celmiem, lai atlasītu virulentus fāgus, mērķis atrast vismaz vienu kombināciju.
3. Noteikt atlasītā bakteriofāga titru, lai varētu veikt bakteriofāga un baktērijas mijiedarbības testus.
4. Veikt režģveida atšķaidījuma testu (checkerboard assay), izvērtējot baktērijas un fāga kombinācijas efektivitāti.
5. Veikt literatūras apskatu par nitrofurānu un bakteriofāgu stabilitātes īpatnībām un potenciālu izmantošanu nākotnē.

Darba hipotēze

Nitrofurāna un bakteriofāga kombinācija uzradīs labāku *Klebsiella pneumoniae* augšanas inhibīciju nekā antibiotika un fāgs atsevišķi.

5. LITERATŪRAS APSKATS

5.1. *Klebsiella pneumoniae* kā nozīmīgs patogēns un antibakteriālā rezistence

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) ir Gram-negatīva baktērija, kas ir oportūnisks patogēns. Šī baktērija spēj izraisīt pneimoniju, urīnceļu infekciju, inficēt asinrites sistēmu, kas var izraisīt sepsi. Tā ir īpaši bīstama slimnīcās, kur tā bieži kļūst par hospitālu infekciju dažādu manipulāciju veikšanas rezultātā, it īpaši, imūnsupresētiem pacientiem. [1]

Rezistences problēma ir nozīmīga visā pasaulē, jo tā nozīmīgi ietekmē cilvēka atveseļošanās ātrumu, kā arī izmaksas. *K. pneumoniae* ir kļuvusi rezistenta pret vairākām antibiotikām visā pasaulē, it sevišķi, pret karbapenēmiem, cefalosporīniem, fluorhinoloniem un aminoglikozīdiem. [10] Arī Eiropas Antimikrobiālās Jutības testēšanas komiteja (EUCAST), 2023. gadā izziņoja par augošu *K.pneumoniae* rezistences problēmu. [11]

Pēc Pasaules Veselības Organizācijas (PVO), (World Health Organisation, WHO) datiem 2017. gadā, ir ziņots, ka *K.pneumoniae* rezistence pret vairākām antibiotikām, tostarp karbapenēmiem, pieaug. Novērojot šos datus, PVO ir prioritizējusi *K.pneumoniae* kā patogēnu, kam steidzami nepieciešams izstrādāt jaunas ārstēšanas metodes un stratēģijas. [1]

Tāpat arī 2024. gadā, globālā situācija *K.pneumoniae* multirezistences problēma nav mainījusies. Karbapenēmu rezistenci novēroja 28,69% *K.pneumoniae* infekcijas gadījumiem globāli. Vislielāko gadījumu skaits novērojams Dienvidāzijā – 66,04%, kamēr Ziemeļamerikā novērojams zemākais gadījumu skaits – 14,29%. [2] Šī baktērija ir viens no vadošajiem Gram-negatīvu infekciju izraisītājiem pasaulē, kas būtiski veicina antibiotiku rezistences pieaugošo krīzi. [3]

Afrikā, Sierra Leone 2019.-2022. gadā *K.pneumoniae* tika izolēta 41,4% no visiem baktēriju izolātiem. Starp šiem izolātiem, 94,1% producēja paplašināta spektra beta-laktamāzes (ESBL), 20,4% bija karbapenēma rezistentas un 90,8% bija multirezistentas. [4] Etiopijā – no 2600 klīniskajiem paraugiem, kur 28,4% novēroja baktēriju augšanu, 20% no tiem bija *K.pneumoniae*. Pats ievērojamākais ir tas, ka šie izolāti bija 100% rezistentas pret nalidiksīnskābi (nalidixic acid – hinolonu grupa), cefotaksīmu un cefazolīnu. Savukārt, šīs baktērijas uzrādīja jutību pret nitrofurāniem (86,6%), imipenēmu (85,7%), merepenēmu (79%) un amikacīnu (78,3%). [5] Ir pieejami dati, ka jau 2013. gadā Ēģiptē 44,4% *K.pneumoniae* izolāti bija rezistenti pret ertapenēmu un 50% bija blaKPC (beta laktamāzes *Klebsiella*

pneumoniae karbapenemāze) gēna nēsātajās, kuras rezultātā iegūst rezistenci pret karbapenēmiem. [6]

Globāli, nitrofurānu *K.pneumoniae* rezistence ir zemāka nekā citām antibiotikām, kā arī, 2024. gadā netika novērots nitrofurānu rezistences pieaugums. [2] Piemēram, ASV 2012.-2019.gadā no ievāktajiem izolātiem 57,3% bija nejūtīgi pret nitrofurantoīnu. [7] Ķīnā no 2011.-2017.gada 23,1% uzrādīja rezistenci pret nitrofurantoīnu.[8] Turcijā ievāktie dati liecina 2018.-2022.gadā rezistence pret nitrofurantoīnu netiek izcelta, bet tiek norādīts, ka 53,3% rezistenti pret cefaksīmu, un 12,1% pret imipenēmu. [9]

5.2. Alternatīvas terapijas nozīme

Multirezistentu patogēnu izplatība pasaulē liek izpētīt jaunas terapijas iespējas. Bakteriofāgu terapija ir daudzsološa alternatīva antibiotikām. Bakteriofāgi kopā ar tradicionālajām antibiotiku terapijām spēj veidot sinerģiju.

Fāgi ir vīrusi, kas inficē un iznīcina baktērijas, arī multirezistentas. Bakteriofāgi ir specifiski – tie inficē tās baktērijas, kurām ir paredzēti, neskarot organisma kopējo mikrobiotu un spēj attīstīties kopā ar baktērijām. Fāgu terapijai ir ļoti liela nozīme personalizētajā medicīnā, jo kopā ar tradicionālajām antibiotiku terapijas metodēm, potenciāli var samazināties nepieciešamā antibiotiku deva sinerģisko efektu dēļ, kā arī, samazināt rezistences rašanos organismā esošajās baktērijās. [12] Antibiotikām un fāgiem terapijā ir gan plusi, gan mīnusi, tādēļ ļoti liela nozīme ir kombinētai terapijai, skatīt 5.2.1.tab. [12]

Tabula 5.2.1. Antibiotiku un bakteriofāgu salīdzinājums.[12]

Antibiotikas	Virulents bakteriofāgs
Aktivitāte un darbības mehānisms	
Bakteriostatisks vai baktericīds	Baktericīds
Mērķē uz viena procesa izjaukšanu	Traucē daudzus/visus bakteriālos procesus
Darbojas uz dažādām baktērijām	Specifisks konkrētai baktērijai

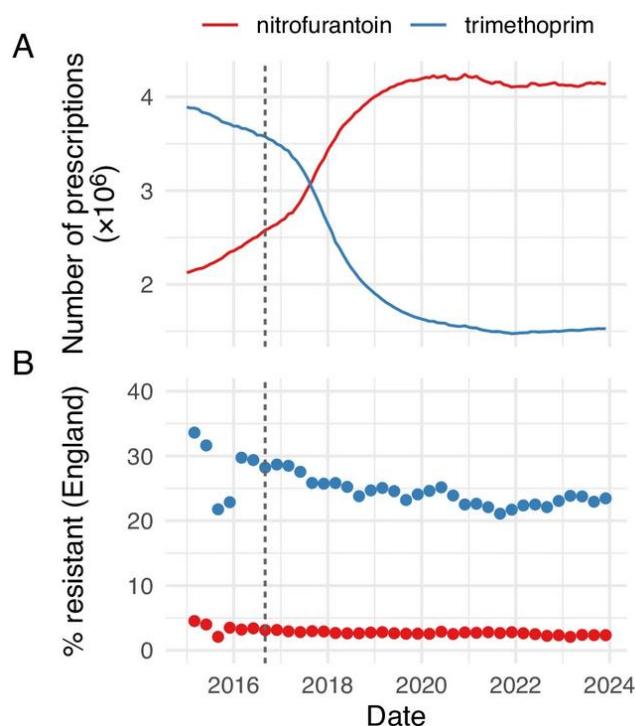
Tabulas 5.2.1.turpinājums.[12]

Izmaina mikrobiotu	Traucē tikai mērķbaktērijai
Neefektīgas pret biofilmām	Iznīcina biofilmas
Klīniskais pielietojums	
Minimāla baktērijas identifikācija	Fāgs jāpārbauda pret konkrēto baktēriju
Īss laiks starp diagnostiku un ārstēšanu	Ilgāks laiks lai diagnosticētu un ārstētu
Jānodrošina inhibitora deva	Vairojas pats, ja ir mērķbaktērija
Klīniskais pielietojums	
Potenciāla imūnās sistēmas atpazīšana	Potenciāla imūnās sistēmas atpazīšana
Plaši atpazīstama, apstiprināta metode	Iebildumi izmantošanai klīniskā praksē
Tiek cauri šūnu membrānām	Nespēj penetrēt eikariotu šūnas
Atklāšana, ražošana un izgatavošana	
Lēns atklāšanas process	Ātrs atklāšanas process
Izgatavošanas metodes zināmas un drošas	Izgatavojot jāattīra no liekiem proteīniem
Ražošanas regulācijas ir zināmas	Nepieciešamas jaunas regulācijas ražošanai
Rezistence	
Rezistence neizbēgama	Rezistence neizbēgama, bet fāgs var evolvēt kopā ar baktēriju
Rezistence rodas kopā ar kompensējošiem mehānismiem	Rezistenti mutanti kļūs jutīgāki pret antibiotikām

5.3. Nitrofurānu potenciāls izmantošanai pret *K.pneumoniae*

Nitrofurāns tiek reducēts ar baktērijas nitroreduktāzēm, kuras ražo gēni NfsA un NfsB, kā rezultātā tiek bojātas baktērijas šūnu komponentes. Rezultātā, unikālais darbības mehānisms ļauj bojāt vairākas šūnu komponentes baktērijā, piemēram, dezoksiribonukleīnskābes (DNS), ribonukleīnskābes (RNS) un proteīnus. Parasti, ja novēro rezistenci pret nitrofurāniem, novēro mutācijas minētajos divos gēnos. Ja izmaiņu novēro tikai vienā no gēniem, tas minimālā inhibīcijas koncentrācija (MIC) palielinās tikai mazliet, kas liecina, ka, lai rastos rezistence, jārodas izmaiņām vairākos gēnos. [13]

Anglijā veiktā pētījumā par periodu no 2015.-2023.gadam novēro, ka pieaugot nitrofurantoīna lietošanai, nepalielinās rezistence pret šo antibiotiku, bet trimetoprima lietošanas samazinājums tikpat strauji nesamazina rezistences problēmu, sk.5.3.1.att. [13].



5.3.1.att. Nitrofurantoīna saistība ar rezistences attīstību.[13] A.daļā norādīts izrakstīto medikamentu daudzums; B.daļā norādīts rezistences gadījumu daudzums procentos (%).

Nitrofurantoīns visaugstāko koncentrāciju sasniedz urīnā, bet tam ir limitēta uzsūkšanās audos. Šī iemesla dēļ, samazinās antibiotikas saskarsme ar lielāku baktēriju skaitu, izvairoties no rezistences rašanos citās baktērijās. Nitrofurānus cenšas izmantot terapijai, nevis profilaksei, lai ierobežotu nevajadzīgu saskarsmi ar citām baktērijām, kā rezultātā, limitētu iespēju rasties baktēriju rezistencei. [14]

5.4. *Klebsiella pneumoniae* bioloģija un klīniskā nozīme

K.pneumoniae ir Gram-negatīva, nekustīga baktērija, kurai raksturīga forma ir – nūjiņas un uz agara tipiski veido gļotainas kolonijas. Tā pieder Enterobacteriaceae dzimtai, kurā atrodas arī citas klīniski nozīmīgas ģintis, kā *Salmonella* un *Escherichia*. [15] Virulences nodrošināšanai, *K.pneumoniae* ir vairāki patogenitātes mehānismi:

1. **Kapsula:** baktērijas kapsula sastāv no polisaharīdiem, kas pasargā baktēriju no imūnās sistēmas šūnu izraisītās fagocitozes. [16]
2. **Biofilmu veidošana:** veidojot biofilmas, baktērijas efektīgi kolonizē medicīniskās iekārtas, kā arī, cilvēka audus. Biofilmas pasargā baktēriju no antibiotiku ietekmes un imūnās sistēmas atbildes reakcijas, kas padara ārstēšanu izaicinošu. [17]
3. **Siderofori:** palīdz baktērijai efektīgi piesaistīt dzelzs molekulas (Fe^{3+}), kas ir neaizstājams mikroelements, lai baktērija spētu augt un veidot kolonijas, skatīt tab. 5.4.1. [18]

Tabula 5.4.1. Sideroforu veidi

Siderofors	Īpašības
Enterobaktīns	Spēcīgi saista dzelzs molekulas, bet imūnās sistēmas aizsargproteīns Lipokalin-2 novērš dzelzs pieejamību baktērijai
Jersiniabaktīns	Apiet imūnsistēmas aizsardzību, palielina virulenci. Šos sauc par hipervirulentiem celmiem.
Salmochelīns	Modificēts enterobaktīns, kas palīdz izvairīties no lipokalin-2 atpazīšanas. Šos sauc par hipervirulentiem celmiem.

4. **Fimbrijas / adhezīni:** lai piesaistītos saimniekorganisma šūnām, *K.pneumoniae* ir pirmā tipa (Type1) un trešā tipa (Type3) fimbrijas. Pirmā tipa fimbrijas palīdz baktērijai piesaistīties pie urīnceļu epitēlijšūnām, visbiežāk izraisot urīnceļu infekcijas. Trešā tipa fimbrijas spēj ne tikai piesaistīties šūnām, bet sekmē biofilmu veidošanos uz abiotiskām visrmām, piemēram, medicīnas iekārtām. [19]

5.5. Tipiskās infekciju slimības, kuras izraisa *K.pneumoniae*

K.pneumoniae ir spējīga izraisīt dažādas infekcijas, visbiežāk šīs infekcijas iegūst pacienti slimnīcās vai imūnsupresēti pacienti:

1. **Urīnceļu infekcijas:** urīnceļu infekciju, kuru izraisījusi *K.pneumoniae*, bieži kategorizē kā hospitāļu infekciju, kura iegūta ilgstošu urīnceļu katetru izmantošanas rezultātā. Baktērijām katetra virsma ir ideāla vieta, kur piestiprināties un veidot biofilmas. [20]
2. **Elpceļu infekcijas:** slimnīcā iegūta pneimonija vai ar ventilatoru saistīta pneimonija, kuru izraisījusi *K.pneumoniae* intensīvās aprūpes nodaļās. Šādi iegūta pneimonija bieži saistīta ar paaugstinātu mirstību multirezistences problēmas dēļ. [21] Piemēram, *K.pneumoniae* ir galvenais iemesls, kas izraisa pneimoniju pacientiem, kam tiek veikta plaušu ventilācija. Rezultātā, baktērija aktīvi veidos biofilmas un, ja baktērija ir multirezistenta, to būs apgrūtināši ārstēt un paaugstinās mirstības rādītāji. [21]
3. **Brūču infekcijas:** *K.pneumoniae* ir viena no galvenajām brūču infekciju izraisošajām baktērijām. Baktērijas izraisītas infekcijas aktīvi veido biofilmas. [22] Ja baktērija ir multirezistenta, ārstēšana kļūst apgrūtināša un var rezultēties lēnākā brūču dzīšanā vai sepsē. Šie faktori ir īpaši bīstami pacientiem pēc operācijām vai traumas gadījumā. [23]
4. **Sepse:** baktērijas izraisīta sepsis ir kritisks pacienta stāvoklis, kurš bieži saistīts ar paaugstinātu mirstību, it sevišķi, ja baktērija ir multirezistenta. Tumbarello pētījumā novēro, ka 14 dienu laikā novēro 34,1% mirstību pacientiem, kuriem infekciju izraisījusi karbapenēmu rezistenta *K.pneumoniae*. Dati vākti Itālijas slimnīcās 4 gadus (2010.-2013.g.).[24] Korejas, Seoul datos par periodu 2011.-2021.gads, novēro līdzīgus datus – karbapenēmu rezistenta *K.pneumoniae* 30 dienu laikā izraisa mirstību 38,0% pacientiem ar sepsi.[25]
5. **Citas infekcijas:** hipervirulenta *K.pneumoniae* var izraisīt arī meningītu, acu infekcijas, aknu abscesus. Šādos gadījumos ir svarīgi steidzīgi uzsākt ārstēšanu, lai samazinātu komplikāciju risku. [18]

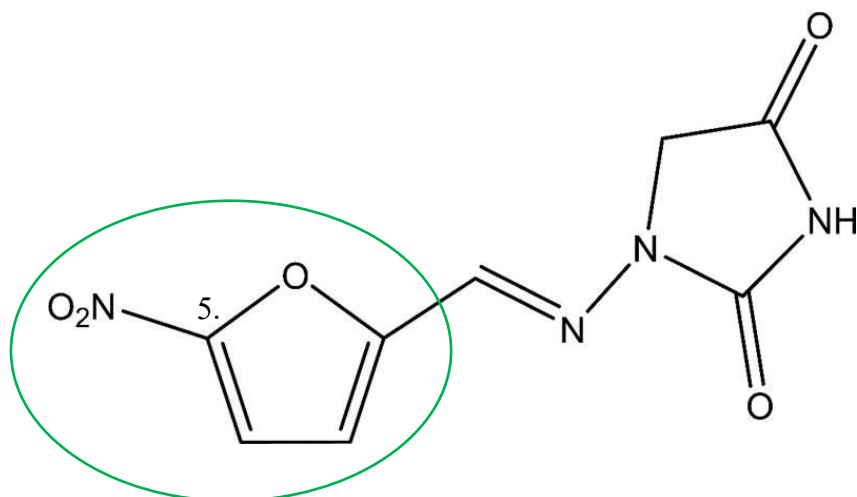
5.6. Antibakteriālās rezistences situācija Latvijā *K.pneumoniae* kontekstā

Antibakteriālās rezistences situācija Latvijā, kas saistīta ar *Klebsiella pneumoniae* atspoguļo globālās tendences. Dati, kurus sniedzis Slimību profilakses un kontroles centrs (SPKC) sadarbībā ar Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs (ESPKC) par 2021.gadu uzrāda, ka *K.pneumoniae* rezistence pret trešās ģenerācijas cefalosporīniem un karbapenēmiem vēl joprojām rada bažas Latvijas slimnīcās. [26;27] Latvijā, 2021.gadā 8,2 % no *Klebsiella pneumoniae* izolātiem bija rezistenti pret karbapenēmiem, kas uzrāda pieaugumu, salīdzinot ar 2020.gada 7,5%. Eiropā kopumā novēro, ka *K.pneumoniae* rezistence pret karbapenēmiem pieaug: no 2016.-2017. gadam rezistenci novēro 8,7% izolātiem un 2022.-2023.gada statistika rāda, ka jau 11,7% *K.pneumoniae* izolāti uzrāda karbapenēmu rezistenci. [26] Šīs tendences liecina par nepieciešamību veidot jaunas ārstēšanas metodes.

Dati par nitrofurānu rezistenci netiek apkopoti, jo šī nav izplatīta problēma, bet ir individuāli pētījumi, kuros apskata gadījumus, kuros rezistence ir novērota. Vienā no pētījumiem tiek minēts, ka *K.pneumoniae* rezistence pret nitrofurāniem ir saistīta ar efluksa sūkņa regulējošā gēna *oqxR* mutāciju. Šīs mutācijas rezultātā notiek pārmērīga gēna ekspresija kā rezultātā nitrofurantoīna koncentrācija baktērijā samazinās un pazeminās efektivitāte. [28] Tiek novēroti dažādi nitroreduktāžu aktivitātes līmeņi *K. pneumoniae* izolātos. Jo augstāka nitroreduktāžu aktivitāte, jo jutīgāka baktērija ir pret antibiotiku. Tomēr, tādi klīniski nozīmīgi celmi kā ST258 un ST11 uzrāda zemu nitroreduktāžu līmeni, kas var rezultēties nitrofurānu rezistencē. [29] Varam secināt, ka zināt baktērijas celmu ir nozīmīgi, jo rezultātā var precīzāk izvērtēt un pielāgot pacienta ārstēšanās iespējas. Piemēram, zinot, ka ST258 celms ir globāli izplatīts un bieži saistīts ar karbapenēmu rezistenci, varam sagaidīt, ka baktērija būs rezistenta arī pret nitrofurāniem zemās nitroreduktāzes aktivitātes dēļ. [30]

5.7. Nitrofurāni kā antibakteriālie līdzekļi

Nitrofurāni ir sintētisko antibakteriālo līdzekļu grupa, kuriem raksturīgs 5-nitrofurāna gredzens (sk. att. 7.7.1.), kas ir saistīts ar dažādām sānu ķēdēm. Viens no zināmākajiem nitrofurāniem ir nitrofurantoīns. [31] Ķīmiskās struktūras konfigurācijai ir izšķiroša nozīme antibakteriālā līdzekļa efektivitātē. Tomēr, tiek atzīmēts, ka svarīgi ir saglabāt savienojumu lipofīliskās īpašības. [32]



5.7.1.att. Nitrofurāna savienojums.

Nitrofurānu darbības mehānisms ir komplekss, jo tas iedarbojas uz dažādām baktērijas komponentēm. Šie savienojumi ir aktīvi, spēj iedarboties uz baktērijas DNS, ribosomu proteīniem un citiem mehānismiem, tādējādi apturot baktēriju augšanu.[32] Rezultātā – nitrofurāniem ir plašas iedarbības spektrs un tādēļ bieži netiek novērota nitrofurānu bakteriālā rezistence. Tomēr, mutācijas gēnā *nfsA* un *nfsB* ir iespējama iemesls nitrofurānu rezistencei *E.coli* baktērijās.[33]

Nitrofurānu darbības mehānisms :

1. Nitrofurantoīns akumulējas baktērijas citosolā, kur tas mijiedarbojas ar nitroreduktāzēm (*NfsA* un *NfsB*). Starpprodukti, kas rodas procesa rezultātā, inhibē baktērijas augšanu ietekmējot DNS un proteīnu sintēzi vai arī, iesaistās citos metabolisma procesos.
2. Baktērija kļūst rezistenta iegūstot mutācijas *nfsA*, *nfsB* un *ribE* gēnos, kas tām liedz mijiedarboties ar nitrofurantoīnu.
3. *OqxAB* efluksa pumpja klātesamība paaugstina rezistenci sūknējot nitrofurantoīnu ārā no baktērijas. [37]

5.7.1. Galvenie nitrofurānu pārstāvji

Nitrofurantoīns ir viens no visbiežāk lietotajiem medikamentiem, lai ārstētu urīnceļu infekcijas. Nonākot baktērijā, tā reaģē ar starpprodukti bojā vairākas baktērijas struktūras. [38] Nitrofurals jeb furacilīns parasti tiek lietots ārēji kā antiseptiķis brūcēs. Tas ir nitrofurāna atvasinājums, kas reducējoties veido aktīvās formas, kas bojā baktēriju komponentes.[39]

Furazidīns jeb furagīns tiek izmantots brūcēs un mutes dobuma skalošanai. Tāpat kā iepriekš minētie nitrofurāni, arī furazidīnu baktērijas enzīmi pārveido to reaktīvās formās, kuras bojā baktērijas iekšējās struktūras. [40] Furazolidonu izmanto, lai ārstētu bakteriālas infekcijas, kā arī protozoju infekcijas. Atšķirībā no citiem minētajiem nitrofurāniem, tas funkcionē kā monoamīna oksidāzes inhibitors un producē starpproduktus, kas mijiedarbojas ar baktērijas DNS. [41]

5.8. Bakteriofāgi un to pielietošana antibakteriālā terapijā

Ir zināmi divi fāgu veidi – lītiskie un temperētie fāgi. Lītiskie jeb virulentie fāgi strauji lizē baktērijas, kamēr temperētie fāgi iekooperējas baktērijas genomā uzreiz to nelizējot. Terapijā priekšroka tiek dota lītiskajiem fāgiem. [42] Fāgi inficē baktērijas adsorbējoties pie specifiskiem receptoriem (kapsulāriem polisaharīdiem) uz baktērijas virsmas. Pēc fāga genoma injecēšanas, saimniekšūna – baktērija tiek pārņemta, lai “ražotu” jaunus fāgus, kas rezultējas baktērijas līzē. [43]

K.pneumoniae kontekstā, ļoti liela nozīme ir fāgu depolimerāzēm, kas palīdz degradēt baktērijas kapsulu. Rezultātā, palielinās baktērijas uzņēmība pret antibiotikām. Lai cīnītos pret fāgu, baktērija var samazināt rezistences spēju pret antibiotiku – tiek novērota sinerģiska darbība starp antibiotiku un fāgu. Visefektīvāk ir izmantot fāgu kokteiļus, jo tas sniedz visplašāko depolimerāžu veidojošu fāgu spektru. [43]

Klīniskajā pētījumā ar pelēm ir mēģināts izmantot fāga-antibiotikas kombināciju, lai ārstētu multirezistentu *K.pneumoniae* pneimoniju. Pētījums tika veikts uz pelēm, kur novēroja sinerģisku antibiotikas-fāga efektu. Kamēr fāgs degradē baktērijas kapsulu, uzlabojas antibiotiku caurlaidība. Antibiotikas spēj nomāc līdzīgus *K.pneumoniae* celmus, piemēram, kuri ir mazāk jutīgi pret fāgu vai fāgu rezistenti. Kombinēta terapija palīdz izvairīties no fāgu rezistences, un, ja tomēr tā attīstās, baktērija kļūs uzņēmīgāka pret antibiotikām. [44]

5.8.1. Nitrofurānu un fāgu terapijas iespējas

Antibiotikas un fāga kombinācijai ir potenciāls atjaunot antibiotisko efektu pat rezistentām baktērijām. [46] Šim antibiotikas-fāga sinerģijas efektam ir potenciāls iznīcināt baktērijas pirms rezistences rašanās [47].

Fāga-antibiotikas sinerģija rodas tad, kad fāga un antibiotikas efekts ir spēcīgāks nekā katra individuālais efekts. Tas, kāds ir antibiotikas darbības mehānisms, ietekmē to vai fāgam būs sinerģiska vai antagoniska aktivitāte [48]. Nitrofurāna blakusprodukti, kas tiek reducēti baktērijā, izraisa DNS bojājumus, proteīnu disfunkciju un vispārēju metabolisku stresu samazinot transkripcijas aktivitāti [48]. Svarīgi ir tas, ka nitrofurantoīns neietekmē šūnas sienas proteīnu sintēzi letālos daudzumos, bet drīzāk aktivizē baktērijas DNS bojājuma stresa reakciju, kuras rezultātā samazinās baktērijas augšana. Kontrastā ar tetraciklīnu, tie pārtrauc ribosomu darbību un pārtrauc fāgu spēju replicēties. Attiecīgi, Mulla et.al. pētījumā ir aprakstīts, ka doksiciklīnam bija antagonisms ar fāgu, bet nitrofurantoīnam – konstanti novēroja fāgu sinerģiju [48]. Var secināt, ka nitrofurāni veido labus apstākļus fāgu darbībai.

Nitrofurānu izraisītais DNS bojājums aktivizē stresa atbildes reakciju, kas var aktivizēt temperētus fāgus uzsākt lītisko ciklu. Piemēram, antibiotikas kā fluorhinoloni un sulfonamīdi jau ir parādījuši spēju veidot sinerģiju ar temperētiem fāgiem un likt tiem replicēties. [49] Tiek uzskatīts, ka nitrofurantoīnam, kā DNS-bojātājam, varētu būt līdzīgs efekts pret temperētiem fāgiem. Izmantojot kombinētu terapiju, baktērijai ir grūtāk adaptēties. Piemēram, fāgs, kas ietekmēja baktērijas efluksa sūkni, lika baktērijai to apzaudēt, kas padarīja baktēriju jutīgu pret antibiotikām.[50] Principā, fāgs, kas piesaistās OqxAB efluksa pumpim (kurš ir atbildīgs par nitrofurānu rezistenci), ar laiku baktērija kļuva rezistenta pret fāgu atbrīvojoties no efluksa pumpjiem, bet rezultātā, tā kļuva atkal jutīga pret antibiotikām.[46] Nitrofurānu un fāgu kombinācijai potenciāls efektīvi iznīcināt baktērijas, novērst rezistences rašanos, samazināt nepieciešamo antibiotikas devu.[51]

Nitrofurāni ir zināmi kā fāgu-draudzīga antibiotika, kas izraisa minimālu antagonismu eksperimentālās sistēmās.[48] Nitrofurāni, kas ir 70 gadus veca antibiotika, var kļūt par lielisku piemēru, kur vecākas tehnoloģijas apvienojas ar jaunākām, radot sinerģisku efektu darbībā pret baktērijām.

5.9. Nitrofurānu un fāgu stabilitātes jautājums

Fāgu-antibiotiku kombinētā terapija kļūst arvien izmantotāka, lai cīnītos pret bakteriālām slimībām. Nitrofurānus plaši izmanto Eiropā urīnceļu infekcijas slimību gadījumā. [52] Tomēr, lai veiksmīgi izmantotu fāgu-antibiotikas terapiju, ir nepieciešams saprast vai antibiotika un fāgs suspensijā spēj būt stabils un nezaudēt savu efektivitāti.

Nitrofurāniem ir zināmi ierobežojumi, kas saistīti ar pH, temperatūtu un jutību pret gaismu. Furazidīns, kas ir 5-nitrofurāna derivāts, ir ķīmiski un strukturāli analogs nitrofuranoīnam, kā rezultātā, abām vielām ir līdzīgas stabilitātes īpatnības. [53] Nitrofurantoīns darbojas kā vāja skābe ar $pK_a = 7,2$ un tam ir vidēja šķīdība ūdenī. Viela ir stabila nedaudz skābākā vidē, bet arī neitrāla vide būs pieņemama. Sārmainā, skābā, augstas temperatūras vidē, viela degradēsies. [54] Ir novērots, ka sauss nitrofurantoīns saskarē ar sārmiem vai spēcīgiem saules stariem, degradējas. Viela paliek tumšāka, kas darbojas kā indikators par tās degradāciju. Tātad, nitrofurantoīns jāglabā tumšā, aizvērtā traukā – istabas temperatūrā, $<25^{\circ}\text{C}$. Šķīdumos, nitrofurantoīns saglabā stabilitāti $\sim 4,5-6,5$ pH šķīdumos un zaudē savu potenci ārpus šī diapazona. Sasaldēšana ir kontrindicēta, jo atkausējot kristāliskā struktūra zaudē savas īpašības un notiek degradācija. [54]

Furazidīnam, kā nitrofurānu derivātam, arī ir līdzīgas īpašības kā nitrofurantoīnam. Furazidīns šķīdumos uzrāda īpaši augstu stabilitāti skābos šķīdumos (pH 1-2), kamēr degradācija notiek sārmainos šķīdumos. [55] Šāda pH šķīdumu ražošana nav piemērota izmantošanai orāliem līdzekļiem, jo zemais pH kairinātu mutes gļotādu. Šī iemesla dēļ, furagīns parasti ir tabletēs, kas nodrošina stabilitāti. Pašlaik notiek pētījumi, lai stabilizētu furazidīnu šķidrā suspensijā neitrālā pH nezaudējot stabilitāti un derīguma termiņu. [55] Nitrofurānu pulveris ir jāuzglabā zem 25°C , lai samazinātu degradācijas risku. [54]

Kopumā, furagīns un nitrofurantoīns ir stabili vēsā, tumšā konteinerā ar nedaudz skābu pH. Degradācija notiek karstuma, UV starojuma vai sārmaina pH ietekmē. Šie punkti ir jāievēro formulējot fāga-nitrofurāna suspensijas. Jāpiemin, ka nitrofurāna degradācija tiek katalizēta, ja tas nonāk saskarē ar metāliem, izņemot nerūsējošo tēraudu un alumīniju, kas nozīmē, ka rūpīgi jāizvēlas medikamenta piegādes iekārtas, instrumenti. [54]

Bakteriofāgu stabilitāti ietekmē gan, temperatūra, gan pH. Fāgi ir stabilāki, ja tos uzglabā ledusskapī piemērotos buferšķīdumos vai arī, tos var liofilizēt kopā ar stabilizatoriem. Ekstrēma pH (ļoti sārmaina vai skāba) vai augstas temperatūras ietekmē, fāgi var inaktivēties. Optimāls fāgu pH=5-6. [56] Salīdzinoši ar nitrofurāniem, fāgus var saldēt -80°C glicerolā vai šķidrā

slāpekļi, var arī veikt liofilizāciju. Tomēr, vairākkārtēji sasaldēt un atsaldēt fāgus nav ieteicams. [58] Visbiežāk izmantotā metode gan finansiāli, gan pieejamības kontekstā, ir glabāšana 4°C, tipiski buferšķīdumos. Biežāk izmantotie buferšķīdumi - 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Liofilizācija var izraisīt fāgu titra samazināšanos, bet ir opcija fāgus sasaldēt kopā ar baktērijām kamēr vēl nav sākusies baktērijas lizēšana. [57] Ranver et.al. pētījumā tika pētīti kolifāgi T4 un T7 (zarnu nūjiņu fāgi), kuri bija dzīvotspējīgi pat pēc 10-20 gadiem 4 °C. Fāgu stabilitāte zūd 37-42°C, kur lielākā daļa fāgu zaudē savu virulenci nedēļās laikā. [58]

Fāgu suspensijas pH ir nozīmīgs, kamēr ap pH = 7, fāgi mazliet sāk zaudēt aktivitāti, tikmēr skābā vidē, kur pH < 4 fāgu inaktivācija ir neatgriezeniska. Fāgi labāk iztur sārmainu vidi, bet pie pH = 10, notiek fāgu inaktivācija. Ir izņēmumi, piemēram fāgs M13 spēj izdzīvot pH=2 vidē. [58]

Arī šķīduma kompozīcijai, kurā atrodas fāgs, ir nozīmīgs parametrs. Buferšķīdumos esošie divalentie katjoni ļauj saglabāt fāga kapsīdu. Fāgu formulācija gēlos, kapsulās un aerosolos rada izaicinājumus, jo fāgs nonāks kontaktā ar dažādām osmotikām vielām un dažādiem šķīdinātājiem. Tādēļ, fāgu formulēšanā izmanto polimērus, cukurus vai lipīdu nano-pārnesējus, kas uzlabotu fāga stabilitāti stresa apstākļos. [56]

Svarīgi ir saprast, ka fāgu stabilitāte mainās atkarībā no fāgu tipa. Piemēram, fāgi ar astēm (no *Caudovirales* kārtas) uzrāda labāku stabilitāti nekā fāgi ar filamentiem vai specifisku lipīdu saturoši fāgi. Morfoloģijai ir nozīme, piemēra miovīrusi (fāgi ar kontraktīlām astēm) uzrāda labāku stabilitāti nekā podovīrusi vai sipovīrusi. Izriet secinājums, ka fāgu stabilitātes testi būtu nepieciešami katrai fāgu grupai. [59]

Neskatoties uz dažādu fāgu veidiem, var pielietot vispār zināmus fāgiem draudzīgos apstākļus, piemēram, uzglabāt 4 °C un ~pH=7 buferšķīdumā, kas nodrošinās nemainīgu fāgu titru. Lietošanai praksē, fāgus var nogādāt nepieciešamajā rajonā izmantojot fizioloģisko šķīdumu. Ja fāgu nepieciešams nogādāt caur muti, tad var izmantot dažādas iekapsulēšanas metodes, lai pasargātu fāgus no agresīvās kuņģa skābes vides.[58]

No nitrofurānu ķīmiskā skatu punkta, izmantotais Furasols, kura aktīvā viela ir furagīns pie pH=7 varētu sākt pakāpeniski degradēties. Tādēļ, furagīna+fāga kombinācijas suspensijas pH varētu būt 5-6, kas ir fāga tolerances robežās, bet pietiekoši skāba, lai nenotiktu strauja furagīna degradācija. [54]

Mulla et.al. 2023.gada pētījumā tika apskatīts, kā mijiedarbojas fāgs ar nitrofurantoīnu un rezultāti bija pārlicinoši – visi testētie fāgi vai nu saglabāja, vai paaugstināja savu baktericīdo darbību kombinācijā ar nitrofurantoīnu un neviens no izmantotajiem fāgiem neuzrādīja

antagonismu. [48] Šis rezultāts nav tik pārsteidzošs zinot, ka nitrofurāni iedarbojas uz vairākām baktēriju komponentēm un tas nenotiek tik strauji, kā rezultātā, fāgam ir laiks replicēties. Stabilitātes apkopojumu skatīt tab. 5.9.1.

Tabula 5.9.1. Nitrofurānu un bakteriofāgu stabilitātes faktoru salīdzinājums.

Faktors	Nitrofurāni (piem. furagīns, nitrofurantoīns)	Bakteriofāgi
Optimālais pH	4,5–6,5 (furazidīnam stabils arī pH 1–2); degradācija ārpus šī diapazona	5–6 optimāli; virs pH 7 sāk zaudēt aktivitāti, pH <4 – inaktivējas
Stabilitāte neitrālā vidē pH ~7	Samazināta – notiek pakāpeniska degradācija (īpaši furagīnam)	Tolerē, bet sākas aktivitātes zudums
Stabilitāte sārmainā vidē pH >7,5	Strauja degradācija	Lielākoties stabils līdz pH 10, pēc tam notiek inaktivācija
Stabilitāte skābā vidē pH <4	Furazidīns stabils (bet nepiemērots iekšķīgai lietošanai)	Neatgriezeniska inaktivācija lielākajai daļai fāgu
Optimālā temperatūra	<25 °C (istabas temperatūra)	4 °C uzglabāšanai; virulences zudums virs 37 °C
Karstuma ietekme	Degradējas, kļūst tumšāks, zaudē aktivitāti	Nedējas laikā zūd aktivitāte 37–42 °C temperatūrā
Saldēšana	Kontrindicēta (strukturālas bojājumi atkausējot)	Iespējama (-80 °C glicerolā vai šķ. slāpekļī); jāizvairās no atkārtotas sasaldēšanas
Gaismas ietekme (UV)	Jutīgs – īpaši sausā veidā UV starojums katalizē degradāciju	Arī fāgi jutīgi pret UV – var tikt inaktivēti
Metālu ietekme	Degradācija kontaktā ar metāliem, izņemot nerūsējošu tēraudu un alumīniju	Neminēta tieša ietekme, bet stabilitāte atkarīga no vides
Glabāšanas forma	Tabletes (nodrošina stabilitāti); pulveris <25 °C, tumsā	Buferšķīdumos 4 °C; iespējama liofilizācija
Formulēšanas izaicinājumi	pH, temperatūras kontrole; nepiemērots pie sārmaina pH	Stabilitāte atkarīga no fāga morfoloģijas, buferšķīdumiem
Saderība kombinācijā	Nepieciešams pH ~5–6, lai nodrošinātu stabilitāti un fāga toleranci	~pH 5–6 ir pieņemams arī fāgiem – iespējama kombinācija

6. MATERIĀLS UN METODES

6.1. Baktēriju atlase

Lai iegūtu nepieciešamos testu rezultātus tika veikta *Klebsiella pneumoniae* atlase no Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras biobankas, kuru paraugi ir sākotnēji iegūti no cilvēka materiāla vai vides parauga. Baktēriju tīrkultūras tiek izdalītas uz sterilām triptikāzes sojas agara platēm (TSA).

1. Ar sterilu cilpu ņem izsējamo paraugu.
2. Materiāls tiek izsēts pēc Golda metodes (trīs segmentos), kur pēc katra segmenta tiek mainīta cilpa.
3. Plati inkubē $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-20 stundas. Nākamajā dienā - pēdējā jeb trešajā segmentā novēro atsevišķu baktērijas koloniju veidošanos.

6.2. Antibakteriālās jutības noteikšana ar Vitek 2 Systems iekārtu

Mērķis: noteikt izvēlēto *Klebsiella pneumoniae* jutību pret nitrofurāniem.

Materiāli un reaģenti:

1. Svaigi audzēta baktēriju kultūra.
2. Sterils 0,45-0,50 % NaCl šķīdums (pH no 4,5-7,0).
3. Caurspīdīga polistirola mēģene (12mm x 75mm), mikrobioloģijas cilpas, 1 μL . (Sarstedt AG & Co. KG, Vācija)
4. VITEK 2 instruments, kasetes. (bioMérieux SA, Francija)
5. Densimetrs DEN-1 McFarland suspensijas sagatavošanai. (Biosan, Latvija)

Darba gaita:

1. Polistirola mēģenē iepilda 3mL NaCl šķīduma.
2. No svaigas baktēriju kultūras polistirola mēģenē sagatavo inokulumu, kas atbilst 0,50 – 0,63 McFarland. Ja duļķainība ir pa lielu, pievieno NaCl, ja par mazu, tad pievieno vēl baktērijas.
3. Suspensiju nedrīkst pagatavot ātrāk par 30 minūtēm pirms plates inokulācijas.
4. Izvēlas nepieciešamo VITEK 2 kaseti, piemēram, GN – gramnegatīvo baktēriju jutības noteikšanai.

5. Sagatavoto mēģeni ar baktēriju suspensiju ievieto paredzētajā vietā blakus kasetei.
6. VITEK 2 instruments automātiski pārnes suspensiju no mēģenes uz karti, aizpildot visas vajadzīgās pozīcijas. Sistēma automātiski veic jutības interpretāciju.

6.3. MIC noteikšana *Klebsiella pneumoniae* Furasolā pēc EUCAST standartiem

Mērķis: noteikt *Klebsiella pneumoniae* minimālo inhibējošo koncentrāciju (MIC) Furasolā izmantojot buljona mikrodilūcijas metodi pēc EUCAST standartiem.

Materiāli un reaģenti:

1. Svaigi audzēta baktēriju kultūra.
2. Furasol (šķīstošais furagīns): katra pulvera paciņa satur 100 mg šķīstošā furagīna, kas atbilst 87,4 g tīra furagīna. (Olainfarm, Latvija); Mueller-Hinton buljons (MHB) nefastidioziem mikroorganismiem. (Biomaxima, Poland)
6. 96-bedrīšu mikroplates (Thermo Scintific, Amerikas Savienotās Valstis), sterilas stikla mēģenes 15mL, 50 µL, 300 µL un 5000 µL pipetes (Sartorius AG, Vācija; Eppendorf SE, Vācija) un sterili uzgaļi, mikrobioloģijas cilpas 1µL (Sarstedt AG & Co. KG, Vācija).
3. Analītiskie svāri, ūdens vanna ar regulējamu temperatūru, Vortex maisītājs (Biosan, Latvija). Inkubators/termostats (Infors HT Ecotron, Šveice); VarioskanLUX (Thermo Scintific, Amerikas Savienotās Valstis) optiskā blīvuma (OD – optical density) mērījumiem.
4. Sterila darba vide – dezinfekcijas šķīdums, spirta lampiņa.

6.3.1. 512 mg/L furagīna atšķaidījuma sagatavošana

Mērķis: Izveidot 1024 mg/L furagīna šķīdumu no Furasol pulvera MIC noteikšanai.

Nepieciešamais furagīna šķīduma daudzums: 200 µL vienai bedrītei, lai veiktu dubultatšķaidījumus.

Lai sagatavotu furagīna šķīdumu ar vēlamu koncentrāciju C (mg/L) un tilpumu V (mL), izmanto šādu formulu:

$$W = \frac{C \cdot V}{P}$$

kur:

W – nepieciešamā pulvera masa (mg)

C – gala koncentrācija (mg/L)

V – tilpums (L)

P – aktīvās vielas daudzums pulverī (mg)

Darba gaita:

1. Mueller-Hinton buljonu (MHB) uzsilda ūdens vannā 45-55 °C, lai nodrošinātu Furasola izšķīšanu.
2. Nosver nepieciešamo daudzumu Furasol pulvera.
3. Izšķīdina pusē no nepieciešamā kopējā tilpuma MHB buljonā, piemēram, ja gala tilpums vajadzīgs 50 mL, tad izšķīdina 25 mL un tad, kad viela izšķīdusi, uzpilda līdz 50 mL, lai nodrošinātu labāku vielas izšķīšanu.
4. Vielu šķīdina vorteksējot vai maisot aplveida kustībām līdz viela ir pilnībā izšķīdusi.

6.3.2. Baktēriju inokulāta sagatavošana

Darba gaita:

1. Iegūst *Klebsiella pneumoniae* baktēriju kolonijas: izvēlas 2-3 labi izolētas kolonijas no svaigas kultūras (audzēts 18-24h uz TSA).
2. Sagatavo 0,5 McFarland standarta suspensiju ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL) – ņemtās 2-3 kolonijas pievieno 3-5 mL MHB, samaisa 15mL mēģenē.
3. Ja nepieciešami McFarland pielāgojumi, var pievienot vairāk šķīdinātāja vai, ja duļķainība ir pārāk maza, pievieno vairāk kolonijas.
4. Veic 1:100 atšķaidījumu, lai iegūtu 1.5×10^6 CFU/mL
 - a. 50 µL 0,5 McFarland suspensijas pievieno 4,95 mL MHB.
 - b. Rūpīgi samaisa ar pipeti vai vorteksu.
5. 100 µL inokulātu pipetē katrā akā, arī pozitīvas kontroles akā.
6. Gala CFU/mL katrā akā būs 5×10^5 CFU/mL, kas atbilst EUCAST prasībām.

6.3.3. Mikroplates sagatavošana un MIC noteikšana

Mikroplates sagatavošanas darba gaita:

1. Vispirms 2.-12. kolonnā pievieno MHB 100 µL. 12. rindā pievieno 200 µL.
2. Pirmajā kolonnā iepilda 200µL 1024 mg/L sagatavoto furagīna šķīdumu
3. No 1. kolonnas ņem 100 µL un pipetē otrajā kolonnā, samaisot ar to pašu pipeti.
4. Turpina atšķaidīšanu līdz vēlamajai koncentrācijai – 2 mg/L jeb 10.kolonnai izmantojot tos pašus uzgaļus.
5. No pēdējās akas 100 µL izlej, lai saglabātu bedrītēs vienādu daudzumu jeb 100 µL.
6. Katrā bedrītē pievieno 100 µL iepriekš sagatavoto baktēriju suspensijas - 5×10^6 CFU/mL, koncentrācijas atšķaidās vēlreiz.
7. Pozitīvā kontrole (11.kolonna): bedrītē pievieno 100µL baktēriju suspensijas un 100 µL MHB (1.solī jau pievienots), bet nepievieno antibiotiku.
8. Negatīvā kontrole (12. kontrole): 12. rindā pievieno 200 µL, ko izdara jau 1.solī. Nepievieno antibiotiku un baktērijas. Plati inkubē $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-20 stundas.

Tabula 6.1.2.1. Mikroplates sagatavošanas plāns.

Kolonna	Antibiotikas koncentrācija pirms inokulāta pievienošanas (mg/L)	Antibiotikas koncentrācija pēc inokulāta pievienošanas (mg/L)
1.	1024 mg/L	512 mg/L
2.	512 mg/L	256 mg/L
3.	256 mg/L	128 mg/L
4.	128 mg/L	64 mg/L
5.	64 mg/L	32 mg/L
6.	32 mg/L	16 mg/L
7.	16 mg/L	8 mg/L
8.	8 mg/L	4 mg/L
9.	4 mg/L	2 mg/L
10.	2 mg/L	1 mg/L
11.	Pozitīva kontrole	Pozitīva kontrole
12.	Negatīva kontrole	Negatīva kontrole

6.3.4. MIC rezultātu interpretācija

1. MIC ir zemākā koncentrācija, kurā nenovēro redzamu baktēriju augšanu.
2. Negatīvā kontrolei jāpaliek sterilai, bez augšanas.
3. Pozitīvajā kontrolē novēro normālu baktēriju augšanu.

6.4. Spotu tests (Spot test) bakteriofāga aktivitātes noteikšanai

Bakteriofāgi tika ņemti no Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras biobankas, kur tie ir izdalīti no vides paraugiem vai cilvēka baktēriju parauga.

Mērķis: noteikt bakteriofāga lītisko aktivitāti pret baktērijas celmu.

Materiāli un reaģenti:

1. Svaigi audzēta baktēriju kultūra.
2. TSA plates (Oxoid, United Kingdom), Sterils NaCl 0,9% šķīdums.
3. Izvēlēto fāgu šķīdumi - Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras biobanka, Latvija.
4. Sterilas stikla mēģenes 15mL, 50 µL, 300 µL un 5000 µL pipetes (Sartorius AG, Vācija; Eppendorf SE, Vācija) un sterili uzgaļi, mikrobioloģijas cilpas 1µL, sterili ependorfi 1,5mL, sterilas 15mL mēģenes (Sarstedt AG & Co. KG, Vācija).
5. Vortex maisītājs (Biosan, Latvija). Inkubators/termostats (Infors HT Ecotron, Šveice)
6. Sterila darba vide – dezinfekcijas šķīdums, spirta lampiņa.

Darba gaita:

1. Baktēriju sagatavošana:

- a. Iegūst *Klebsiella pneumoniae* baktēriju kolonijas: izvēlas 2-3 labi izolētas kolonijas no svaigas kultūras (audzēts 18-24h uz TSA).
- b. Sagatavo 0,5 McFarland standarta suspensiju ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL) – ņemtās 2-3 kolonijas pievieno 3-5 mL TSB, samaisa 15mL mēģenē.
- c. Ja nepieciešami McFarland pielāgojumi, var pievienot vairāk šķīdinātāja vai, ja duļķainība ir pārāk maza, pievieno vairāk kolonijas.
- d. Kad inokulāts ir sagatavots, to inkubē 4h 35 °C ar kratīšanu (150 rpm). Lai iegūtu logaritmiskās fāzes kultūru.

2. Pēc 4h inkubācijas, ņem 100 μL no baktēriju šķīduma un pievieno 5-7 mL silta TSA (apmēram 45 °C), viegli apmaisa un ātri, bet uzmanīgi izlej uz petri plates ar TSA.
3. Izklāj vienmērīgi vecot riņķveida kustības un ļauj sacietēt ~ 15-20 min. istabas temperatūrā.
4. **Fāgu aplikācija – spotu tests:**
 - a. Izvēlas fāgus, kurus grib pārbaudīt.
 - b. Vienā platē var uzklāt vairākus fāgu pilienus, sadalot plati un nesavienojot pilienus.
 - c. Uznes 10 μL fāgu suspensijas uz plates. Katram fāgam liek 2 pilienus.
 - d. Ļauj pilieniem nožūt ~ 10-15 min.
5. **Inkubācija:**
 - a. Inkubē plates apgrieztā stāvoklī – ar vāciņu uz leju, 16–18h 35–37 °C.

6.4.1. Spotu testa rezultātu interpretācija

1. Skaidras līzes zonas norāda uz fāga spēju lizēt konkrēto baktēriju celmu.
2. Daļēji lizētas (blāvas) zonas var liecināt par daļēju jutību vai vāju fāga aktivitāti.
3. Nav līzes – fāgs nav aktīvs, lai lizētu konkrēto baktēriju celmu.

6.5. Bakteriofāga titra noteikšana

Mērķis: noteikt bakteriofāga titru, lai uzzinātu cik daudz fāgs ir vajadzīgs, lai lizētu noteiktu baktēriju daudzumu.

Materiāli un reaģenti:

1. Bakteriofāga paraugs – Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras biobanka, Latvija.
2. Svaigi audzēta baktēriju kultūra.
3. Barotnes – TSA (Oxoid, United Kingdom) cietā barotne petri platēm, to tur ~45 °C temperatūrā (ūdens peldē vai termostatā), lai tas būtu šķidr, TSB (Oxoid, United Kingdom) – logaritmiskās fāzes kultūras iegūšanai, 0,9% NaCl šķīdums, TSA plates (Oxoid, United Kingdom).
4. Sterilas stikla mēģenes 15mL, 50 μL , 300 μL un 5000 μL pipetes (Sartorius AG, Vācija; Eppendorf SE, Vācija) un sterili uzgaļi, mikrobioloģijas cilpas 1 μL , sterili ependorfi 1,5mL, sterilas 15mL mēģenes (Sarstedt AG & Co. KG, Vācija).

5. Vortex maisītājs (Biosan, Latvija). Inkubators/termostats (Infors HT Ecotron, Šveice).
6. Sterila darba vide – dezinfekcijas šķīdums, spirta lampiņa.

Darba gaita:

1. Baktēriju sagatavošana:

- a. Iegūst *Klebsiella pneumoniae* baktēriju kolonijas: izvēlas 2-3 labi izolētas kolonijas no svaigas kultūras (audzēts 18-24h uz TSA).
- b. Sagatavo 0,5 McFarland standarta suspensiju ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/mL) – ņemtās 2-3 kolonijas pievieno 3-5 mL TSB, samaisa 15mL mēģenē.
- c. Ja nepieciešami McFarland pielāgojumi, var pievienot vairāk šķīdinātāja vai, ja duļķainība ir pārāk maza, pievieno vairāk kolonijas.
- d. Kad inokulāts ir sagatavots, to inkubē 4h 35 °C ar kratīšanu (150 rpm). Lai iegūtu logaritmiskās fāzes kultūru.

2. Paralēli, TSA agars tiek uzglabāts šķidrā stāvoklī ūdens vannā.

3. Fāgu atšķaidījumu sagatavošana

- a. Kamēr baktērijas inkubējas, sagatavo fāgu atšķaidījumus.
- b. Marķē endorfas: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}
- c. Katrā endorfā pievieno 900 μ L 0,9% NaCl.
- d. Ņem 100 μ L F_x (nezināmās koncentrācijas fāga šķīdums) un iepilda 1. endorfā (10^{-1}) $\rightarrow$ vorteksē $\rightarrow$ 100 μ L no 1.endorfā (10^{-1}) pievieno 2.endorfam (10^{-2}) $\rightarrow$ vorteksē $\rightarrow$ tā turpina līdz 9.endorfam (10^{-9}).

4. Baktērijas/fāga suspensijas sagatavošana

- a. Izmanto 15mL sterilas mēģenes. Šajā mēģenē tiks izveidots bakteriofāga un baktērijas maisījums. Katram atšķaidījumam veic 3 paralēlus testus. Marķē mēģenes – atšķaidījuma pakāpe, fāga un baktērijas nosaukums.
- b. Marķē petri plates - atšķaidījuma pakāpe, fāga un baktērijas nosaukums, datums.
- c. Ņem 15mL mēģeni, pievieno 100 μ L bakteriofāga no attiecīgās dilūcijas (10^{-1} - 10^{-9}).
- d. Pievieno 100 μ L baktēriju no TSB šķīduma – inokulāta.
- e. Maigi samaisa, lai fāgs vienmērīgi sajauktos ar baktērijām.
- f. Pievieno 4-5mL silta, šķidra TSA, kas turēts ~ 45 °C ūdens vannā.
- g. Ātri, bet maigi apmaisa mēģenes saturu ripinot plaukstās, bet tā, lai neveidotos burbuļi.
- h. Uzreiz pēc sajaukšanas izlej visu mēģenes saturu uz petri plates.

- i. Vienmērīgi riņķojot petri plati uz galda nodrošina vienmērīgu izklājumu.
- j. Nepieciešama operatīva darbība, jo TSA agars ātri sacietēs.
- k. Nolietās plates atstāj 10-15 minūtes istabas temperatūrā, lai virskārta pilnībā sacietētu un nožūtu.
- l. Petri plates apgriež ar vāciņu uz leju un ievieto inkubatorā 16-18h 35–37 °C temperatūrā.

6.5.1. Bakteriofāga titra noteikšanas rezultātu interpretācija

Plašu inspekcija pēc inkubācijas:

1. Izņem plates no inkubatora, vizuāli pārbauda vai ir veidojušies plaki.
2. Katrā plāksnē, kur novēro caurspīdīgas līzes zonas, tur fāgs ir lizējis baktērijas.
3. Atšķaidītākās suspensijās plaku skaitam būtu jābūt mazākam, vai to vispār nav.
4. Neatšķaidītākās suspensijās, ja ir aktivitāte, novēro fāgu lizēšanu.

Plaku skaitīšana

1. Izklāj plates hronoloģiskā secībā no 10^{-1} - 10^{-9} .
2. Izvēlas plates uz kurām skaidri var saskaitīt plakus un tie nepārklājas.
3. Izvēlas tās plates, kur redzami 20-200 plakus veidojošās vienības jeb 20-200 PFU.
4. Ja plaki ir daudz (>200), šādu plati neņem titra aprēķinam – nepieciešams lielāks atšķaidījums. Ja plaki ir maz (<20) vai nav vispār, izmanto to plati, kura it ar mazāko saskaitāmo plaku skaitu, bet ne pārāk mazu skaitu.

Titra aprēķināšana

1. Lai aprēķinātu bakteriofāga titru, izmanto šādu formulu:

$$F_x = \frac{N}{D \cdot V}$$

kur:

F_x – bakteriofāga titrs (PFU/mL)

N – saskaitītais plaku skaits

D – atšķaidījuma pakāpe decimālajā formā (piem. 10^{-6})

V – uz plates uzliktais parauga tilpums (mL)

6.6. Bakteriofāga un antibiotikas mijiedarbības noteikšana

Mērķis: novērot bakteriofāga un antibiotikas mijiedarbību pret baktēriju izmantojot Checkboard assay metodi – režģveida atšķaidījuma tests. [36]

Materiāli un reaģenti:

1. Svaigi audzēta baktēriju kultūra
2. Furasol (šķīstošais furagīns): katra pulvera paciņa satur 100 mg šķīstošā furagīna, kas atbilst 87,4 g tīra furagīna. (Olainfarm, Latvija)
3. Fāgu šķīdums - Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras biobanka, Latvija.
4. Mueller-Hinton buljons (MHB) nefastidioziem mikrooragnismiem (Biomaxima, Poland), 0,9% NaCl šķīdums.
5. 96-bedrīšu mikroplates (Thermo Scintific, Amerikas Savienotās Valstis), sterilas stikla mēģenes 15mL, 50 μ L, 300 μ L un 5000 μ L pipetes (Sartorius AG, Vācija; Eppendorf SE, Vācija) un sterili uzgaļi, mikrobioloģijas cilpas 1 μ L (Sarstedt AG & Co. KG, Vācija).
6. Analītiskie svāri, ūdens vanna ar regulējamu temperatūru, Vortex maisītājs (Biosan, Latvija). Inkubators/termostats (Infors HT Ecotron, Šveice); VarioskanLUX (Thermo Scintific, Amerikas Savienotās Valstis) optiskā blīvuma (OD – optical denisty) mērījumiem.
7. Sterila darba vide – dezinfekcijas šķīdums, spirta lampiņa.

Darba gaita:

1. Pagatavo baktēriju inokulātu, skatīt sadaļu 6.1.2. Izpilda visus soļus.
2. Sagatavo antibiotikas šķīdumu ar nepieciešamo koncentrāciju.
3. Sagatavo fāga šķīdumu atbilstoši baktēriju koncentrācijai un izvēlētajam MOI (vidējais fāgu skaits uz vienu baktēriju), kur $MOI < 1$ - fāgi mazāk nekā baktērijas; $MOI = 1$ – vidēji viens fāgs uz 1 baktēriju; $MOI > 1$ - fāgi vairāk nekā baktērijas.

6.6.1. Mikroplates sagatavošana priekš checkerboard assay – režģveida atšķaidījuma testa

Mikroplates sagatavošanas darba gaita:

1. Vispirms 2.-12. kolonnā pievieno MHB 100 μ L.
2. Pirmajā kolonnā iepilda 100 μ L nepieciešamo antibiotikas sagatavoto šķīdumu.
3. No 1. kolonnas ņem 50 μ L un pipetē otrajā kolonnā, samaisot ar to pašu pipeti.
4. Turpina atšķaidīšanu līdz 10. kolonnai izmantojot tos pašus uzgaļus.
5. No pēdējās akas 50 μ L izlej, lai saglabātu bedrītēs vienādu daudzumu jeb 50 μ L, antibiotika tiek atšķaidīta uz pusi.
6. Sagatavo fāgu šķīdumu ar nepieciešamo koncentrāciju. Koncentrāciju izvēlas pēc fāgu titra noteikšanas.
7. Sagatavo nepieciešamo fāga koncentrāciju atsevišķi ependorfā un veido sekojošus dubultatšķaidījumus rindām A - G (septiņi dubultatšķaidījumi). Kopā 7 ependorfi.
8. Sagatavotos fāga šķīdumu pievieno A - G rindā, kur A ir vislielākā koncentrācija, un G – vismazākā koncentrācija. Pievienojamais daudzums - 50 μ L. Katram atšķaidījumam maina pipetes uzgaļus. Antibiotika atkal atšķaidās uz pusi un, par cik bedrītē ir 50 μ L fāga, arī fāgs atšķaidās uz pusi.
9. Pēc tam, 1. – 11. kolonnā, izņemot H11 un 12.kolonnu, pievieno 100 μ L iepriekš sagatavoto baktēriju suspensijas – antibiotika un fāgs atšķaidās vēl 2x (kopā 4x).
10. Platē kolonnā A11 – G11 veidojas tikai fāga dubultatšķaidījumi, kur baktērija ir 100 μ L un fāgs - 100 μ L.
11. Platē H1-H10 rindā veidojas MIC furasolam bez fāga. Attiecīgi - 100 μ L antibiotika un 100 μ L baktērija. Jāiegaumē, ka 100 μ L antibiotikai nepieciešama 2x mazāka koncentrācija nekā bedrītēs, kurās pievieno 50 μ L.
12. Bedrīte H11 paliek tukša.
13. Pozitīva kontrole: bedrītēs A12 un B12 – pievieno tikai baktēriju bez antibiotikas, fāga.
14. Baktērija + antibiotika: C12 un D12 – pievieno tikai baktēriju un antibiotiku, bez fāga.
15. Baktērija + fāgs: E12 un F12 – pievieno tikai baktēriju un fāgu, bez antibiotikas.
16. Negatīva kontrole: bedrītēs G12 un H12 - tikai barotne bez baktērijām, antibiotikas, fāga.
17. Inkubē 35°C $\pm$ 1°C, 16-20 stundas.

6.6.2. Rezultātu interpretācija priekš checkerboard assay

1. **Kontroles:** uzrāda baktēriju augšanas koeficientus. Augsts OD (optiskais blīvums) – aug, zems OD, neaug. Negatīvā kontrolē augšanai nav jābūt, pozitīvā kontrolē novēro normālu baktēriju augšanu.
2. **Bedrīšu kombinācijas:** pievērš uzmanību bedrītēm ar zemāko OD vērtību, kas tiecas negatīvās kontroles OD virzienā.
3. **FIC un FICI aprēķini:**
 - a. gan baktērijai, gan fāgam aprēķina FIC (frakcionālo inhibējošo koncentrāciju), salīdzinot kombinācijas devu ar fāgs+baktērija vai antibiotika+baktērija devu atsevišķi.
 - b. FICI (FIC indekss - frakcionalās inhibējošās koncentrācijas indekss) – aprēķina pēc sekojošas formulas:

$$\text{FICI} = \text{FIC}_{\text{antibiotika}} + \text{FIC}_{\text{fāgs}}$$

kur:

$$\text{FIC}_{\text{antibiotika}} = \frac{\text{antibiotikas koncentrācija kombinācijā}}{\text{antibiotikas MIC bez fāga}}$$

$$\text{FIC}_{\text{fāgs}} = \frac{\text{fāga deva kombinācijā}}{\text{fāga efektīvā deva bez antibiotikas}}$$

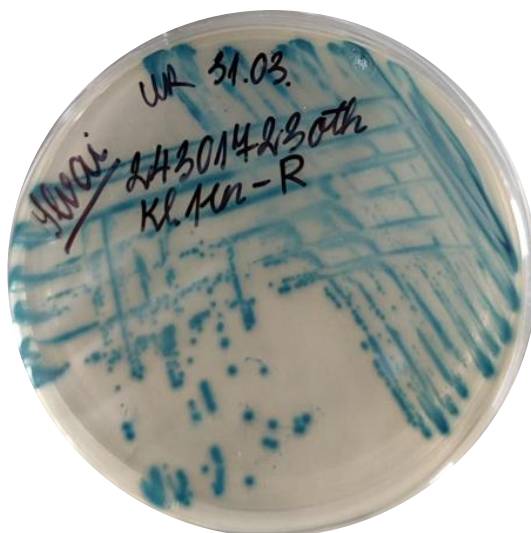
4. Secinājumi:

- a. Ja bedrītē ar noteiktām kombinācijām rāda augstu OD, tad kombinācija nav pietiekami efektīva, jāpalielina antibiotikas vai MOI koncentrācija.
- b. Ja FICI ir ≤ 0.5 , tas liecina par sinerģiju – kombinācijā ir nepieciešams daudz mazāks devu daudzums, lai inhibētu augšanu, nekā kad katrs aģents tiek lietots atsevišķi.
- c. Ja FICI ir robežās: $0.5 < \text{FICI} \leq 1$, additīvs efekts – kombinācija sniedz efektu bez īpašas sinerģijas un tas ir tuvu fāga un antibiotikas efektivitātei atsevišķi.
- d. Ja FICI ir robežās: $1 < \text{FICI} \leq 4$, neitrāla mijiedarbība, kombinācija nerada būtisku devu samazinājumu salīdzinot fāgu un antibiotiku atsevišķi.
- e. Ja FICI ir > 4 : tas liecina par antagonismu, traucēta fāgu vai antibiotikas darbība kombinācijā.

7. REZULTĀTI

7.1. Baktēriju atlase

Tika nejauši atlasīti septiņi *Klebsiella pneumoniae* celmi – M3(N2);24301723oth; F3-1-1; 9232B; M13; M16; M18. Mērķis - noteikt šo paraugu jutību pret nitrofurāniem, kā arī, pārliecināties, ka baktērijas ir dzīvotspējīgas.



7.1.1.att. Izsēts *K.pneumoniae* celms.

7.2. Antibakteriālās jutības noteikšana ar VITEK 2 Systems iekārtu

Izvēlētajiem *K.pneumoniae* celmiem tika veikts antimikrobās jutības tests, rezultāti apkopoti 7.2.1.tab. Šie rezultāti sniegs ieskatu vai furagīna MIC līmenis būs līdzīgs citiem nitrofurāniem.

Tabula 7.2.1. Vitek nitrofurantoīna MIC rezultāti.

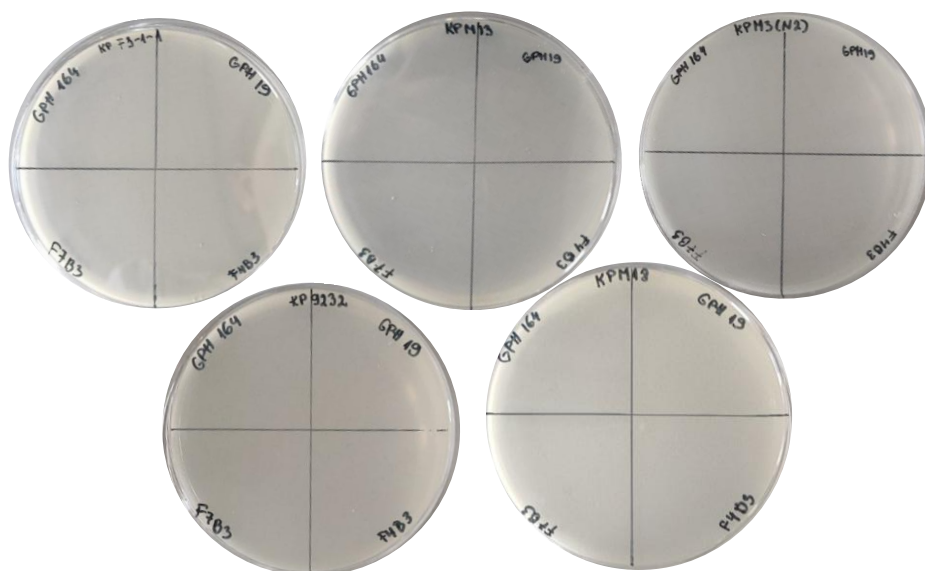
Parauga n.p.k.	<i>K.pneumoniae</i> celms	Nitrofurantoīna MIC (mg/L)
1.	M3(N2)	128 R (rezistents)
2.	24301723oth	>=512 R (rezistents)

3.	F3-1-1	64 S (jutīgs)
4.	9232B	256 R (rezistents)
5.	M13	128 R (rezistents)
6.	M16	128 R (rezistents)
7.	M18	64 S (jutīgs)

Vitek 2 pilnais rezultātu pārskats baktēriju kultūrai M16 un 24301732oth apskatāms pielikumā Pielikums 1 un Pielikums 2.

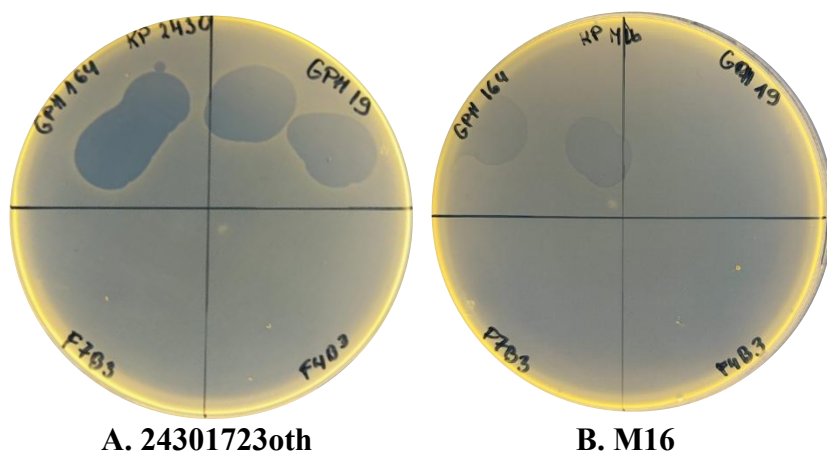
7.3. Spotu tests (Spot test) bakteriofāga aktivitātes noteikšanai

Lai sapratu, kuri fāgi spēs mijiedarboties ar izvēlētajām baktēriju kultūram, tika veikts spot (spotu) tests. Spotu testam pēc nejaušības principa tika izvēlēti 4 bakteriofāgi – F7B3; F4B3; GPH164 un GPH19. Izmeklējuma mērķis ir iegūt vismaz vienu baktērijas-fāga jutīgu kombināciju. Plates tika sadalītas 4 daļās, lai uz vienas plates varētu apskatīt 4 dažādus fāgus, skatīt piemēru att. 7.3.1.



7.3.1.att. Spotu testam sagatavotās plates.

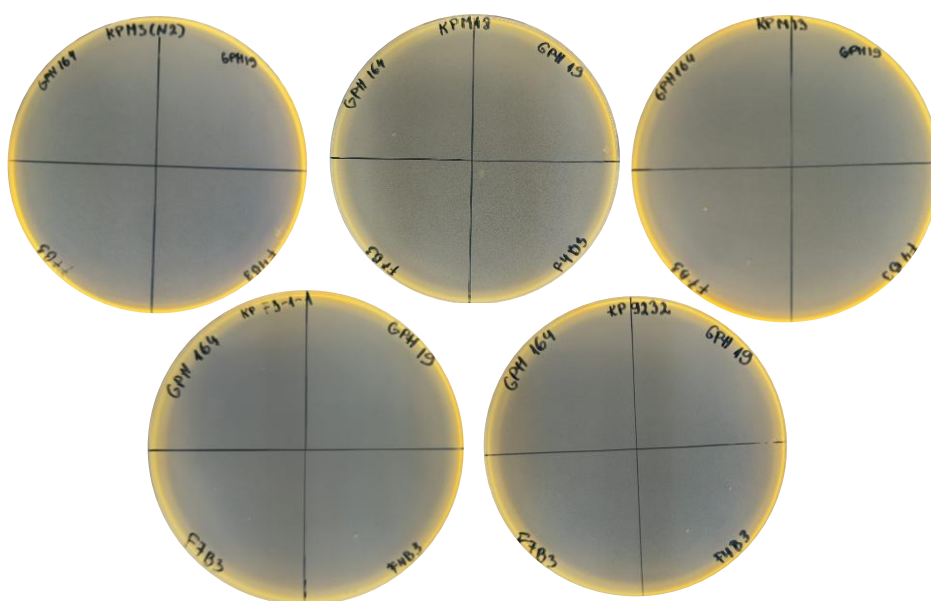
No visām platēm, divās platēs tika novērotas fāga līzes zonas jeb spoti, skatīt att. 7.3.2. Jutīgie *K.pneumoniae* celmi – M16 un 24301723oth, turpmākajos testos tiks izmantotas šie baktēriju celmi.



7.3.2.att. Bakteriofāgi veido līzes zonas jeb spotus.

Pēc 7.3.2.att. novēro, ka baktēriju kultūra 24301723oth ir jutīga pret GPH164 un GPH19 fāgu un baktēriju kultūra M16 ir jutīga pret GPH164 fāgu. Kultūrai M16 novēro blāvas līzes zonas, kas var liecināt par daļēju jutību vai vāju fāga aktivitāti.

Pārējās baktēriju kultūrās līzes sonas jeb spotus nenovēro, sk. att. 7.3.3.



7.3.3.att. Plates, kurās nenovēro bakteriofāga – baktērijas mijiedarbību.

7.4. MIC noteikšana *Klebsiella pneumoniae* Furasolā pēc EUCAST standartiem

Lai noteiktu MIC furagīnam, vispirms tika sagatavots svaigs furagīna šķīdums. Furasola pulvera svēršanai tika izmantoti analītiskie svāri. Vēlamo furagīna koncentrāciju, iegūstam sverot vielu uz analītiskajiem svāriem, kuros uzrāda 3 ciparus aiz komata. Aprēķini tik veikti pēc formulas sekojoši:

$$W = \frac{C \cdot V}{P} = \frac{1024 \times 0.05}{0,874} = \frac{51,2}{0,874} \approx 58,6 \text{ mg jeb } 0,0586 \text{ g}$$

kur:

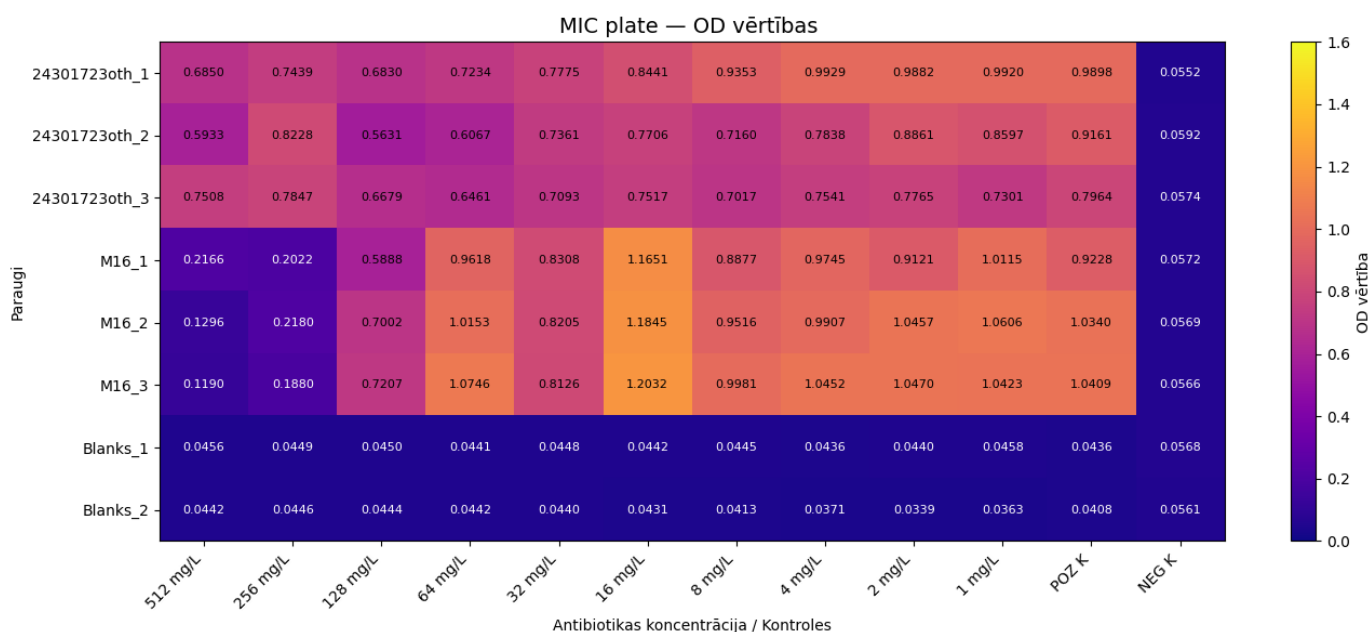
C = 1024 mg/L;

V = 50 mL = 0.05 L;

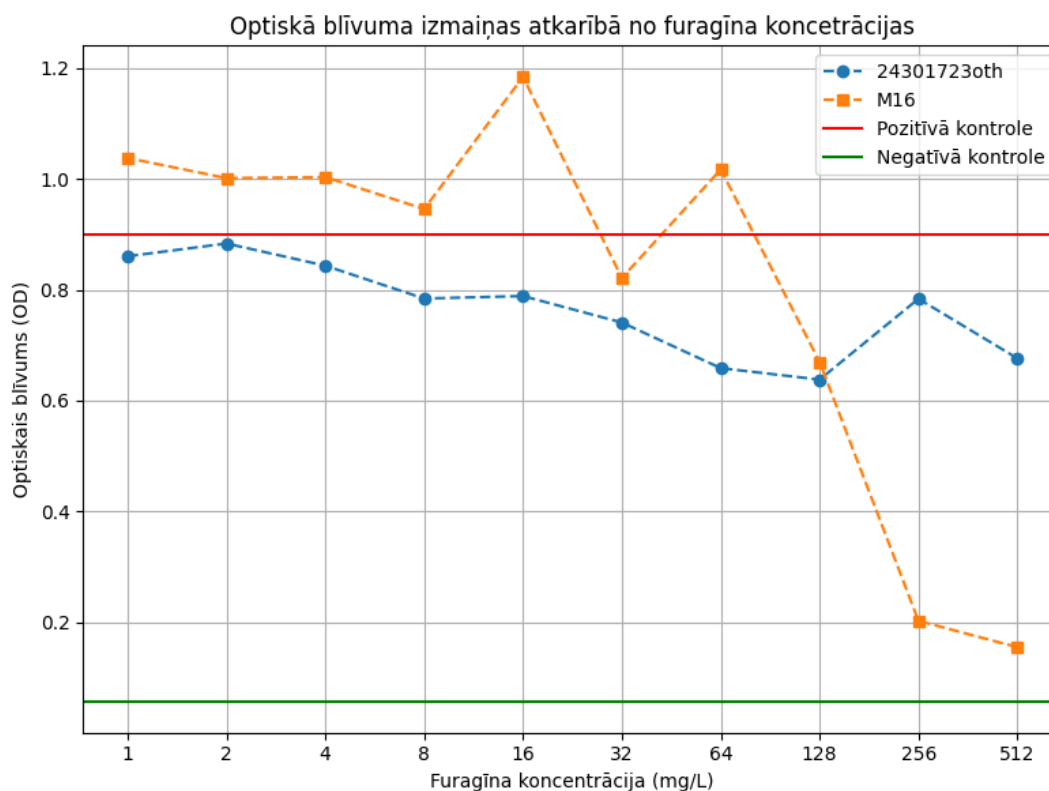
P = 0.874 (100 mg pulvera satur 87.4 mg tīra furagīna).

Rezultātā, lai iegūtu lielāku precizitāti, šķīdumu pagatavojam 100 mL un uz analītiskajiem svāriem sveram 0,117(2) g vielas.

Pēc EUCAST standartiem (Version 5), nosakām MIC sekojošos paraugos: 24301723oth un M16. [35] Vizuāli novērtējot plati, var redzēt, ka baktērijas celms 24301723oth ir rezistents pret furagīnu koncentrācijā 512mg/L un celms M16 MIC ir 256 mg/L. Precīzāka rezultāta noteikšanai, tika mērītas OD (optiskā blīvuma) vērtības, sk. att.7.4.2.



7.4.1.att. *K.pneumoniae* un furagīna MIC vērtības.

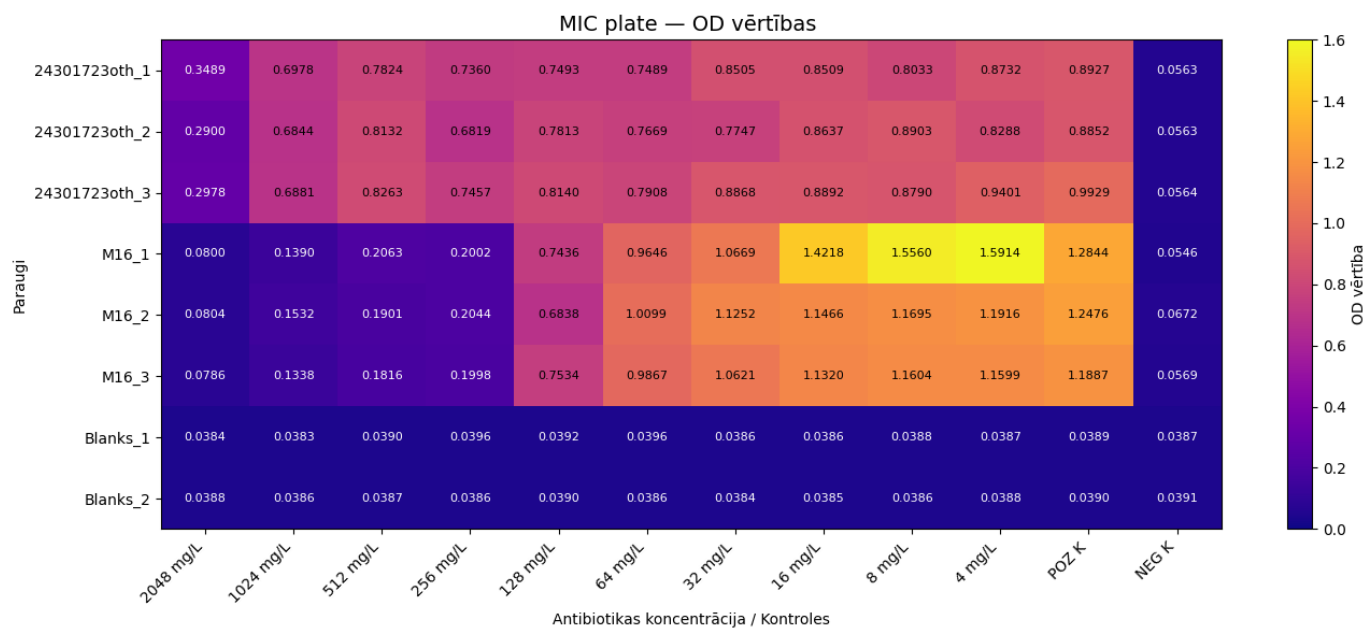


7.4.2.att. Optiskā blīvuma izmaiņas atkarībā no furagīna koncentrācijas.

Pēc optiskā blīvuma (OD) mērījumiem, izriet šādi secinājumi:

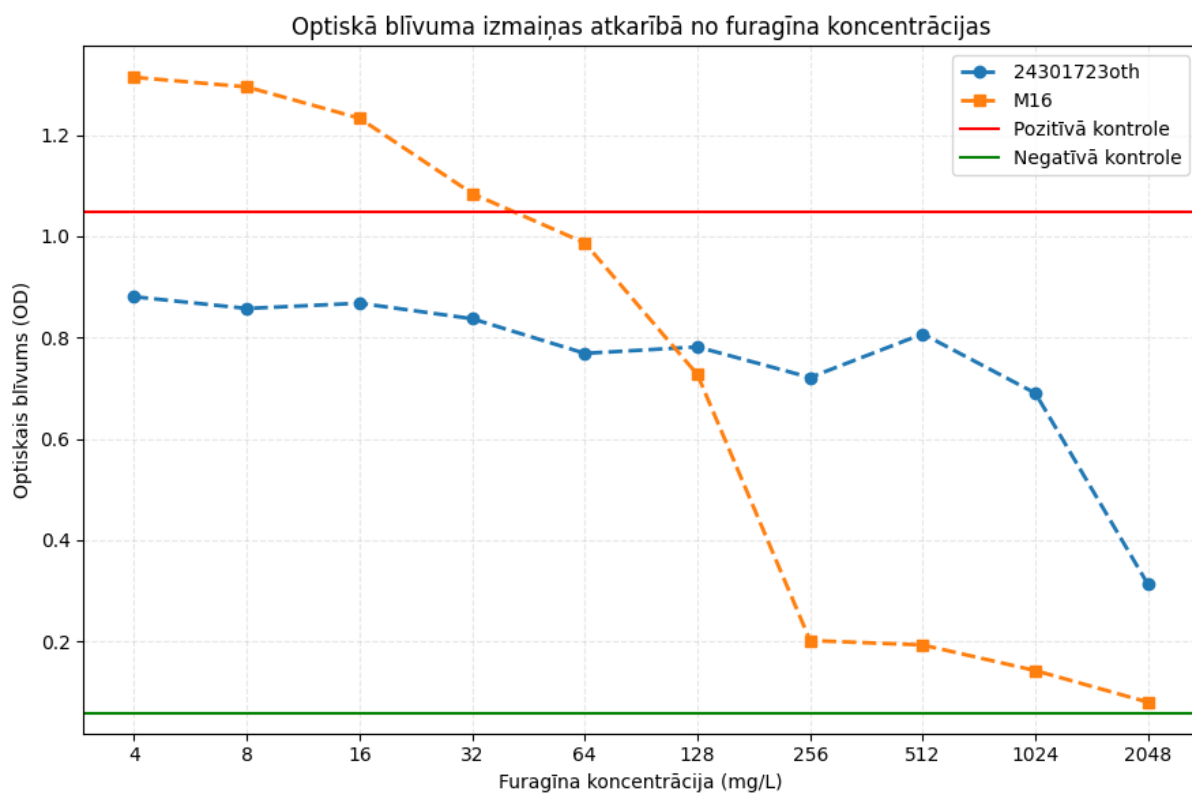
1. Ja OD vērtība ir tuvu negatīvās kontroles līmenim, var secināt, ka augšana tiek inhibēta.
2. Pozitīvā kontrole – bez antibiotikas: OD = 0,90 – 1.0.
3. Negatīvā kontrole – bez baktērijas: OD = 0.056 - 0.057.
4. Izolātam 24301723oth OD vērtības visos punktos ir augstas (no 0,64-0,88) salīdzinot ar negatīvo un pozitīvo kontroli, kas liecina, ka šim izolātam antibiotikas koncentrācija 512mg/L nav pietiekoša inhibīcijai. MIC nav sasniegta, MIC =>512 mg/L.
5. Izolātam M16 OD pie 512mg/l un 256 mg/L ir ievērojami zemi (0,1551 un 0,2027), bet pie 128 mg/L strauji palielinās līdz OD = 0,67. Var uzskatīt, ka MIC = 256mg/L.
6. Salīdzinot VITEK rezultātus ar manuālajiem OD mērījumiem apstiprina to, ka abās testu sistēmās izolāts 24301723oth ir rezistents jeb MIC=>512mg/L un izolāts M16 MIC = 256mg/L. Tātad, gan nitrofurantoīnam, gan furagīnam ir vienādas MIC vērtības.
7. Tabulu ar visiem OD mērījumiem var skatīt pielikumā Pielikums Nr.3.

Lai aprēķinātu FICI – frakcionālās inhibējošās koncentrācijas indeksu, bija nepieciešams noteikt kultūras 24301723oth MIC vērtību, palielinot furagīna koncentrāciju. Lai gan cilvēka serumā šāda antibiotikas koncentrācija nav sasniedzama, šī robeža nepieciešama FICI aprēķiniem, sk. att.7.4.3.



7.4.3.att. K.pneumoniae un furagīna MIC vērtības.

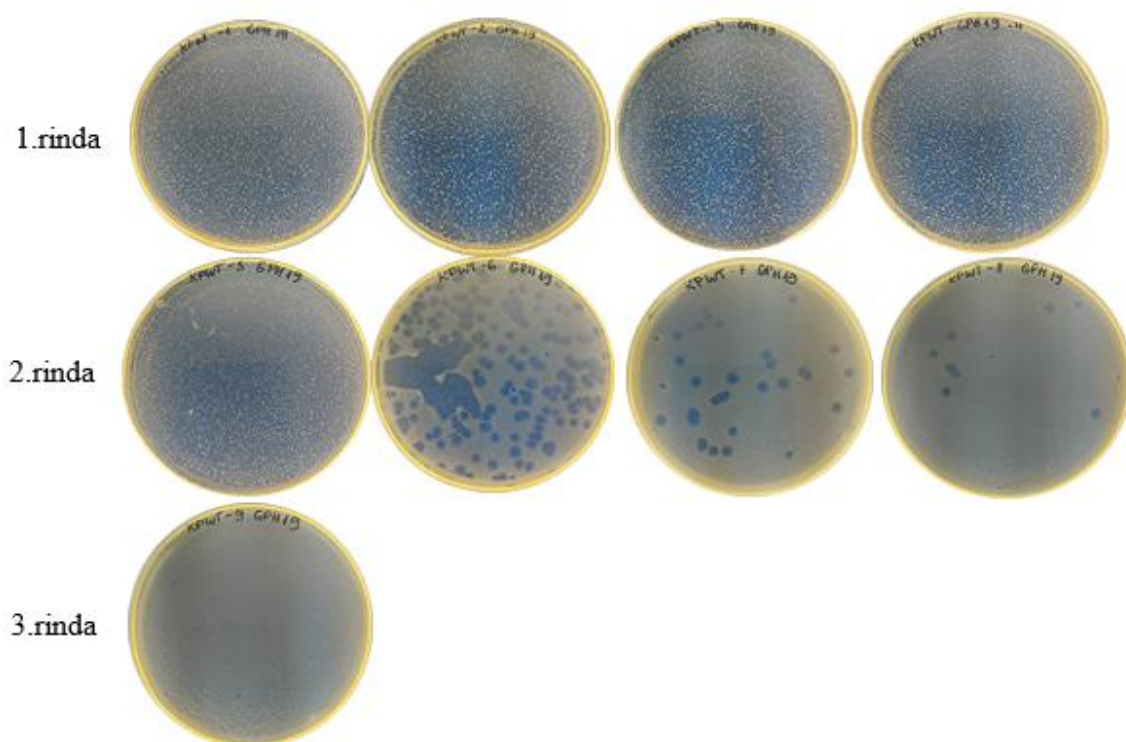
Pēc optiskā blīvuma (OD) mērījumiem novēro, ka baktēriju kultūras M16 MIC neizmainās, bet kultūrai 24301723oth pie koncentrācijas 2048mg/L tiek sasniegts ievērojama baktēriju augšanas inhibīcija. Optiskā blīvuma OD mērījumi pieejami Pielikums Nr.3.



7.4.4.att. Optiskā blīvuma izmaiņas atkarībā no furagīna koncentrācijas

7.5. Bakteriofāga titra noteikšana

Tiek noteikts bakteriofāgiem GPH19 un GPH164 titrs uz baktērijas 24301723oth, lai saprastu kāda ir fāgu suspensijas koncentrācija. Pēc plašu inkubācijas novērojam baktērijas 24301723oth un fāga GPH19 aktivitāti, sk. att. 7.5.1. Attēlā var skaidri redzēt, ka, jo koncentrētāka fāga suspensija, jo vairāk līzes zonas var redzēt. Paraugā 10^{-1} praktiski visas baktērijas ir lizētas, kamēr paraugā 10^{-9} spotus nenovēro.



7.5.1.att. Bakteriofāga atšķaidījuma vizuālie rezultāti. 1.rinda no kreisās puses - $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$; otrā rinda no kreisās puses - $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$; trešā rinda no kreisās puses: 10^{-9} .

Aprēķinam, izvēlas tās plates, kur redzami 20-200 plakus veidojošās vienības jeb 20-200 PFU. Atšķaidījumā 10^{-6} vidējais plaku skaits pārsniedz 200, tātad, plaku skaits ir pārāk liels aprēķiniem. Atšķaidījums 10^{-7} vidējais plaku skaits ir 30, kas ietilpst ieteicamajā plaku diapazonā un atšķaidījumā 10^{-8} – vidējā vērtība ir 6, kas ir mazāk nekā ieteicamā robeža, skatīt 7.5.1.tab. Titra aprēķins tiks veikts izmantojot 10^{-7} pakāpi.

Tabula 7.5.1. Plaku skaits dažādās atšķaidījuma pakāpēs, bakteriofāgs GPH19.

GPH19 Atšķaidījuma pakāpe	Plaku skaits 1	Plaku skaits 2	Plaku skaits 3	Vidējais plaku skaits
$10^{-1} - 10^{-5}$	-	-	-	-
10^{-6}	271	250	240	254
10^{-7}	30	33	28	30
10^{-8}	8	5	7	6
10^{-9}	-	-	-	-

GPH19 fāga titra aprēķinu veic pēc sekojošas formulas:

$$F_x = \frac{N}{D \cdot V} = \frac{30}{10^{-7} \times 0,1} = 3,0 \times 10^9 \text{ PFU/mL}$$

kur:

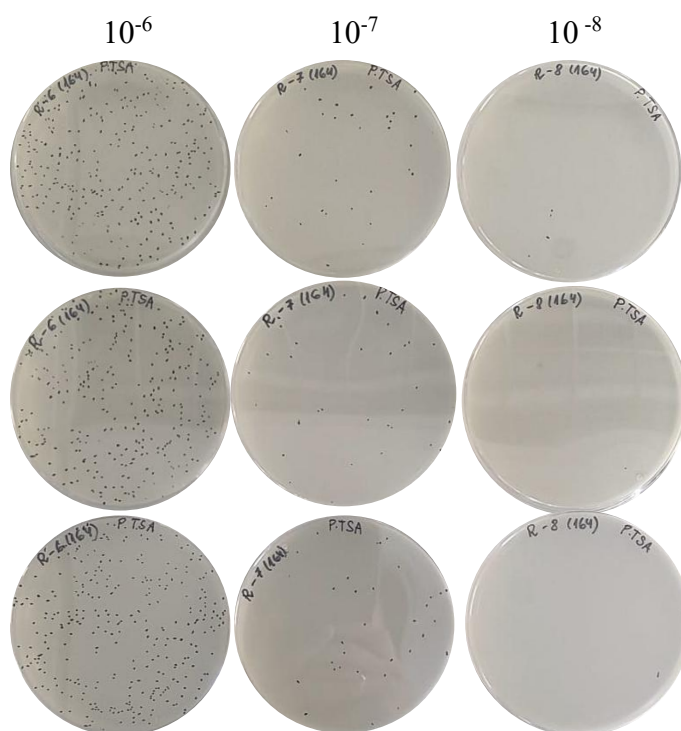
F_x – bakteriofāga titrs (PFU/mL);

N – saskaitītais plaku skaits;

D – atšķaidījuma pakāpe decimālajā formā (piem. 10^{-7});

V – uz plates uzliktais parauga tilpums - 100 μ L (mL).

Tiek noteikts bakteriofāga GPH164 titrs baktērijai 24301732oth. Vizuāli novēro, ka līzes zonas diametrā ir mazākas. Skaitot līzes zonas jeb plakus – tie tika atzīmēti ar marķieri, lai vieglāk būtu saskaitīt, sk.att. 7.5.2.



Att. 7.5.2. Bakteriofāga GPH164 un *Klebsiella pneumoniae* 24301732oth titra līzes zonu (plaku) skaitīšanas process. Kolonnās norādītas atšķaidījuma pakāpes: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

Tiek saskaitīts plaku skaits un aprēķināts bakteriofāga GPH164 titrs.

Tabula 7.5.2. Plaku skaits dažādās atšķaidījuma pakāpēs, bakteriofāgs GPH164.

GPH164 Atšķaidījuma pakāpe	Plaku skaits 1	Plaku skaits 2	Plaku skaits 3	Vidējais plaku skaits
$10^{-1} - 10^{-5}$	-	-	-	-
10^{-6}	313	293	313	306
10^{-7}	29	32	34	32
10^{-8}	4	1	1	3
10^{-9}	-	-	-	-

GPH164 fāga titra aprēķinu veic pēc sekojošas formulas:

$$F_x = \frac{N}{D \cdot V} = \frac{32}{10^{-7} \times 0,1} = 3,2 \times 10^9 \text{ PFU/mL}$$

kur:

F_x – bakteriofāga titrs (PFU/mL);

N – saskaitītais plaku skaits;

D – atšķaidījuma pakāpe decimālajā formā (piem. 10^{-7});

V – uz plates uzliktais parauga tilpums - 100 μ L (mL).

Titrs tika veikts arī baktēriju kultūrai M16 ar bakteriofāgu GPH164, bet, par cik spotu testā tika novērota blāva līzes zona, titra platēs līzes zonas netika novērotas. Turpmākie testi tiek veikti izmantojot baktēriju kultūru 24301732oth un bakteriofāgus GPH19 un GPH 164.

7.6. Bakteriofāga un antibiotikas mijiedarbības noteikšana

Zinot baktērijas 24301723oth MIC vērtību attiecībā pret furagīnu, un sekojoši, arī bakteriofāgu GPH19 un GPH164 titru, tiks apskatīts kā notiek bakteriofāga mijiedarbība ar furagīnu un vai šī kombinācija palīdz inhibēt baktērijas augšanu. Tiks izmantota checkerboard assay - režģveida atšķaidījuma tests, kur platē tiks pārbaudītas dažādas vielu kombinācijas. [36]

Tika pagatavots 4096 mg/L darba šķīdums, kas nodrošina 1024 mg/L koncentrētākajā bedrītē dubultatšķaidījuma veikšanai. Lai iegūtu attiecīgo koncentrāciju, uz analītiskajiem svāriem iesvēra 0,469 g Furasola un šķīdināja 100 mL MHB. Baktēriju suspensiju sagatavo pēc tāda paša principa, kā MIC testam, kas atbilst EUCAST standartam. Fāga sagatavošanā mērķis ir nodrošināt $\text{MOI} = 1$, kur sākotnējā fāga koncentrācija bedrītē būtu tāda pati, kā baktēriju koncentrācija.

Frakcionālās inhibīcijas koncentrācijas indeksu (FICI) aprēķina tur, kur optiskais blīvums $\text{OD} < 0,10$. Pārējām OD vērtībām FICI netiek aprēķināts, jo uzskatāms, ka nav notikusi pilnīga baktērijas augšanas inhibīcija, skatīt 7.6.1. tab., 7.6.2.tab., 7.6.3.tab., 7.6.4.tab.

Tabula 7.6.1. Režģveida atšķaidījuma testa OD mērījumi un FICI klasifikācija, bakteriofāgs GPH19, *Klebsiella pneumoniae* 24301732oth, furagīns.

Režģveida atšķaidījumu tests, bakteriofāgs GPH19, baktērija - 24301723oth
OD vērtības ar FICI klasifikāciju

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(A) 5×10^5	0.0893	0.0695	0.0671	0.0685	0.0917	0.0760	0.0983	0.0889	0.0725	0.0866	0.0810	0.9808
(B) 2.5×10^5	0.0671	0.0722	0.0775	0.0713	0.0784	0.1067	0.0831	0.0829	0.0836	0.0775	0.0971	0.9705
(C) 1.25×10^5	0.0560	0.0808	0.0768	0.0832	0.1047	0.1387	0.1980	0.1936	0.1884	0.1684	0.2659	0.0439
(D) 6.25×10^4	0.0447	0.0854	0.0837	0.1529	0.1644	0.2779	0.2588	0.2996	0.2981	0.2949	0.2927	0.0442
(E) 3.125×10^4	0.0519	0.0908	0.0945	0.1150	0.2222	0.2383	0.2618	0.2168	0.2344	0.2069	0.3489	0.2016
(F) 1.5625×10^4	0.0685	0.0907	0.0995	0.1102	0.2133	0.2893	0.2792	0.3303	0.3644	0.4483	0.4552	0.1992
(G) 7.8125×10^3	0.1100	0.1149	0.1223	0.1164	0.2869	0.2831	0.2999	0.4397	0.4612	0.5536	0.5677	0.0443
(H) Antibiotika	0.7083	0.9132	0.9447	0.9022	0.9458	0.9969	0.9462	0.9840	1.0013	1.1958	0.0380	0.0419
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	Fāgs	Kontr.

Antibiotikas koncentrācija (1024 → 2 mg/L)

Svītrojumu skaidrojums:
 1. Diagonālās svītras (/) → FICI < 0.5 (Sinerģija)
 2. Vertikālās svītras (|) → $0.5 \leq \text{FICI} \leq 1.0$ (Additīvs / Indiference)

Optiskā blīvuma (OD) mērījumi baktēriju kultūrai *Klebsiella pneumoniae* 24301732oth ar bakteriofāgu GPH19, kombinācijā ar furagīnu, rezultāti:

1. Negatīvā kontrole (G12,H12): OD vērtības ļoti zemas (0,0443 un 0,0419), kas norāda, ka baktērijas buljonā neaug.
2. Pozitīvā kontrole (A12,B12): OD vērtības 0,97 - 0,98, kas norāda uz pilnīgu baktēriju augšanu.
3. Baktērija + antibiotika kontrole (E12,F12): šajās bedrītēs bija izvēlēta paaugstināta antibiotikas koncentrācija – 2048 mg/L, lai būtu iespējams aprēķināt FIC un FICI.
4. Baktērija + bakteriofāgs kontrole (C12, D12): OD vērtības zemas (0,0439 un 0,0442), kas norāda, ka baktērijas kombinācijā ar bakteriofāgu nav augušas.
5. Tāpat kā MIC testā, arī šeit H rindā novēro baktērijas rezistenci pret furagīnu pie 1024 mg/L.

FIC (frakcionālā inhibīcijas koncentrācija) un FICI (frakcionālās inhibīcijas koncentrācijas indekss) aprēķināšana:

Frakcionālās inhibīcijas koncentrācijas indeksu aprēķina tur, kur optiskais blīvums $OD < 0,10$.

Piemēram: $OD (F, 256 \text{ mg/L}) = 0,0995 < 0,10 \rightarrow$

$$\rightarrow FIC_{\text{antibiotika (furazidīns)}} = \frac{256}{2048} = 0,125;$$

$$\rightarrow FIC_{\text{fāgs GPH19}} = \frac{1,5625 \times 10^4}{2,5 \times 10^5} = 0,0625$$

$$\rightarrow FICI = FIC_{\text{antibiotika(furagīns)}} + FIC_{\text{fāgs GPH19}} = 0,125 + 0,0625 = 0,1875 \rightarrow \mathbf{0,188}$$

Pēc iegūtā FICI rezultāta, kas ir $< 0,5$ var secināt, ka furasola un fāga kombinācija darbojas efektīvāk nekā fāgs un antibiotika atsevišķi.

Tabula 7.6.2. FICI aprēķini: bakteriofāgs GPH19, *K. pneumoniae* 24301732oth, furagīns.

		Furagīna koncentrācija mg/L									
		1024 mg/L	512 mg/L	256 mg/L	128 mg/L	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L
Bakteriofāga GPH19 koncentrācija	(A) 5×10^5	2.500	2.250	2.125	2.062	2.031	2.016	2.008	2.004	2.002	2.001
	(B) $2,5 \times 10^5$	1.500	1.250	1.125	1.062	1.031	-	1.008	1.004	1.002	1.001
	(C) $1,25 \times 10^5$	1.000	0.750	0.625	0.562	-	-	-	-	-	-
	(D) $6,25 \times 10^4$	0.750	0.500	0.375	-	-	-	-	-	-	-
	(E) $3,125 \times 10^4$	0.625	0.375	0.250	-	-	-	-	-	-	-
	(F) $1,562 \times 10^4$	0.562	0.312	0.188	-	-	-	-	-	-	-
	(G) $7,812 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pēc FICI rezultātu tab. 7.6.2. novēro, ka $FICI \leq 0.5$:

1. D, 256mg/L;
2. E, 512mg/L un 256 mg/L;
3. F, 512mg/L un 256mg/L.

Additīvu efektu ($FICI 0.5 \leq FICI \leq 1.0$) novēro sekojošās koncentrāciju kombinācijās:

1. C, 512mg/L, 256 mg/L un 128mg/L;
2. D, 1024mg/L, 512mg/L;
3. E, 1024mg/L un F, 1024mg/L.

Tabula 7.6.3. Režģveida atšķaidījuma testa OD mērījumi un FICI klasifikācija, bakteriofāgs GPH164, *Klebsiella pneumoniae* 24301732oth, furagīns.

Režģveida atšķaidījumu tests, bakteriofāgs GPH164, baktērija — 24301732oth
OD vērtības ar FICI klasifikāciju

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
(A) 5×10^5	0.0599	0.0590	0.0624	0.0692	0.0594	0.1011	0.0800	0.0665	0.0712	0.0620	0.0574	0.8014
(B) 2.5×10^5	0.0621	0.0631	0.0662	0.0648	0.0655	0.0657	0.0683	0.0808	0.0859	0.0717	0.0616	0.8814
(C) 1.25×10^5	0.0643	0.0688	0.0852	0.0708	0.0727	0.2031	0.2778	0.3231	0.2965	0.3066	0.3438	0.0555
(D) 6.25×10^4	0.0739	0.0730	0.0864	0.0802	0.0830	0.2813	0.2558	0.2409	0.2448	0.3024	0.3530	0.0411
(E) 3.125×10^4	0.0725	0.0792	0.0827	0.0889	0.0940	0.2651	0.2658	0.3279	0.2715	0.3319	0.3379	0.1941
(F) 1.5625×10^4	0.0771	0.1030	0.1088	0.1065	0.1667	0.2291	0.2298	0.3320	0.3830	0.4529	0.4799	0.2082
(G) 7.8125×10^3	0.1530	0.1504	0.1035	0.1106	0.1210	0.2602	0.2562	0.3874	0.4398	0.4463	0.5578	0.0421
(H) Antibiotika	0.7389	0.8814	0.9435	0.9388	0.9395	0.9341	0.9884	0.9344	1.0125	1.1750	0.0380	0.0401
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	Fāgs	Kontr.

Antibiotikas koncentrācija (1024 → 2 mg/L)

Svītrojumu skaidrojums:
 1. Diagonālās svītras (/) → FICI < 0.5 (Sinerģija)
 2. Vertikālās svītras (|) → $0.5 \leq \text{FICI} \leq 1.0$ (Additīvs / Indiference)

Optiskā blīvuma (OD) mērījumi baktēriju kultūrai *Klebsiella pneumoniae* 24301732oth ar bakteriofāgu GPH164, kombinācijā ar furagīnu, rezultāti:

1. Negatīvā kontrole (G12,H12): OD vērtības ļoti zemas (0,0421 un 0,0401), kas norāda, ka baktērijas buljonā neaug.
2. Pozitīvā kontrole (A12,B12): OD vērtības 0,80 - 0,88, kas norāda uz pilnīgu baktēriju augšanu.
3. Baktērija + antibiotika kontrole (E12,F12): šajās bedrītēs bija izvēlēta paaugstināta antibiotikas koncentrācija – 2048 mg/L, lai būtu iespējams aprēķināt FIC un FICI.
4. Baktērija + bakteriofāgs kontrole (C12, D12): OD vērtības zemas (0,0555 un 0,0411), kas norāda, ka baktērijas kombinācijā ar bakteriofāgu nav augušas.

Tabula 7.6.4. FICI aprēķini: bakteriofāgs GPH164, *K. pneumoniae* 24301732oth, furagīns.

		Furagīna koncentrācija mg/L									
		1024 mg/L	512 mg/L	256 mg/L	128 mg/L	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L
Bakteriofāgs GPH164 koncentrācija	(A) 5×10^5	2.500	2.250	2.125	2.062	2.031	-	-	-	-	-
	(B) 2.5×10^5	1.500	1.250	1.125	1.062	1.031	1.016	1.008	1.004	1.002	1.001
	(C) 1.25×10^5	1.000	0.750	0.625	0.562	0.531	-	-	-	-	-
	(D) 6.25×10^4	0.750	0.500	0.375	0.313	0.281	-	-	-	-	-
	(E) 3.125×10^4	0.625	0.375	0.250	0.188	0.156	-	-	-	-	-
	(F) 1.5625×10^4	0.563	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(G) 7.8125×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pēc FICI rezultātu tab. 7.6.4. novēro, ka $FICI \leq 0.5$ novēro:

1. D, 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L;
2. E, 512 mg/L, 256 mg/mL, 128 mg/L un 64 mg/L.

Additīvu efektu ($FICI 0.5 \leq FICI \leq 1.0$) novēro sekojošās koncentrāciju kombinācijās:

1. C, 512 mg/L, 256 mg/L, 128 mg/L, 64 mg/L;
2. D, 1024 mg/L, 512 mg/L;
3. E, 1024 mg/L un F, 1024 mg/L.

8. DISKUSIJA

Pētījumā tika veikta *Klebsiella pneumoniae*, bakteriofāga un furagīna, jeb Furasola, kas ir Latvijā pieejams bezrecepšu medikaments, padziļināta izpēte, lai pētītu kombinācijas efektivitāti. Zinātniskajās publikācijās galvenokārt tiek apskatīti recepšu antibakteriālie līdzekļi, tādēļ, interese rosina pētīt bezrecepšu medikamentu efektivitāti. Par cik, Pasaules valsts organizācija ir prioritizējusi *K.pneumoniae* kā patogēnu, kam steidzami nepieciešams izstrādāt jaunas ārstēšanas metodes un stratēģijas, ir vērts aplūkot nitrofurānu derivātu darbības iespējas. [45]

Maģistra darbā tiek noteikta furagīna minimālā inhibējošā koncentrācija (MIC) pret *K.pneumoniae*. *K.pneumoniae* celmam 24301723oth MIC vērtība bija ≥ 512 mg/L, kas norāda uz augstu rezistenci, bet celmam M16 tā bija 256 mg/L, kas arī norāda uz rezistenci. Iegūtie MIC rezultāti uzrāda, ka furagīns, kas ir nitrofurānu derivāts, ir tikpat efektīvs kā nitrofurantoīns, salīdzinot ar Vitek 2 iegūtajiem rezultātiem. Šī informācija ir nozīmīga, jo ar literatūras apskatā norādīto, nitrofurānu grupas antibakteriāliem līdzekļiem ir zems rezistences attīstības risks, kas ir saistīts ar antibiotikas specifisko darbības mehānismu. [12, 13, 37] Tomēr, atlasītajiem celmiem ir veidojusies rezistence un ir svarīgi pētīt alternatīvas stratēģijas baktēriju augšanas inhibēšanai. Augstas MIC vērtības korelē ar globālām tendencēm, kur nitrofurānu rezistence pieaug, īpaši rezistentos *K.pneumoniae* celmos.

Furasols ir antibakteriāls līdzeklis, kuru nelieto iekšķīgi, bet var lietot brūču skalošanai vai rīkles skalošanai. Ārējas lietošanas preparāta perspektīva ir zemāka toksicitāte, kā arī, to potenciāli varētu lietot arī medicīnas ierīcēm – katetriem vai drenām, samazinot infekcijas risku. [22][23].

Spot testā tiek identificēti divi bakteriofāgi GPH19 un GPH164, kas spēj lizēt divus (M16 un 24301732oth) no izvēlētajiem 7 baktēriju celmiem. Novēro atbilstību ar literatūras datiem, ka bakteriofāgiem ir augsta specifitāte un tie spēj lizēt konkrētas baktēriju šūnas, netraucējot normālai mikroflorai.[12] Tiek vizuāli novērots, ka 24301732oth ar abiem fāgiem uzrādīja skaidras līzes zonas, kamēr M16 uzrāda jutību pret GPH164, bet līzes zonas bija blāvākas. Turpmāk tiek noteikts bakteriofāgu titrs, kur novēro, ka konkrētas bakteriofāgu koncentrācijas spēj inficēt baktēriju kultūras. Tomēr, baktēriju kultūrai M16 bakteriofāga veidotas līzes zonas nenovēro, kas var būt saistīts ar to, ka tās bija pārāk blāvas, lai tās vizuāli pamanītu. Bakteriofāgu titru rezultāti - GPH19 - $3,0 \times 10^9$ PFU/mL; GPH164 - $3,2 \times 10^9$ PFU/mL norāda uz to, ka fāgu preparāti bija pietiekami koncentrēti, lai tie spētu nodrošināt baktēriju lizēšanu.

Režģveida atšķaidījuma testu rezultātos tika novērota izteikta sinerģija, kur bakteriofāgs GPH19 visefektīvākais bija koncentrācijā $1,562 \times 10^4$ pie furagīna koncentrācijas 256mg/L un bakteriofāgs GPH164 visefektīvākais ir koncentrācijā $3,125 \times 10^4$ pie furagīna koncentrācijas 64mg/L. Bakteriofāga un furagīna mijiedarbības testos, novēro kombinētās terapijas potenciālu, kas atbilst Mulla et al. minētajiem datiem, kas norāda, ka nitrofurāniem un bakteriofāgiem ir sinerģisks efekts.[48] Šāds efekts ir ļoti nozīmīgs, jo tas palīdz samazināt rezistences veidošanos un palielina ārstēšanas efektivitāti pret multirezistentiem *K. pneumoniae* celmiem. Režģveida atšķaidījuma testa rezultāti pierāda, ka furagīnam, bakteriofāgam un izmantotajam baktēriju celmam ir sinerģisks efekts, kas saskan ar hipotēzi, ka bakteriofāga-antibiotikas kombinācija spēj nodrošināt efektīvu antibakteriālo efektu pret rezistentiem celmiem. [48, 62]

Analizējot nitrofurānu un fāgu stabilitātes īpatnības, tika apkopots, ka gan nitrofurāni, gan fāgi ir jutīgi pret temperatūru, gaismu un pH izmaiņām. Furagīnu vislabāk saglabā stabilitāti no pH 4,5–6,5 un zem 25°C, ja nepieciešama ilgstoša uzglabāšana. Fāgi saglabā stabilitāti pie pH 5–6 un 4°C. Kombinācijai piemērots pH būtu no 5-6 – tāds, kur abi aģenti ir pietiekami stabili. Līdz ar to kombinācija teorētiski ir savienojama, bet nepieciešami precīzāki stabilitātes testi katram veidotajam šķīdumam.

Rezultātu ticamība tika nodrošināta ar precīziem un standartizētiem metodoloģiskiem paņēmieniem, ievērojot EUCAST standartus MIC noteikšanai, kā arī pārbaudot bakteriofāgu aktivitāti un koncentrāciju pēc atzītām metodēm. Šāda pieeja nodrošina rezultātu atkārtojamību un uzticamību.

9. SECINĀJUMI

1. Abiem izvēlētajiem *Klebsiella pneumoniae* celmiem tika konstatētas augstas MIC vērtības furagīnā (24301723oth – ≥ 512 mg/L; M16 – 256 mg/L), kas norāda uz ievērojamu rezistenci un pamato nepieciešamību pēc alternatīviem ārstēšanas veidiem.
2. Tika piemeklēti divi bakteriofāgi GPH164 un GPH19, kuri ir virulenti pret vismaz vienu no izvēlētajiem *K. pneumoniae* celmiem, kas nodrošina iespēju izpildīt nepieciešamos eksperimentus.
3. Bakteriofāgiem tika veikta titra noteikšana, identificējot optimālu dilūciju (10^{-7}), kas nodrošina pietiekamu plaku skaitu, lai veiktu režģveida atšķaidījuma testu.
4. Režģveida atšķaidījuma testā tika novērota sinerģija starp bakteriofāgu un furagīnu vairākās koncentrācijās, bez antagonisma pazīmēm, kas liecina par potenciāli efektīvu kombinēto terapiju.
5. Literatūras analīzē secināts, ka nitrofurāni un bakteriofāgi saglabā aktivitāti specifiskos pH un temperatūras apstākļos, kombinācija ir pietiekami stabila un potenciāli izmantojama praktiski.

Pateicības.

Izsaku pateicību Dacei Rezevscai, Renāram Brokam, Renātei Apsei un Limai Mukānei par sniegto praktisko palīdzību un atbalstu pētījuma norises gaitā.

Īpašu pateicību izsaku sava maģistra darba vadītājam Aigaram Reinim par profesionālo vadību, kompetentajiem ieteikumiem un nemainīgu atbalstu visā darba izstrādes procesā.

10. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [tiešsaiste]. Geneva: WHO, 2017 – [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams internetā: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>.
2. Lin, X.-C., Li, C.-L., Zhang, S.-Y., et al. Global and regional prevalence of hospital-acquired carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: A systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2024, vol. 11, N 2, ofad649. [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams internetā: <https://academic.oup.com/ofid/article/11/2/ofad649/7479891>.
3. Global Antibiotic Research and Development Partnership (GARDP). Meet *Klebsiella pneumoniae* – The superbug you’ve never heard of. *GARDP Reports*, 2024. [atsauce 23.03.2025.]. Pieejams internetā: <https://gardp.org/stories/meet-klebsiella-pneumoniae/>.
4. CHAMPS Sierra Leone. Antimicrobial Resistance Surveillance Report 2019–2022 [tiešsaiste]. CHAMPS Health Publications, 2024 [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams: <https://champshealth.org/wp-content/uploads/2024/08/New-publication-on-AMR-Resistance-from-CHAMPS-SL.pdf>.
5. Hassen, A. N., Zemene, E., Yimer, M., et al. Multidrug resistance profile and molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples in Southern Ethiopia [tiešsaiste]. *BMC Infectious Diseases*, 2024, vol. 24, N 1, p. 111. [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-024-09811-1>.
6. Zafer, M. M., El-Mahallawy, H. A., Abdulhak, A., et al. High prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-mediated resistance in *K. pneumoniae* isolates from Egypt. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 2013, N 19(11), p. 958–964.
7. Kaye, K. S., Gupta, V., Mulgirigama, A., Joshi, A. V., Ye, G., Scangarella-Oman, N. E., Yu, K., Mitrani-Gold, F. S. Prevalence, regional distribution, and trends of antimicrobial resistance among female outpatients with urine *Klebsiella* spp. isolates: a multicenter evaluation in the United States between 2011 and 2019. [tiešsaiste] *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2024, vol. 13, N 21, p. 1–10. [atsauce 23.02.2025.] Pieejams: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-024-01372-x>.

8. Li, G., Zhao, S., Wang, S., Sun, Y., Zhou, Y., Pan, X. A 7-year surveillance of the drug resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a primary health care center. [tiešsaiste] *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2019, vol. 18, N 34, p. 1–8. [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-019-0335-8>.
9. Aytaç, Ö. Antibiotic resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from urine cultures. [tiešsaiste] *Northwestern Medical Journal*, 2024, vol. 4, No. 2, p. 64–69. [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams: <https://nwmedj.org/article/view/108>.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. [tiešsaiste] Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019. [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Resistance mechanisms. [tiešsaiste] EUCAST, 2024. [atsauce 23.02.2025.]. Pieejams: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms.
12. Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., Turner, P. E. Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria.[tiešsaiste]. *Cell Host & Microbe*, 2019, vol. 25, N 2, p. 219–232. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128\(19\)30052-6](https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(19)30052-6).
13. Kettlewell, R., Jones, C., Felton, T. W., Lagator, M., Gifford, D. R. Insights into durability against resistance from the antibiotic nitrofurantoin. [tiešsaiste] *npj Antimicrobials and Resistance*, 2024, vol. 2, Article number: 41. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://www.nature.com/articles/s44259-024-00056-1>.
14. Li, G., Zhao, S., Wang, S., Sun, Y., Zhou, Y., Pan, X. A 7-year surveillance of the drug resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a primary health care center. [tiešsaiste] *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2019, vol. 18, Article number: 34. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-019-0335-8>.
15. Wyres, K. L., Lam, M. M. C., Holt, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, vol. 18, p. 344–359. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: DOI: 10.1038/s41579-019-0315-1.
16. Paczosa, M. K., Mecsas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense [tiešsaiste]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, vol. 14, p. 431–445. [atsauce 24.02.2025.].Pieejams: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.93>.

17. Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., Varaldo, P. E. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* [tiešsaiste]. *Pathogens*, 2014, vol. 3, N 3, p. 743–758. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://www.mdpi.com/2076-0817/3/3/743>.
18. Russo, T. A., Marr, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [tiešsaiste]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, vol. 32, N 3, e00001-19. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19>.
19. Gerlach, R. G., Hensel, M. Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens [tiešsaiste]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, vol. 297, p. 401–415. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.017>.
20. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., Hultgren, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options [tiešsaiste]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, vol. 13, N 5, p. 269–284. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>.
21. Martin, R. M., Bachman, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* [tiešsaiste]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, vol. 8, article 4. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>.
22. Ssekatawa, K., Byarugaba, D. K., Nakavuma, J. L., Kato, C. D., Ejobi, F., Tweyongyere, R., Eddie, W. M. Prevalence of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* based on PCR capsular typing harbouring carbapenemases encoding genes in Uganda tertiary hospitals [tiešsaiste]. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2021, vol. 10, article 57. [atsauce 24.02.2025.]. Pieejams: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-021-00923-w>.
23. Kelishomi, F. Z., Nikkhahi, F., Amereh, S., Ghayyaz, F., Marashi, S. M. A., Javadi, A., Shahbazi, G., Khakpour, M. Evaluation of the therapeutic effect of a novel bacteriophage in the healing process of infected wounds with *Klebsiella pneumoniae* in mice [tiešsaiste]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2024, vol. 36, p. 371–378. [atsauce 25.02.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.01.018>.
24. Tumbarello, M., Trecarichi, E. M., De Rosa, F. G., Giannella, M., Giacobbe, D. R., Bassetti, M., Losito, A. R., Bartoletti, M., Del Bono, V., Corcione, S., et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study [tiešsaiste]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, vol.

- 70, N 7, p. 2133–2143. [atsauce 25.02.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv086>.
25. Seo, H., Bae, S., Kim, M. J., Chong, Y. P., Kim, S. H., Lee, S. O. Risk factors for mortality in patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* and *Escherichia coli* bacteremia [tiešsaiste]. *Infection & Chemotherapy*, 2021, vol. 53, N 3, p. 528–538. [atsauce 25.02.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3947/ic.2021.0083>.
 26. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2023 – 2021 data [tiešsaiste]. Stockholm: ECDC, 2023. [atsauce 25.02.2025.]. Pieejams: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Antimicrobial%20resistance%20surveillance%20in%20Europe%202023%20-%202021%20data.pdf>.
 27. ECDC, & PVO. (2023). Antimikrobiālā rezistence: Eiropas reģiona izpildkopsavilkums 2022. gada datiem (Executive Summary). Eiropas Slimību profilakses un kontroles centrs [tiešsaiste]. [atsauce 07.03.2025.]. Pieejams: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Nov2023-ECDC-WHO-Executive-Summary.pdf>.
 28. Hussein, M., Sun, Z., Hawkey, J., Allobawi, R., Judd, L. M., Carbone, V., Sharma, R., Thombare, V., Baker, M., Rao, G. G., Li, J., Holt, K. E., & Velkov, T. (2024). High-level nitrofurantoin resistance in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*: a comparative genomics and metabolomics analysis [tiešsaiste]. *mSystems*, 9(1), e0097223. [atsauce 07.03.2025.]. Pieejams : <https://doi.org/10.1128/msystems.00972-23>
 29. Wand, M. E., Taylor, H. V., Auer, J. L., Bock, L. J., Hind, C. K., Jamshidi, S., Rahman, K. M., Sutton, J. M. Evaluating the level of nitroreductase activity in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* to support strategies for nitro drug and prodrug development [tiešsaiste]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2019. [atsauce 07.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.08.009>.
 30. Conlan S, Deming C, Tsai YC, Lau AF, Dekker JP, Korlach J, Segre JA. 2014. Complete Genome Sequence of a *Klebsiella pneumoniae* Isolate with Chromosomally Encoded Carbapenem Resistance and Colibactin Synthesis Loci. [tiešsaiste]. *Genome Announc.* 2014 Dec 24;2(6):e01332-14. [atsauce 07.03.2025.]. Pieejams : doi: 10.1128/genomeA.01332-14.
 31. Khamari, B., & Bulagonda, E. P. (2024). Unlocking Nitrofurantoin: Understanding Molecular Mechanisms of Action and Resistance in Enterobacterales [tiešsaiste].

- Medical Principles and Practice, 34(2), 121–137. Pieejams : <https://doi.org/10.1159/000542330> [Skatīts: 07.03.2025]
32. Vinogradova, L., Lukin, A., Komarova, K., Zhuravlev, M., Fadeev, A., Chudinov, M., Rogacheva, E., Kraeva, L., Gureev, M., Porozov, Y., Dogonadze, M., & Vinogradova, T. (2024). Molecular Periphery Design Allows Control of the New Nitrofurans Antimicrobial Selectivity [tiešsaiste]. *Molecules*, 29(14), 3364. Pieejams : <https://doi.org/10.3390/molecules29143364> [Skatīts: 07.03.2025]
 33. Khamari, B., & Bulagonda, E. P. (2024). Unlocking Nitrofurantoin: Understanding Molecular Mechanisms of Action and Resistance in Enterobacterales [tiešsaiste]. *Medical Principles and Practice*, 34(2), 121–137. [atsauce 07.03.2025.]. Pieejams : <https://doi.org/10.1159/000542330>.
 34. Squadrito, F. J., & del Portal, D. (2023). Nitrofurantoin. In *StatPearls* [tiešsaiste]. StatPearls Publishing. [atsauce 07.03.2025.]. Pieejams: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470526/>.
 35. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2024). Reading guide for broth microdilution [tiešsaiste]. Version 5.0, January 2024. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: https://www.eucast.org/guidance_documents/.
 36. Bellio, P., Fagnani, L., Nazzicone, L., & Celenza, G. (2021). New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay [tiešsaiste]. *MethodsX*, 8, 101543. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543>.
 37. Khamari, B., Adak, S., Chanakya, P. P., Lama, M., Peketi, A. S. K., Gurung, S. A., Chettri, S., Kumar, P., Bulagonda, E. P. Prediction of nitrofurantoin resistance among Enterobacteriaceae and mutational landscape of in vitro selected resistant *Escherichia coli* [tiešsaiste]. *Research in Microbiology*, 2022, vol. 173, issues 1–2, article 103889. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103889>.
 38. McOsker, C. C., Fitzpatrick, P. M. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens [tiešsaiste]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1994, vol. 33, suppl. A, pp. 23–30. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: https://doi.org/10.1093/jac/33.suppl_a.23.
 39. McOsker, C. C., Fitzpatrick, P. M. Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens [tiešsaiste]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1994, vol. 33, suppl. A, pp. 23–30. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: https://doi.org/10.1093/jac/33.suppl_a.23.
 40. Männistö, P., Karttunen, P. Pharmacokinetics of furagin, a new nitrofurantoin congener, on human volunteers [tiešsaiste]. *International Journal of Clinical Pharmacology*,

- Therapy, and Toxicology, 1979, vol. 17, no. 5, pp. 222–227. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/468451/>.
41. Feitosa, I. B., Mori, B., Dos Santos, A. P. A., Villanova, J. C. O., Teles, C. B. G., Costa, A. G. What are the immunopharmacological effects of furazolidone? A systematic review [tiešsaiste]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2021, vol. 43, no. 6, pp. 674–679. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1979034>.
 42. Tang, M., Huang, Z., Zhang, X., Kong, J., Zhou, B., Han, Y., Zhang, Y., Chen, L., Zhou, T. Phage resistance formation and fitness costs of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* mediated by K2 capsule-specific phage and the corresponding mechanisms [tiešsaiste]. Frontiers in Microbiology, 2023, vol. 14, article 1156292. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1156292>.
 43. Tang, M., Huang, Z., Zhang, X., Kong, J., Zhou, B., Han, Y., Zhang, Y., Chen, L., Zhou, T. Phage resistance formation and fitness costs of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* mediated by K2 capsule-specific phage and the corresponding mechanisms [tiešsaiste]. Frontiers in Microbiology, 2023, vol. 14, article 1156292. [atsauce 13.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1156292>.
 44. Gan, L., Fu, H., Tian, Z., Cui, J., Yan, C., Xue, G., Fan, Z., Yuan, J. Bacteriophage effectively rescues pneumonia caused by prevalent multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the early stage [tiešsaiste]. Microbiology Spectrum, 2022, vol. 10, no. 5, e02358-22. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02358-22>.
 45. Frontiers in Microbiology. Phage-antibiotic combinations against *Klebsiella pneumoniae*: impact of methodological approaches on effect evaluation [tiešsaiste]. 12 March 2025, vol. 16. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1530819>.
 46. Diallo, K., Dublanchet, A. Benefits of Combined Phage–Antibiotic Therapy for the Control of Antibiotic-Resistant Bacteria: A Literature Review [tiešsaiste]. Antibiotics (Basel), 2022, vol. 11, no. 7, article 839. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070839>.
 47. Qin, K., Shi, X., Yang, K., Xu, Q., Wang, F., Chen, S., Xu, T., Liu, J., Wen, W., Chen, R., Liu, Z., Cui, L., Zhou, K. Phage-antibiotic synergy suppresses resistance emergence of *Klebsiella pneumoniae* by altering the evolutionary fitness [tiešsaiste]. mBio, 2024, vol. 15, no. 2, e03975-23. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1128/mbio.03975-23>.

48. Mulla, Y., Müller, J., Trimcev, D., Bollenbach, T. Extreme diversity of phage amplification rates and phage–antibiotic interactions revealed by PHORCE [tiešsaiste]. *PLOS Biology*, 2025, published April 8. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3003065> .
49. Al-Anany, A. M., Fatima, R., Nair, G., Mayol, J. T., Hynes, A. P. Temperate phage-antibiotic synergy across antibiotic classes reveals new mechanism for preventing lysogeny [tiešsaiste]. *mBio*, 2024, vol. 15, no. 6, e00504-24. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1128/mbio.00504-24> .
50. Chan, B. K., Turner, P. E., Kim, S., Mojibian, H. R., Elefteriades, J. A., Narayan, D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa* [tiešsaiste]. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2018, vol. 2018, no. 1, pp. 60–66. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1093/emph/eoy005> .
51. Moryl, M., Szychowska, P., Dziag, J., Rózsalski, A., Torzewska, A. The Combination of Phage Therapy and β -Lactam Antibiotics for the Effective Treatment of *Enterococcus faecalis* Infections [tiešsaiste]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, vol. 26, no. 1, article 11. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3390/ijms26010011>.
52. Bielec, F., Brauncajs, M., Pastuszek-Lewandoska, D. Nitrofurantoin Derivatives Cross-Resistance Evidence—Uropathogenic *Escherichia coli* Nitrofurantoin and Furazidin In Vitro Susceptibility Testing [tiešsaiste]. *Journal of Clinical Medicine*, 2023, vol. 12, no. 16, article 5166. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3390/jcm12165166>.
53. Yakovlev, V., Gadzhieva, K., Suvorova, P. Antimicrobial activity of nitrofurans (nitrofurantoin, furazidine and furazidine potassium) against uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with lower urinary tract infections [in Russian] [tiešsaiste]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*, 2024, article in press. PMID: 39563573. [atsauce 14.03.2025.]. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39563573/> .
54. Pehlivanov, I., Stoeva, S., Simitchiev, A., Stefanov, S., Andonova, V. Stability study of extemporaneously compounded nitrofurantoin oral suspensions for pediatric patients [tiešsaiste]. *Folia Medica (Plovdiv)*, 2022, vol. 64, no. 5, pp. 807–816. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3897/folmed.64.e72334>.
55. Pogorzelska, J., Roman, M. Use of furazidin in the form of a stable, ready-to-use oral liquid formulation [tiešsaiste]. Patent no. PL236891B1. Granted: 2021. Inventors:

- Joanna Pogorzelska, Mirosław Roman. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://patents.google.com/patent/PL236891B1/en> .
56. Wdowiak, M., Paczesny, J., Raza, S. Enhancing the Stability of Bacteriophages Using Physical, Chemical, and Nano-Based Approaches: A Review [tiešsaiste]. *Pharmaceutics*, 2022, vol. 14, no. 9, article 1936. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091936> .
 57. Kim, M. K., Suh, G. A., Cullen, G. D., Rodriguez, S. P., Dharmaraj, T., Chang, T. H. W., Li, Z., Chen, Q., Green, S. I., Lavigne, R., Pirnay, J.-P., Bollyky, P. L., Sacher, J. C. Bacteriophage therapy for multidrug-resistant infections: current technologies and therapeutic approaches [tiešsaiste] - [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams : <https://www.jci.org/articles/view/187996#:~:text=storage%20in%20buffer%20or%20growth,further%20minimize%20titer%20loss%20for>.
 58. Ranveer, S. A., Dasriya, V., Ahmad, M. F., Dhillon, H. S., Samtiya, M., Shama, E., Anand, T., Dhewa, T., Chaudhary, V., Chaudhary, P., Behare, P., Ram, C., Puniya, D. V., Khedkar, G. D., Raposo, A., Han, H., Puniya, A. K. Positive and negative aspects of bacteriophages and their immense role in the food chain [tiešsaiste]. *npj Science of Food*, 2024, article number: 1. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://www.nature.com/articles/s41538-023-00235-1>.
 59. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., Górski, A. The influence of external factors on bacteriophages—review [tiešsaiste]. *Folia Microbiologica*, 2011, vol. 56, pp. 191–200. Published: 31 May 2011. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8> .
 60. Lin, X., Li, C., Zhang, S., Yang, X., Jiang, M. The Global and Regional Prevalence of Hospital-Acquired Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Systematic Review and Meta-analysis [tiešsaiste]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2024, vol. 11, no. 2, article ofad649. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad649> .
 61. Karampatakis, T., Tsergouli, K., Behzadi, P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options [tiešsaiste]. *Antibiotics (Basel)*, 2023, vol. 12, no. 2, article 234. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020234> .
 62. Zhao, M., Li, H., Gan, D., Wang, M., Deng, H., Yang, Q. E. Antibacterial effect of phage cocktails and phage–antibiotic synergy against pathogenic *Klebsiella pneumoniae* [tiešsaiste]. *mSystems*, 2024, vol. 9, e00607-24. [atsauce 20.03.2025.]. Pieejams: <https://doi.org/10.1128/msystems.00607-24> .

11. PIELIKUMI

Pielikums Nr 1.

Baktēriju kultūra M16		
Antibiotika	MIC (mg/L)	Interpretācija
Ampicillin	≥32	R - rezistents
Amoxicillin/Clavulanic Acid	≥32	R
Urine	≥32	R
Other	≥32	R
Piperacillin/Tazobactam	32	R
Cefalexin	≥64	R
Cefuroxime	≥64	R
Cefuroxime Axetil	≥64	R
Cefoxitin		
Cefotaxime		
Meningitis	≥64	R
Other	≥64	R
Ceftazidime	≥32	R
Cefepime	≥32	R
Ertapenem	≤0.12	S - jutīgs
Meropenem		
Meningitis	≤0.25	S
Other	≤0.25	S
Amikacin	≥2	R
Gentamicin	≥16	R
Ciprofloxacin		
Meningitis	≥4	R
Other	≥16	R
Norfloxacin	≥16	R
Nitrofurantoin		
Urine	128	R
Other	128	R
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≥320	R

Baktēriju kultūra 24301732oth		
Antimicrobial	MIC (mg/L)	Interpretation
Ampicillin	≥32	R
Amoxicillin/Clavulanic Acid	≥32	*R
Urine	≥32	R
Other	≥32	R
Piperacillin/Tazobactam	≥128	R
Cefalexin	≥64	R
Cefuroxime	≥64	R
Cefuroxime Axetil	≥64	R
Cefoxitin		
Cefotaxime		
Meningitis	≥64	R
Other	≥64	R
Ceftazidime	≥64	R
Cefepime	≥32	R
Ertapenem	≥8	R
Meropenem	≥16	R
Meningitis	≥16	R
Other	≥64	R
Amikacin	≥64	R
Gentamicin	4	R
Ciprofloxacin		R
Meningitis	≥4	R
Other	≥4	R
Norfloxacin	≥16	R
Nitrofurantoin	≥512	R
Urine	≥512	R
Other	≥512	R
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≥320	R

Pielikums Nr.3. OD vērtības MIC vērtību noteikšanai furasolā.

	2048mg/L	1024mg/L	512mg/L	256 mg/L	128 mg/L	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	POZ K	NEG K
24301723oth	0,3489	0,6978	0,7824	0,7360	0,7493	0,7489	0,8505	0,8509	0,8033	0,8732	0,8927	0,0563
24301723oth	0,2900	0,6844	0,8132	0,6819	0,7813	0,7669	0,7747	0,8637	0,8903	0,8288	0,8852	0,0563
24301723oth	0,2978	0,6881	0,8263	0,7457	0,8140	0,7908	0,8868	0,8892	0,8790	0,9401	0,9929	0,0564
M16	0,0800	0,1390	0,2063	0,2002	0,7436	0,9646	1,0669	1,4218	1,5560	1,5914	1,2844	0,0546
M16	0,0804	0,1532	0,1901	0,2044	0,6838	1,0099	1,1252	1,1466	1,1695	1,1916	1,2476	0,0672
M16	0,0786	0,1338	0,1816	0,1998	0,7534	0,9867	1,0621	1,1320	1,1604	1,1599	1,1887	0,0569
Blanks	0,0384	0,0383	0,0390	0,0396	0,0392	0,0396	0,0386	0,0386	0,0388	0,0387	0,0389	0,0387
Blanks	0,0388	0,0386	0,0387	0,0386	0,0390	0,0386	0,0384	0,0385	0,0386	0,0388	0,0390	0,0391

	512mg/L	256 mg/L	128 mg/L	64 mg/L	32 mg/L	16 mg/L	8 mg/L	4 mg/L	2 mg/L	1 mg/L	POZ K	NEG K
24301723oth	0,6850	0,7439	0,6830	0,7234	0,7775	0,8441	0,9353	0,9929	0,9882	0,9920	0,9898	0,0552
24301723oth	0,5933	0,8228	0,5631	0,6067	0,7361	0,7706	0,7160	0,7838	0,8861	0,8597	0,9161	0,0592
24301723oth	0,7508	0,7847	0,6679	0,6461	0,7093	0,7517	0,7017	0,7541	0,7765	0,7301	0,7964	0,0574
M16	0,2166	0,2022	0,5888	0,9618	0,8308	1,1651	0,8877	0,9745	0,9121	1,0115	0,9228	0,0572
M16	0,1296	0,2180	0,7002	1,0153	0,8205	1,1845	0,9516	0,9907	1,0457	1,0606	1,0340	0,0569
M16	0,1190	0,1880	0,7207	1,0746	0,8126	1,2032	0,9981	1,0452	1,0470	1,0423	1,0409	0,0566
Blanks	0,0456	0,0449	0,0450	0,0441	0,0448	0,0442	0,0445	0,0436	0,0440	0,0458	0,0436	0,0568
Blanks	0,0442	0,0446	0,0444	0,0442	0,0440	0,0431	0,0413	0,0371	0,0339	0,0363	0,0408	0,0561