



Karīna Aksenoka

***Clostridium difficile* klīniskā un molekulārā
epidemioloģija Latvijā**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Specialitāte – klīniskā mikrobioloģija

Zinātniskie vadītāji:

**Dr. habil. med., LZA kor loc. Dace Gardovska, Rīgas Stradiņa
universitātes profesore**

**Dr. biol. Edvīns Miklaševičs, Rīgas Stradiņa universitātes
asociētais profesors**

Rīga, 2011

PRK - 3836

455-756



Karīna Aksenoka

***Clostridium difficile* klīniskā un molekulārā
epidemioloģija Latvijā**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

Specialitāte – klīniskā mikrobioloģija

Zinātniskie vadītāji:

**Dr. habil. med., LZA kor loc. Dace Gardovska, Rīgas Stradiņa
universitātes profesore**

**Dr. biol. Edvīns Miklaševičs, Rīgas Stradiņa universitātes
asociētais profesors**

Rīga, 2011

Promocijas darbs veikts:

Rīgas Stradiņa Universitātē;

VSIA "Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca"

Promocijas darba vadītāji:

Dr. habil. med., LZA kor loc., RSU profesore **Dace Gardovska**

Dr. biol., RSU asoc. profesors **Edvīns Miklaševičs**

Oficiālie recenzenti:

Dr. med., RSU profesore **Juta Kroiča**

Dr. habil. biol., LU profesors **Aleksandrs Rapoportis**

Dr. biol., LU profesors **Viesturs Baumanis**

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājaslapā:

www.rsu.lv

Rīgas Stradiņa universitātes teorētiskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēde notiks:

2011. gada 14. martā plkst.14.00

Rīgas Stradiņa universitātes Hipokrāta auditorijā


Rīgā, Dzirciema ielā 16

Promocijas padomes priekšsēdētājs:

Dr. habil. med., profesors **Jānis Vētra**

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. habil. med., profesore **Līga Aberberga – Augškalne**



Saturs

1. Izmantotie saīsinājumi	5
2. Ievads	6
2.1. Pētījuma aktualitāte	7
2.2. Darba mērķis	8
2.3. Darba uzdevumi	8
2.4. Darba zinātniskā novitāte	9
3. Pētījuma materiāls un metodes	10
3.2. Pētījuma uzbūve	10
3.2.1. Bērnu grupas atlases kritēriji	11
3.2.2. Pieaugušo grupas atlases kritēriji	11
4. Rezultāti	13
4.1. Bērnu grupas analīze	13
4.1.1. Ar akūtu zarnu infekciju hospitalizēto bērnu demogrāfisko datu analīze ...	13
4.1.2. Pacientu stacionēšanas un klīnisko diagnožu variācijas	13
4.1.3. Pacientu klīniskās ainas novērtējums stacionārā	14
4.1.4. Pacientu klīniski laboratorisko datu izvērtējums	14
4.1.5. Akūtas zarnu infekcijas riska faktoru izvērtējums	15
4.1.6. <i>C.difficile</i> prevalence stacionārā ārstētiem bērniem ar diarejas klīniku	15
4.2. Pieaugušo grupas analīze	17
4.2.1. P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas nodaļas diagnostikas metožu pilnveidošanās no 2005. līdz 2009. gadam	17
4.2.2. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku demogrāfisko datu analīze	18
4.2.3. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku prevalence P. Stradiņa KUS nodaļās	19
4.2.4. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku iespējamo riska faktoru izvērtējums	19
4.2.5. <i>C.difficile</i> infekcijas slimnieku klīnisko simptomu prezentācija	20
4.2.6. CDAD slimnieku stacionārā pavadīto gultasdienu analīze	20
4.2.7. <i>C.difficile</i> infekcijas slimniekiem izmantotās terapijas analīze	20
4.2.8. Slimnieku, kuriem attīstījās <i>C.difficile</i> reinfekcija, analīze	21
4.2.9. Vankomicīna rezistences gēnu analīze	21
4.2.10. <i>C.difficile</i> celmu filoģenētiskā analīze	22

4.2.11. MLST analīze	24
4.2.12. Toksinotipu variāciju analīze	25
5. Vadlīnijas <i>C.difficile</i> testēšanai	26
6. Diskusija	28
7. Secinājumi	33
8. Konferenču tēzes un prezentācijas par pētījuma tēmu	34
9. Publikācijas par pētījuma tēmu	35
10. Pateicības	36

1. Izmantotie saīsinājumi

- AAAD – antibiotiku asociētā diareja
AGE – agarozes gēla elektroforēze
C.difficile – *Clostridium difficile*
CCA – šūnu kultūru citotoksicitātes tests
CDAD – *Clostridium difficile* asociēta diareja
CDI – *C.difficile* infekcija
CT – kompjūtertogrammācija
CRO-C–reaktīvais olbaltums
DNS – dezoksiribonukleīnskābe
EDTA – etilēndiaminotetraetiskābe
ELISA – enzimatiska imūnfermatīva reakcija
FliD – flagelāra vāciņu olbaltumviela
GDH – glutamātdehidrogenāze
GLC – gāzes hromatogrāfijas metode
Il-8 – interleikīns 8
MLSB – makrolīdu - linkozamīda - streptogramīna B grupas antibiotikas
MLST – multilokusu sekvenēšana
PaLoc – patogenitātes lokuss
PFGE -- pulsējošā lauka elektroforēze
PMK – pseidomembranozs kolīts
PĶR /PCR – polimerāzes ķēdes reakcija
ST-3 – sekvenences tips 3
TC – šūnu kultūru toksiskās aktivitātes tests
tcdA – toksinogēns A
tcdB – toksinogēns B
TM – toksisks megakolons
TT-1 – toksinotips 1

2. Ievads

C.difficile baktērijas izraisītās saslimšanas pēdējo trīs desmitgažu laikā ir kļuvušas par globālu un grūti risināmu problēmu. Šis fakts izskaidrojams ar to, ka klīnikās tiek lietots arvien plašāks antibiotisko preparātu un ķīmijpreparātu spektrs. Stacionāros slimnieku palātas arvien biežāk tiek kontaminētas ar *C.difficile* sporām, jo baktērija kļūst izturīga pret telpu tīrīšanas ķīmiskajiem līdzekļiem. Līdz ar infekcijas izplatību pilnveidojas arī tās diagnostikas metožu klāsts, kas ļauj rūpīgāk identificēt šo baktēriju vai tās darbības produktus.

Infekcijas izpausmes variē, sākot no asimptomātiskas kolonizācijas kuņģa un zarnu traktā līdz smagām diarejām. Var attīstīties tādi dzīvību apdraudoši stāvokļi kā pseidomembranozs kolīts (PMK), toksisks megakolons (TM), zarnu perforācija un nāve. *C.difficile* riska pacients ir cilvēks gados ar smagu pamatslimību, kas ilgstoši uzturas stacionārā, terapijā saņem antibakteriālos preparātus, antacīdus un pretčūlas līdzekļus, kuram ir bijusi ķirurģiska iejaukšanās gastrointestinālajā traktā vai kāda orgāna transplantācija, kura vienmēr ir saistāma ar imūnsupresiju.

Ar antibiotiku lietošanu saistītās diarejas apkopo angļu valodā termins Clostridium difficile associated disease jeb CDAD. Ar CDAD attīstību saistāmas gandrīz visas antibiotikas. Biežāk CDAD attīstās slimniekiem, kuriem terapijā tika nozīmēti šādi antibakteriālie līdzekļi: aminopenicilīni (ampicilīns, amoksicilīns), cefalosporīni (pirmās līdz ceturtās paaudzes), klindamicīns, makrolīdi (eritromicīns), tetraciklīns, sulfanilamīdi, trimetoprimis, fluorhinoloni. Reti CDAD attīstās uz vankomicīna, metronidazola un parenterāli ievadāmo aminoglikozīdu fona.

2.1. Petījuma aktualitāte

C.difficile infekcija pēdējos gados izraisa ļoti nopietnu slimību ar incidenci no 80 līdz 200 gadījumi uz 10 000 stacionētu pacientu. Ir palielinājies ar *C.difficile* saistītās saslimšanas smagums, jo radušies hipervirulenti, sevišķi patogēni, ciprofloksacīna, metronidazola multirezistenti celmi. Smags TM izraisa mirstību 24 –38% gadījumu.

CDAD ir kļuvusi par globālu problēmu. Aktuāla kļūst baktērijas izpēte arī Latvijā, lai veiktu ne tikai šī mikroorganisma diagnostiku, bet arī veiktu padziļinātu molekulāri bioloģisku izpēti, lai nepieciešamības gadījumā uzsāktu adekvātu terapiju un veiktu preventīvos infekcijas kontroles pasākumus.

Latvijā *C.difficile* baktērija līdz šim nebija pētīta, tāpēc nav datu par *C.difficile* celmu cirkulāciju un baktērijas molekulāri ģenētisko tipu. Svarīgi ir izpētīt situāciju Latvijā, jo, pastāvot pat kādām nelielām cirkulējošā icrosinātāja mikrobioloģiskajām izmaiņām, arī slimības ārstēšanas process un gaita var atšķirties no citu valstu pieredzes.

2.2. Darba mērķis

Darba mērķis ir noteikt Latvijā cirkulējošās *C.difficile* molekulāri ģenētisko tipu, tās lomu infekciozo diareju attīstībā dažāda profila stacionāros un dažādās slimnieku vecuma grupās.

2.3. Darba uzdevumi

1. Veikt Latvijas *C.difficile* izolātu filoģenētisko analīzi, izveidojot celmu filoģenētisko koku.
2. Definēt un aprakstīt Latvijas apstākļiem raksturīgo *C.difficile* toksinotipu un sekvenču tipu.
3. Noteikt izolētajās *C.difficile* kultūrās vankomicīna rezistences gēnu klātbūtni.
4. Pielāgot laboratorijas apstākļiem baktēriju noteikšanas metodiku, ribotipu un toksinotipu metodes un izveidot laboratoriskās testēšanas algoritmu.
5. Veikt CDAD slimnieku, kuriem diagnoze pierādīta laboratoriski, klīnisko un epidemioloģisko datu analīzi.
6. Noteikt *C.difficile* lomu diareju attīstībā bērniem, kuri stacionēti ar diareju un/vai hemokolītu.
7. Izveidot izolēto *C.difficile* tīrkultūru celmu un baktēriju DNS (dezoksiribonukleīnskābe) kriobankas.

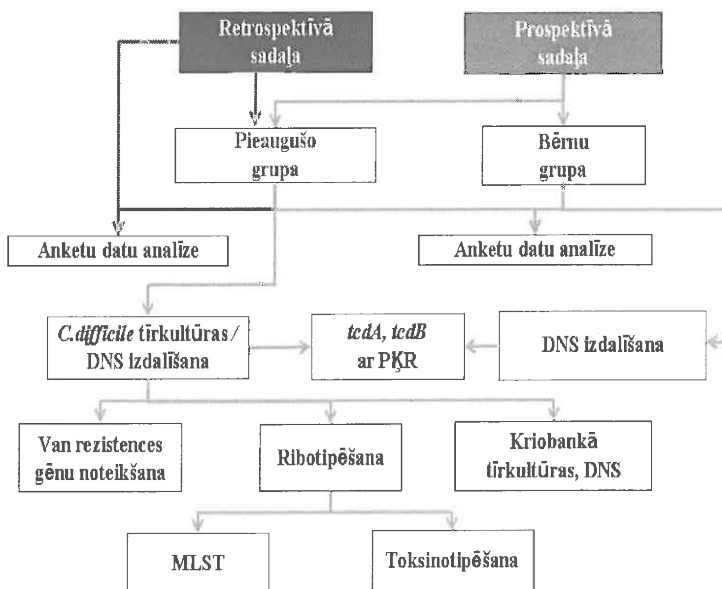
2.4. Darba zinātniskā novitāte

1. Noskaidrota *C.difficile* prevalence stacionārā ārstētiem bērniem.
2. Izveidota *C.difficile* celmu tīrkultūru un DNS kriobankas.
3. Aprobētas jaunas laboratorijas apstākļiem atbilstošas, iepriekš Latvijā neizmantotas, molekulāri bioloģiskas *C.difficile* identifikācijas metodes.
4. Izveidots *C.difficile* ribotipu filogenētiskais koks.
5. Latvijā atklāts pētāmās baktērijas 1. toksinotips (TT-1) un 3. sekvenču tips (ST-3).
6. Izveidots *C.difficile* testēšanas algoritms.
7. Izveidots sistemātisks literatūras apskats, balstoties uz jaunākajām zinātniskajām publikācijām.

3. Pētījuma materiāls un metodes

3.2. Pētījuma uzbūve

Pētījums sastāv no retrospektīvās sadaļas, kurā veikta slimības vēsturu datu analīze, un prospektīvās sadaļas, kurā veikta gan slimības vēsturu analīze, gan paraugu analīze laboratorijā. (Attēls 1).



Attēls 1. Pētījuma uzbūve.

Visi laboratorie izmeklējumi tika veikti VSIA „Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas” Centrālās laboratorijas Molekulārās bioloģijas un ģenētikas nodaļā un Mikrobioloģijas nodaļā.

3.2.1. Bērnu grupas atlasē kritēriji

Pētījumā tika izmeklēti 248 bērnu fēču paraugi. Slimnieku demogrāfiskā informācijas datu analīzē tika iekļauti 187 bērni, kuri laika posmā no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada martam tika stacionēti Bērnu klīniskā universitātes slimnīcā (BKUS) ar diagnozi kolīts, gastroenterokolīts vai enerīts.

Pēc iekļaušanas pētījumā katram bērnam tika piešķirts identifikācijas numurs. Izmantojot anketēšanas metodi, tika iegūti dati ne tikai par bērna slimības anamnēzi, bet arī demogrāfiskie dati un informācija par antibakteriālās terapijas vēsturi. Pētījums tika veidots kā prospektīvs.

3.2.2. Pieaugušo grupas atlasē kritēriji

Slimnieku datu analīzei tika izveidota anketa, kurā tika atzīmēti dati par pacientiem, kuri ārstējās P. Stradiņa KUS nodaļās laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada beigām. Anketēšanu izmantoja jau iepriekš apstiprinātiem slimības gadījumiem, tas ir, slimniekiem ar *C.difficile* infekciju. Tika iegūta informācija par slimības anamnēzi un demogrāfiskie dati. Tika izvērtēti literatūrā aprakstītie iespējamie infekcijas riska faktori: antibakteriālās terapijas vēsture, laboratoriskās izmeklēšanas secības dati, stacionārā uzturēšanās ilgums un veiktās manipulācijas. Rezultātā tika aizpildītas 175 anketas, kuru datu apkopošana un analīze veikta, izmantojot EpiInfo programmu.

Pētījuma laikā, pamatojoties uz literatūrā aprakstītu metodiku, tika izstrādātas un piemērotas metodes esošajiem laboratoriskajiem apstākļiem. Lai iegūtu ticamus un analīzei piemērotus rezultātus, darba gaitā viena parauga analīzei tika izmantotas vairākas diagnostikas metodes, kuru izstrāde un piemērošana notika paralēli ar paraugu vākšanu un atlasē. Lielākā daļa paraugu tika izmeklēti ar trim metodēm, un pētāmās materiāls tika iegūts, izmantojot divas dažādas metodes.

Pētījumā tika izmeklēti 500 fēču paraugi, kuri tika nosūtīti uz laboratoriju no Rīgas Austrumu klīniskās slimnīcas klīnikas „Gaiļezers”, „Traumatoloģijas un ortopēdijas slimnīcas” un P. Stradiņa KUS ar aizdomām par *C.difficile* infekciju. Laika

posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada beigām, vadoties pēc PĶR un mikrobioloģiskajiem izmeklējumiem, pētījumā tika iekļauti 95 pozitīvi paraugi, kuri tika ribotipēti. Izvēles kārtībā celmiem ar vienādu ribotipu tika veikta MLST noteikšana, kā arī toksinotipēšana. Visi pozitīvie *C.difficile* celmi tika ievietoti kriobankā. Pētījums veidots kā retrospektīvi prospektīvs.

4. Rezultāti

4.1. Bērnu grupas analīze

4.1.1. Ar akūtu zarnu infekciju hospitalizēto bērnu demogrāfisko datu analīze

Pētījumā tika iekļauti 187 bērni, kuri stacionēti BKUS no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada martam. Pacientu vecums svārstījās no 3 dienām līdz 16 gadiem ar vidējo vecumu 2 gadi 11 mēneši. Vairums pacientu bija vecumā no 12 līdz 24 mēnešiem – 28,9% (n=54) un no 0 līdz 12 mēnešiem – 25,1% (n=47).

4.1.2. Pacientu stacionēšanas un klīnisko diagnožu variācijas

59,9% (n=112) pacientiem stacionēšanas diagnoze bija akūts gastroenterīts, 9,1% (n=17) – stacionēti ar diagnozi akūts gastroenterokolīts, 11,2% (n=21) – akūts enterīts, 10,2% (n=19) – akūts enterokolīts, 8,0% (n=15) – funkcionāli gremošanas traucējumi, bet 1,6% (n=3) bija cita stacionēšanas diagnoze ar akūtu zarnu infekcijas slimības klīniku. 90,9% (n=170) pacientu tika stacionēti ar infekciju diagnozi.

Veicot apskati stacionārā un uzstādot klīnisko diagnozi, pētījuma subjektu sadalījums bija šāds 55,6% (n=104) bērnu bija akūts gastroenterīts, no kuriem fēcēs 7 bērniem atklāja *C.difficile* baktērijas abus toksinogēnus un vienam bērnam tikai toksinogēnu B. 13,4% (n=25) – akūts gastroenterokolīts, šajā grupā atklāja vienam bērnam abus toksinogēnus un tikai toksinogēnu B arī vienam bērnam. 5,3% (n=10) – akūts enterīts. 9,1% (n=17) akūts enterokolīts. 11,8% (n=22) – funkcionāli gremošanas traucējumi, bet 4,8% (n=9) bija cita ar akūtām zarnu infekcijām saistīta klīniskā diagnoze, šajā grupā vienam bērnam diagnoze bija infekciozā mononukleoze ar *C.difficile* abu toksinogēnu laboratorisko atradni. 9,6% (n=18) pacientu bija konstatēts hemokolīts.

Pacienti pēc klīniskās diagnozes apstiprināšanas ārstējušies BKUS vidēji 4,1 gultsdienu. Minimālais rādītājs – 1 diena, maksimālais – 90 dienas.

4.1.3. Pacientu klīniskās ainas novērtējums stacionārā

11,1% (n=2) pacientu tika stacionēti bez eksikozes pazīmēm, 79,1% (n=148) bija I pakāpes eksikoze, 18,2% (n=34) – II pakāpes eksikoze un 1,6% (n=3) pacientu tika stacionēti ar III pakāpes eksikozi.

Analizējot pacientu vispārējo stāvokli stacionēšanas brīdī, redzams, ka 1,1% (n=2) pacientu vispārējais stāvoklis bija viegls, 91,4% (n=171) vispārējais stāvoklis bija vidēji smags, savukārt 7,5% (n=13) pacientu stacionēti smagā vispārējā veselības stāvoklī.

4.1.4. Pacientu klīniski laboratorisko datu izvērtējums

- 97,3% (n=182) pacientu tika noteikts C reaktīvā proteīna (CRP) līmenis. CRP vidējā vērtība šiem pacientiem bija 22,2 mg/L (minimālā – 0,1 mg/L, maksimālā – 187,8 mg/L). Analizējot CRP vērtību sadalījumu pa intervāliem, redzams, ka 74,3% (n=139) pacientu CRP vērtība bijusi intervālā no 0 līdz 25,0 mg/L.
- 97,3% (n=182) pacientu bija noteikts kopējais leikocītu skaits, kura vidējā vērtība bija $12\,553 \times 10^6/L$, ar minimālo vērtību $1700 \times 10^6/L$ un maksimālo – $40\,030 \times 10^6/L$. Lielākajai daļai pacientu – 21,9% (n=41) leikocītu skaits svārstījās intervālā no 10 000 līdz $12\,500 \times 10^6/L$.
- 96,2% (n=180) fēču tika noteikts rotavīruss, un 29,4% (n=53) pacientu tas bija pozitīvs.
- 11,8% (n=22) pacientu fēcēs tika noteikti citu vīrusu antigēni, astoņiem pacientiem pierādīts norovīruss, vienam pacientam – adenovīruss.
- 94,1% (n=176) pacientu tika veikts fēču bakterioloģiskais uzņēmums. 86,6% (n=162) gadījumu fēču uzņēmums bija negatīvs, 6,4% (n=12) gadījumu tika izolēta *Salmonella enteritidis* un pa vienam gadījumam – *Salmonella typhimurium* un *Shigella sonnei*. trīs gadījumos tika novērota jaukta infekcija – no fēcēm izolēta *Salmonella enteritidis* – un pierādīts rota vīrusa antigēns. Kopumā 41,1 % (n=77) pacientu tika pierādīts kads no diareju izraisošajiem patogēniem.
- 3,7 % (n=7) pacientu tika veikta asins kultūrēšana. vienā gadījumā asins kultūra bija pozitīva – tika izolēts *Lactococcus lactis*.

4.1.5. Akūtas zarnu infekcijas riska faktoru izvērtējums

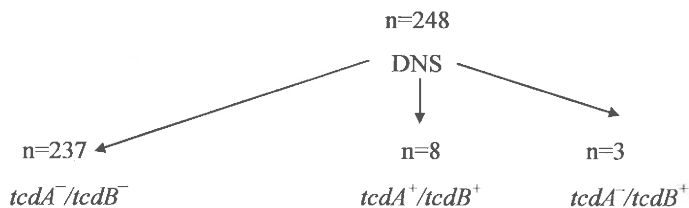
- 11,2% (n=21) bērnu anamnēzē bija iepriekšēja stacionēšana, savukārt 12,8% (n=24) pirms stacionēšanas BKUS bija saņēmuši antibakteriālo terapiju mājās. Vienam no pacientiem iepriekš bija stacionēti arī citi ģimenes locekļi. 36,4% (n=68) bērnu apmeklēja pirmsskolas iestādi vai skolu.
- Stacionāra etapā 82,9% (n=155) pacientu nesaņēma antibakteriālo terapiju, 10,7% (n=20) saņēma antibakteriālo terapiju ar vienu antibakteriālo līdzekli, 3,2% (n=6) terapijā tika izmantoti divi antibakteriālie līdzekļi, 2,1% (n=4) saņēma trīs antibakteriālos līdzekļus, savukārt piecus un sešus antibakteriālos līdzekļus saņēma attiecīgi pa vienam pacientam.

4.1.6. *C.difficile* prevalence stacionārā ārstētiem bērniem ar diarejas klīniku

No pacientu fēču paraugiem (n=248) tika izdalīta DNS, izmantojot PĶR gēla elektroforēzes metodi tika noteikta *C.difficile* toksinogēnu *tcdA/tcdB* klātbūtne.

C.difficile saistība ar citiem diagnosticētajiem izraisītājiem, demogrāfiskajiem datiem un klīniskajām diagnozēm:

- *C.difficile* A un B toksinogēni vienlaikus tika konstatēti 3,2% (n=8) pacientu, savukārt tikai *C.difficile* B toksinogēns konstatēts 1,2% (n=3) pacientu (Attēls 2).



Attēls 2. IZanalizēto paraugu skaits un pozitīvās atradnes sadalījums.

- Vienā gadījumā tika novērota vienlaicīga rotavīrusa antigēna pierādīšana un *C.difficile* A un B toksinogēnu klātbūtne, savukārt vienā gadījumā tika vienlaikus pierādīts rotavīruss un *C.difficile* B toksinogēna klātbūtne. Pārējiem deviņiem *C.difficile* pozitīvajiem pacientiem netika pierādīti citi zarnu infekciju ierosinātāji.
- Pacientu, kuriem tika konstatēti A un B toksinogēni, vidējais vecums – 31 mēnesis jeb 2 gadi un 7 mēneši. Stacionārā tie pavadījuši vidēji 2,6 gultasdienas. Tikai viens no šiem pacientiem pirms stacionēšanas saņēmis piecu dienu ilgu antibakteriālu terapiju ar amoksicilīnu un piecu dienu kursu ar cefadroksilu. Stacionāra etapā antibiotiku terapiju saņēma tikai viens pacients – vienu dienu terapiju ar ampicilīnu.
- deviņu pacientu klīniskā diagnoze bija akūts gastroenterīts, vienam pacientam tika uzstādīta diagnoze – akūts gastroenterokolīts, bet vienam bērnam tika atklāts infekciozās mononukleozes sindroms ar funkcionāliem gremošanas traucējumiem. Visi šie pacienti tika stacionēti vidēji smagā vispārējā stāvoklī.
- Pacientiem ar pozitīvu *C.difficile* laboratorisko atradni vidējais leikocītu skaits asinīs bija $14\,524 \times 10^6/L$ un vidējās CRP vērtības – 17,42 mg/L. Salīdzinot pacientu kopējo leikocītu skaitu un CRP vērtības, nebija statistiski ticamu atšķirību starp pacientu grupām ar pozitīviem *tcdA/tcdB* un pacientu grupu, kam tie bija negatīvi ($p > 0,05$)
- Analizējot *C.difficile tcdA/tcdB* pozitivitāti saistībā ar pacientu vecumu, bērnu iestādes apmeklēšanu, iepriekšējo stacionēšanu un citu ģimenes locekļu stacionēšanu, antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas, iestāšanās un klīnisko diagnozi, stāvokļa smagumu stacionējot, slimnīcā pavadītajām dienām, antibakteriālo terapiju stacionārā un tās ilgumu, kā arī izmantotajiem antibakteriālajiem preparātiem, Spīrmena rangu korelācijas analīzē netika novērotas statistiski ticamas sakarības ($p > 0,05$).
- Šajā pētījumā starp *C.difficile tcdA* un *tcdB* pastāv cieša saistība (korelācijas koeficients $r_s = 0,81$, $p < 0,01$).
-

4.2. Pieaugušo grupas analīze

4.2.1. P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas nodaļas diagnostikas metožu pilnveidošanās no 2005. līdz 2009. gadam

P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas laboratorijā izmantotās *C.difficile* atklāšanas metodes gadu laikā ir mainījušās, jo pilnveidojies laboratorisko diagnostikas metožu piedāvājuma klāsts, kas ļauj izvēlēties precīzāko un specifiskāko.

P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas nodaļā 2005. gadā *C.difficile* identifikācijai izmantoja *C.difficile* antigēna noteikšanas eksprestestu (Rapid pour *C.difficile*, Francija). Gada laikā ar šo testu tika atklāti 78 pozitīvi *C.difficile* paraugi. 2006. gada beigās antigēna noteikšanas tests tika aizstāts ar toksīna A noteikšanas eksprestestu (*C.difficile* toxin A test, Vācija).

Uzsākot pētījumu 2006. gada augustā, tika izvērtētas metožu priekšrocības, tāpēc tika veikta divu testu salīdzināšana. 50 secīgi fēcū paraugi, kuri tika nosūtīti uz laboratoriju ar aizdomām par *C.difficile* infekciju, tika analizēti, izmantojot divas metodes:

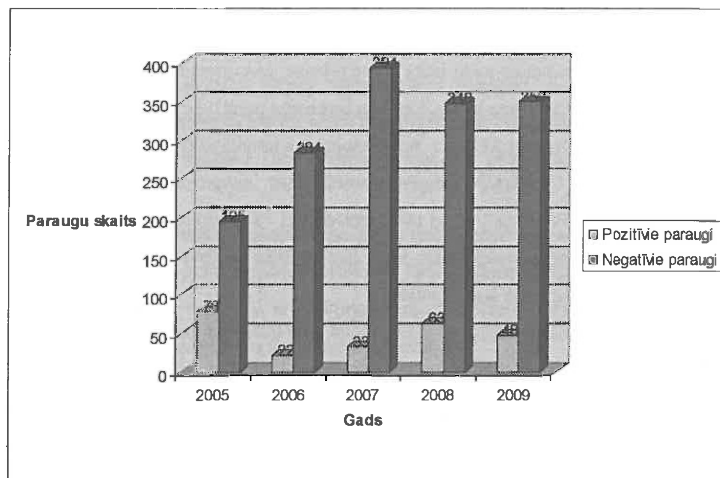
1. metode – eksprestests, Rapid pour *C.difficile*, ar kuru noteica *C.difficile* antigēnu slimnieka fēcēs;

2. metode – balstīta uz PĶR, ar kuru noteica *tcdA* un *tcdB*.

Rezultātā ar eksprestestu pret *C.difficile* 4 paraugos atklāja antigēnus, bet 3 paraugos toksinogēnus, pārējie paraugi bija negatīvi. Toksinogēnu atklāšana liecina par baktērijas klātbūtni organismā, un tā ir informatīvāka metode nekā antigēna atklāšana, kurš ir baktērijas darbības rezultātā radies produkts. PĶR ir augsta specifitāte, jo vienam paraugam, kurā tika atklāts antigēns, netika atklāti virulences faktori *tcdA* un *tcdB*.

2008. gadā tika ieviesta *C.difficile* tūrkultūras iegūšanas metode, kurā izmanto baktēriju kultivēšanu specifiskās barotnēs. Metode savu prioritāti saglabājusi līdz šim brīdim. Laika posmā no 2005. līdz 2009. gadam *C.difficile* noteikšanas paņēmieni klāstā ir nomainījušies vairāki testi un pilnveidojušies esošie. Pozitīvo atbilžu skaits ir cieši saistīts ar testa principu, to var novērot periodā starp 2005. un 2006. gadu, kad, antigēna noteikšanas eksprestestu aizstājot ar toksīnu A noteikšanas testu, krasī samazinājās pozitīvo atbilžu skaits, no 78 – 2005. gadā uz 22 – 2006. gadā. Savukārt,

ieviešot kultūru testu un PĶR testu, pozitīvo atbilžu skaits kļuva lielāks. Attēlā 3 ir redzama pozitīvo atbilžu skaita dinamika P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas laboratorijā no 2005. līdz 2009. gadam.



Attēls 3. Pozitīvo un negatīvo atbilžu attiecība no 2005. līdz 2009. gadam

Uzsākot pētījumu 2006. gada augustā, P. Stradiņa KUS CL mikrobioloģijas dati un materiāls kļuva par pamatu tālākiem *C.difficile* molekulāri epidemioloģiskajiem izmeklējumiem.

4.2.2. *C.difficile* infekcijas slimnieku demogrāfisko datu analīze

- Stacionēto slimnieku sadalījums: sievietes 58,5% (n=103), vīrieši 41,1% (n=72).
- Vidējais slimnieka vecums – 60,12 gadi, minimālais vecums – 20, maksimālais – 90 gadi.
- Pacientu minimālais atrašanās laiks stacionārā 2, maksimālais – 90 dienas.

- 162 pacientiem ārstēšanās stacionārā noslēgusies ar izrakstīšanos, miruši 12 pacienti.

4.2.3. *C.difficile* infekcijas slimnieku prevalence P. Stradiņa KUS nodaļās

Rezultāti balstās uz anketu datu analīzi, kuri apstrādāti EpiInfo programmā. Laika posmā no 2006. gada augusta līdz 2009. gada beigām pētījumā tika iekļauti 175 slimnieki, kuriem tika laboratoriski pierādīta *C.difficile* infekcija.

Pacientu relatīvajā sadalījumā pēc nodaļas profila atklājās, ka *C.difficile* kā CDAD izsauceja tika pierādīta 43% nefroloģijas nodaļas slimnieku.

4.2.4. *C.difficile* infekcijas slimnieku iespējamo riska faktoru izvērtējums

- Iepriekšēja hospitalizācija bija 47,4% (n=83) slimnieku.
- Ambulatori antibiotikas bija lietojuši 9,1% (n=16) slimnieku.
- Gastrointestinālā trakta manipulācijas pirms infekcijas uzliesmojuma bija veiktas 16,6% slimnieku (n=29).
- 4,6% slimnieku (n=8) *C.difficile* infekcija bija jau anamnēzē.
- Antacīdos līdzekļus pirms infekcijas attīstības bija lietojuši 35,4% slimnieku (n=62).
- Kā cita riska faktori tika klasificēta ķīmijterapija n=1, imūnsupresija n=6, peritoneālā dialīze n=12, hemodialīze n=3, hroniska kuņģa čūla n=1, ileuss n=1.
- 154 no 175 anketētajiem pacientiem stacionārā pirms paraugu ņaņemšanas uz *C.difficile* infekciju tika izmantota antibakteriālā terapija. Pirms CDAD simptomu parādīšanās 30,8% slimnieku (n=54) tika izmantota antibakteriālā terapija ar vienu vai vairākām antibiotikām.

- Stacionārā ārstēšanā visbiežāk izmantoja ciprofloksacīnu (n=74). Ciprofloksacīns ir hinolons, kas ir iedarbīgs *in vitro* pret lielu skaitu gramnegatīvu aerobo baktēriju, kā arī pret dažiem grampozitīviem organismiem.

4.2.5. *C.difficile* infekcijas slimnieku klīnisko simptomu prezentācija

Klīnisko simptomu analīze:

- drudzis, kas vidēji ilga 5 dienas novēroja 56,6% gadījumu (n=99).
 - galvenais simptoms šai infekcijai ir diareja, un to novēroja 93,1% slimnieku (n=163), PMK diagnoze tika pierādīta 8,6% gadījumu (n=15), bet TM diagnoze – 0,6% gadījumu (n=2).
- 9,7% gadījumu (n=17) tika novēroti arī citi simptomi, piemēram, sāpes vēderā, intoksikācija, slikta dūša un vemšana.

4.2.6. CDAD slimnieku stacionārā pavadīto gultasdienu analīze

P. Stradiņa KUS stacionārā ārstēto pacientu skaits gadā ir aptuveni 48 000 un vidēji slimnīcā tiek pavadītas 5 gultasdienas, kas ir divas reizes mazāk nekā vidēji Latvijā. CDAD slimnieks stacionārā vidēji pavada 26 gultasdienas, kas ir 4 reizes vairāk par vidējo P. Stradiņa KUS. Tas apliecina, ka CDAD slimnieks pieder smagu saslimšanu un grūti ārstējamu pacientu kategorijai.

4.2.7. *C.difficile* infekcijas slimniekiem izmantotās terapijas analīze

- Saņemot pozitīvu rezultātu uz *C.difficile* infekciju, iepriekšējā terapija tika apturēta 15,5% gadījumu (n=27), izmainīta 35,4% (n=62) gadījumos un atstāta nemainīga iepriekšējā terapija 49,1% (n=86) gadījumu.

- 97 gadījumos, saņemot pozitīvu rezultātu uz *C.difficile*, terapijā tika nozīmēts metronidazols 61,8% (n=97) un 18,5% (n=29) gadījumos vankomicīns.
- Zāļu ievades veids – perorāli – bija 7,6% slimnieku (n=12), intramuskulāri 74,5% (n=117) un intravenozi 17,8% slimnieku (n=28).
- Probiotikas ārstēšanā izmantoja 35,4% gadījumu (n=62). Tika lietotas gan jogurta kapsulas, gan enterols, gan acidofilās baktērijas, gan lineks.

4.2.8. Slimnieku, kuriem attīstījās *C.difficile* reinfekcija, analīze

- Pieciem slimniekiem *C.difficile* tika atklāta katrā stacionēšanas reizē vairāku mēnešu garumā.
- Visi slimnieki bija ar smagām nieru sasilšanām un stacionārā uzturējās bieži un ilgi.
- Divi slimnieki pēdējā stacionēšanas reizē miruši.

4.2.9. Vankomicīna rezistences gēnu analīze

Laika periodā no 2006. gada līdz 2009. gada beigām, aizpildot ankešu datu daļu par P.Stradiņa KUS stacionārā izmantoto *C.difficile* infekcijas ārstēšanu, atklājās ka 8 slimniekiem no 175 slimniekiem ar pierādītu *Clostridium difficile* asociēto diareju (CDAD) ārstēšanas nolūkam tika nomainīta terapija no vankomicīna uz metronidazolu. Šāda ārstēšanas taktikas maiņa lika domāt par to, ka tā ir vērsta pret *C.difficile* vankomicīna rezistentiem celmiem. No astoņiem slimniekiem, DNS materiāls bija pieejams sešiem slimniekiem. Pieciem paraugiem konstatēja kādu no van gēniem - 1. paraugam *vanA*, *vanB*, *vanE*, *vanD* un *vanG*; 2. paraugam *vanE*; 3, 4 un 5. paraugam *vanA*.

Izmeklējot *C.difficile* paraugus ar specifiskiem praimeriem *ddlE* uz enteroku gēniem, atklājās, ka sešos klostrīdiju pozitīvajos paraugos ir enterokokiem - *E.faecalis* un *E.faecium* raksturīgie gēni. Tas norāda, visticamāk, ka vankomicīna rezistences gēni pieder enterokokiem, nevis klostrīdijām. Literatūrā ir dati par to, ka bieži *C. difficile* ir grūti identificēt fenotipiski, tāpēc jāveic genotipiska izpēte.

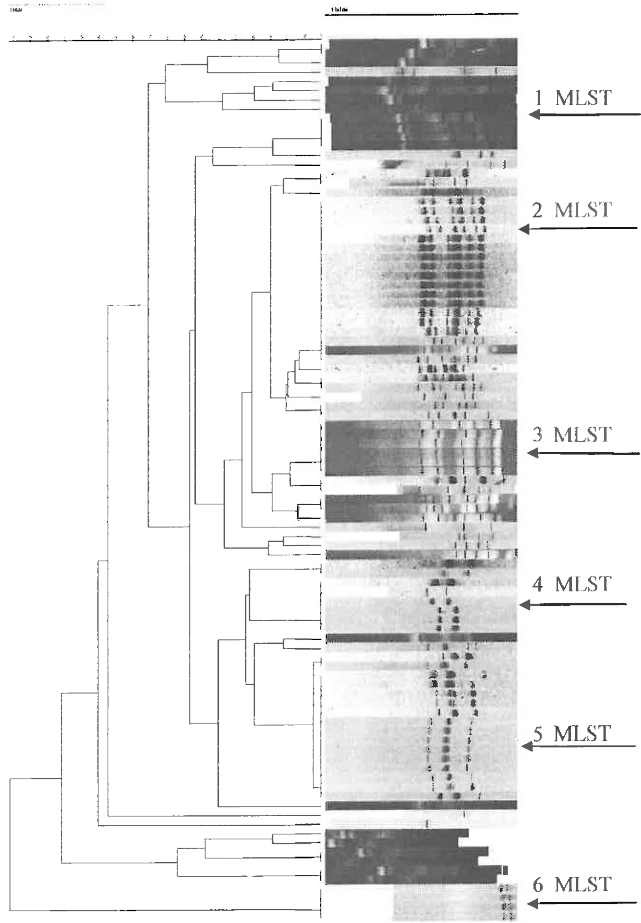
Produktus sekvenējot un iegūtos rezultātus salīdzinot ar NCBI datu bāzē esošajām sekvencēm, konstatējām, ka visas gēnu sekences atbilst *E.faecalis*.

4.2.10. *C.difficile* celmu filoģenētiskā analīze

Vadoties pēc PQR un mikrobioloģiskajiem izmeklējumiem, pētījumā tika iekļauti 95 toksinogēnie *C.difficile* celmi. Tiem tika noteikts ribosomālo gēnu izvietojums noteiktā celmā.

Baktēriju elektroforēzes rezultāti tika ievadīti BioNumerics programmā, kurā izveidots ribotipu filoģenētiskais koks, ietverot šādus etapus:

1. Katra parauga elektroforēzes dati, izvēloties programmā rīkjoslu „Strips”, tiek atdalīti ar joslām.
2. Automātiskā fragmentu meklēšanas rīkjoslā „Bend” visu paraugu marķētie fragmenti tiek automātiski iezīmēti ar zaļu krāsu.
3. Katram elektroforēzes paraugam tiek pevienoti par slimnieku zināmie dati.
4. Elektroforēzes dati tiek savietoti kokā, apvienojot vienādos ribotipus. Savukārt līdzīgie ribotipi ar līniju palīdzību tiek savienoti radniecīgos ribotipos, izveidojot filoģenētisko koku (Attēls 4).



Attēls 4. *C. difficile* celmu filogenētiskais koks.

Latvijā atkāti 39 ribotipi, kuros apvienojas 95 *C.difficile* celmi. Iezīmējas 6 galvenās ribotipu grupas, kur vislielākā grupa apvieno 18 celmus. Šai ribotipu grupai ir dots kods LV13. Ribotipu nosaukumi ir izveidoti pēc kārtas, skaitļa priekšā liekot LV – Latvijas valsts.

4.2.11. MLST analīze

MLST analīzei no ribotipu filoģenētiskā koka lielākajiem zariem tika izvēlēti seši celmi. Attēlā 4 izvēlētie celmi norādīti ar bultiņām un ciparu 1 MLST līdz 6 MLST.

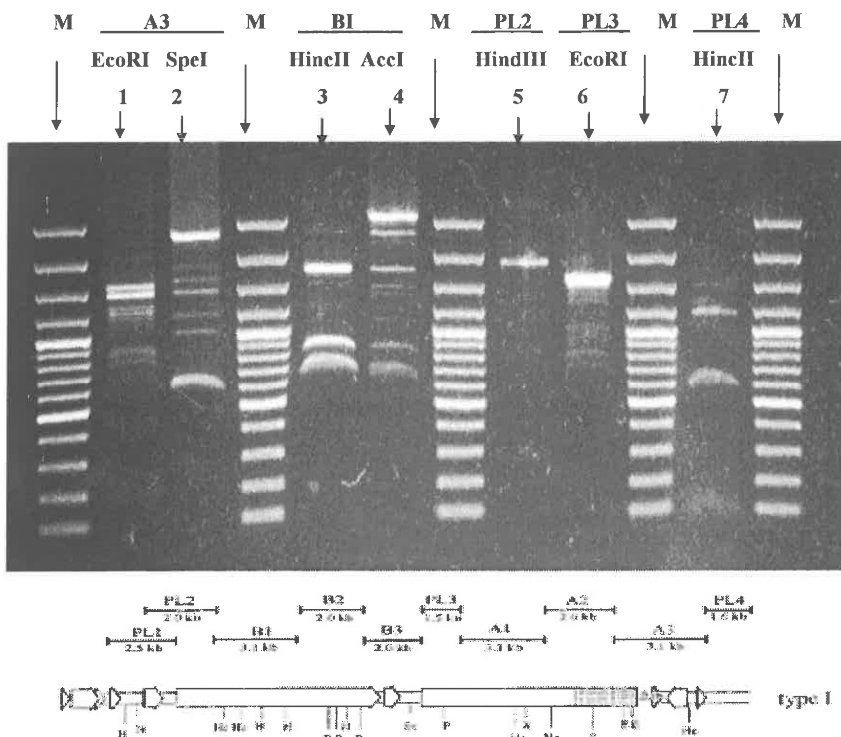
C.difficile MLST shēmā lieto septiņus mājturības gēnus: *aroE* (shikimate dehydrogenase), *ddl* (D-alanine:D-alanine ligase), *dutA* (dUTP pyrophosphatase), *gmK* (gualynate kinase), *recA* (recombinase), *sodA* (superoxide dismutase), *tpi* (triosephosphate isomerase). Katrs lokuss tiek amplificēts ar PĶR, izmantojot šiem gēniem atbilstošus praimeru pārus, kuri piesaistās konservatīvajam gēnu reģionam. Rezultātā, iegūtos datus ievadot www.pasteur.fr MLST sekvenču datubāzes shēmā, no 7 gēniem iegūstam, ka visiem sešiem paraugiem ir identiska allēļu kombinācija un tie pieder vienam sekvenču tipam – ST-3 (Tabula 1).

Tabula 1. *C.difficile* MLST rezultāti.

Paraugs	<i>aroE</i>	<i>ddl</i>	<i>dutA</i>	<i>gmK</i>	<i>recA</i>	<i>sodA</i>	<i>spi</i>	ST
140	2	2	2	1	1	5	1	3
107	2	2	2	1	1	5	1	3
177	2	2	2	1	1	5	1	3
189	2	2	2	1	1	5	1	3
190	2	2	2	1	1	5	1	3
192	2	2	2	1	1	5	1	3

4.2.12. Toksinotipu variāciju analīze

No ribotipēšanas rezultātā iegūtā filoģenētiskā koka pretējo zaru lielākām grupām selektīvi izvēlētam sešām kultūrām tika veikta genoma fragmentu PL1, PL2, PL3, PL4, A3 un B1 amplifikācija un restrikcija ar specifiskiem prameru pāriem un gēla elektroforēzi. Attēlā 5 redzams toksinotipēšanas elektroforēzes piemērs vienam paraugam.



Attēls 5. M – marķieris, 1 – 7 genoma fragmenti pēc restrikcijas ar attiecīgo restriktazi, A3, BI, PL2, PL3, PL4 – genomu fragmenti, EcoRI, SpeI, HincII, AccI, HindIII – restriktazes.

Salīdzinot gēla elektroforēzes datus ar literatūrā pieejamajiem rezultātiem, iegūstam vienu raksturīgo genoma PaLoc ainu, kas atbilst pirmajam toksinotipam. Raksturīgajā genomā ir A3 fragmenta delēcija, kas atbilst I toksinotipam (TT-1).

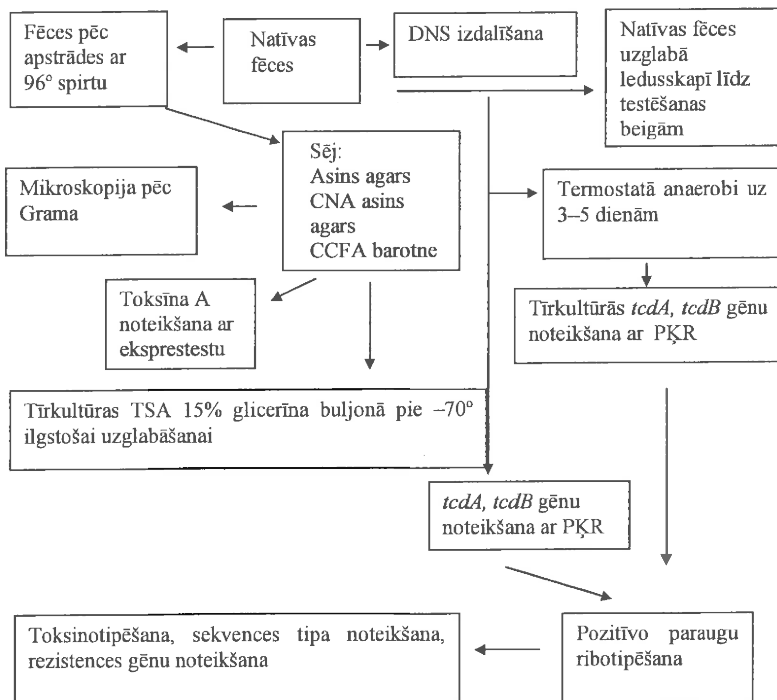
5. Vadlīnijas *C.difficile* testēšanai

Materiāla savākšanas noteikumi stacionārā un nogādāšanas noteikumi laboratorijā *Clostridium difficile* identifikācijai

1. Materiāls – slimnīca fēces, kuram ir aizdomas par *C.difficile* izraisītu diareju.
2. Materiāla nogādāšanas laiks laboratorijā – 1 stundu pēc savākšanas vai nedēļas laikā, materiālu uzglabājot pie temperatūras +4 C.
3. Materiāla nogādes forma laboratorijā – trauciņā ar brūno vāciņu un karotīti 400 mg, divas pilnas karotītes.
4. Uz trauciņa jābūt pacienta identifikācijas kodam.

C.difficile mikrobioloģiskās un molekulāri bioloģiskās izmeklēšanas algoritms

Algoritms izstrādāts, pamatojoties uz darba gaitā izveidotajām laboratoriskajām diagnostikas metodēm, un pielāgots P. Stradiņa KUS CL Mikrobioloģijas un Molekulārās bioloģijas un ģenētikas nodaļas iespējām.



Attēls 6. *C.difficile* mikrobioloģiskās un molekulāri bioloģiskās izmeklēšanas algoritms.

6. Diskusija

C.difficile ir galvenais cēlonis hospitālo diareju attīstībā ASV un citās industriālajās valstīs. Katru gadu *C.difficile* infekcija rada apmēram 3 miljonus diarejas un kolīta gadījumus ASV, kā rezultātā ik gadu veselības aprūpes sistēmā ārstēšanai papildus tiek tērēts vairāk nekā miljards ASV dolāru. PMK gadījumā mirstība svārstās no 6% līdz 30%. Lielbritānijā laika periodā no 2000. līdz 2007. gadam ar *C.difficile* saistīto saslimšanu skaits ir pieaudzis no 15 081 līdz 42 901. *C.difficile* izraisītā diareja tiek konstatēta 1 līdz 10 gadījumos uz katriem 1000 uzņemtajiem pacientiem, palielinot mirstības rādītājus un ārstēšanas izmaksas. Šo pacientu hospitalizācija no 18 dienām vidēji pagarinājusies līdz 30 dienām, un katra šīs slimības epizode izmaksā papildus 4101 mārciņu, kā aprēķinājuši Lielbritānijas zinātnieki, un 3340 dolārus, kā aprēķinājuši ASV zinātnieki.

Kopš 2002. gada īpašu uzmanību saista *C.difficile* hipervirulentais celma III toksinotips, 027 ribotips, tas ir multirezistents ciprofoksacīna, metronidazola celms, kas sākotnēji izplatījās ASV un Kanādā, bet tagad jau ir izraisījis hospitālos uzliesmojumus Lielbritānijā, Beļģijā, Francijā, Austrijā, Īrijā, Vācijā, Nīderlandē, Japānā. Pacienti, kuri inficēti ar 027 ribotipa *C.difficile*, slimnīcā bija spiesti uzturēties vidēji par 10,7 dienām ilgāk, un mortalitāte to vidū bija ievērojami augstāka. Zviedrijā laika posmā no 1997. līdz 2002. gadam PQR ribotips 027 veidoja 0,2% no visiem izolātiem, un šis tips ražoja 3 – 13 reizi vairāk toksīna nekā citi tipi. Ir pierādīts, ka in vitro baktērijas hipervirulentais celma III toksinotips, 027 ribotips ražo vairāk toksīna nekā citi ribotipu celmi, bet, vai tas atbilst in vivo ainai, vēl nav noskaidrots.

Latvijā šis multirezistentais celms nav radījis infekcijas uzliesmojumus stacionārā un situācija tiek kontrolēta ar infekcijas slimību kontroles pasākumiem. Ir jāņem vērā arī citu ribotipu hipertoksigenitāte, jo ir aprakstīti gadījumi, kad ribotips 01 ir galvenais uzliesmojuma cēlonis Kalifornijā un Japānā.

Pētījumā tika analizēti dati par *C.difficile* lomu diarejas attīstībā bērniem, kas stacionāri BKUS no 2007. gada oktobra līdz 2008. gada martam. *C.difficile* A un B toksinogēni vienlaikus tika konstatēti 3,2% (n=8) pacientu, savukārt tikai *C.difficile* B toksinogēns konstatēts 1,2% (n=3) pacientu. Šie dati atšķiras no literatūrā norādītajiem datiem par *C.difficile* diarejas biežumu stacionāros, kas, iespējams, saistīts

ar atšķirīgo pētījuma populāciju; tiek uzskatīts, ka 80% no visiem *C.difficile* diareju gadījumiem sastopami vecuma grupā virs 65 gadiem.

Pētot bērnu populāciju, bija bērni, kuriem konstatēja toksinogēno *C.difficile*, bet, konsultējoties ar viņu ārstējošajiem ārstiem, tika noskaidrots, ka klīniskajā ainā dominē viegla diareja, kas tiek ārstēta simptomātiski un neprasa redikālāku terapiju. Svarīgi ir arī tas, ka bērniem atrod tikai toksinogēnu B, bet nav toksinogēna A. Ņemot vērā iepriekšējos zinātniskos pētījumus, gūts apstiprinājums, ka toksīns B rada sarežģījumus tikai sinerģiski sadarbojoties ar toksīnu A, bet, ja netiek producēts toksīns A, tad tas izskaidro, kādēļ bērniem nav raksturīgās *C.difficile* infekcijas ainas. Pēc literatūras datiem ir zināms, ka bērni līdz divu gadu vecumam var būt *C.difficile* nēsātāji.

Pacientu ar pozitīvu *C.difficile* A un B toksinogēnu atradni vidējais vecums bija 31 mēnesis, tādēļ šī pētījuma dati atšķiras no citu autoru pētījuma, kurā tika pierādīts pozitīvs *C.difficile* B toksīns bērniem, kuru vidējais vecums bija 18 mēneši.

Literatūrā CDAD izpausmes tiek aprakstītas kā ļoti variablas, sākot no vidēji smagas līdz smagai diarejai ar nogurumu, sāpēm vēderā, nelabu dūšu un vemšanu. Pēc mūsu pētījuma rezultātiem grūti izteikties par CDAD klīniku. *C.difficile* pacientu grupa ir neliela un jādodomā, ka šie pacienti ir stacionēti ar citu akūtas zarnu infekcijas klīniku, savukārt pierādītā *C.difficile*, iespējams, uzskatāma par normālas mikrofloras pārstāvi. Paraklīniskajos rādītājos par *C.difficile* infekciju varētu liecināt leukocitoze. Bouza un līdzautori min, ka leukocitoze augstāka par 15 000 ir papildus pazīme *C.difficile* infekcijai. Pētījuma pacientu vidū, kam tika pierādīti pozitīvi *C.difficile* A un B toksinogēni, vidējais leukocītu skaits bija $14\,524 \times 10^6/L$, un, izmantojot Spīrmena rangu korelācijas analīzi, netika pierādīta statistiski ticama saistība starp kopējo leukocītu skaitu un *C.difficile* toksīnu pozitivitāti ($p>0,05$).

Par vienu no svarīgākajiem riska faktoriem *C.difficile* infekcijai tiek uzskatīta antibakteriālā terapija arī bērnu populācijai. Pētījumā bērnu grupā, kam bija pozitīvi *C.difficile* toksinogēni, tikai vienam pacientam no vienpadsmit pirms stacionēšanas bija saņēmis antibakteriālu terapiju, savukārt antibakteriālā terapija stacionārā tika nozīmēta tikai vienam pacientam. Analizējot saistību starp *C.difficile* toksīnu pozitivitāti un antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas ar Spīrmena rangu korelāciju analīzes metodi, netika iegūta statistiski ticama saistība ($p>0,05$). Poļu autoru grupas pētījumā, analizējot *C.difficile* toksīna A pozitivitāti bērniem ar akūtu diareju, arī netika atklāta saistība starp iepriekšējo antibakteriālo terapiju un pierādītiem *C.difficile* toksīniem.

Analizējot šajā pētījumā iegūtos rezultātus, nevar izdarīt viennozīmīgus secinājumus par *C.difficile* diarejas sastopamību bērniem. Izvērtējot *C.difficile* A un B toksinogēnu sastopamību bērniem, jāņem vērā arī asimptomātiskas nēsāšanas iespēja, kas visbiežāk 40 – 60% gadījumu sastopama zīdaiņa vecumā. Tā samazinās pēc pirmā dzīves gada, bet ir iespējama arī pieaugušā vecumā – tās biežums atšķiras dažādu autoru pētījumos, sākot no 2% Zviedrijā līdz 15% Japānā.

Analizējot pieaugušo slimnieku datus ar eksprestestu, *C.difficile* antigēnus atklāja četros paraugos un toksinogēnus – trīs paraugos, pārējie paraugi bija negatīvi. Toksinogēnu atklāšana liecina par baktērijas klātbūtni organismā un ir informatīvāka metode nekā antigēna atklāšana, kurš ir baktērijas darbības rezultātā radies produkts un kura produkcija saglabājas vēl pēc gēnu eliminācijas no organisma.

Vidējais slimnieka vecums bija 60,12 gadi, minimālais – 20, bet maksimālais – 90 gadi. *Lowy et al* (2010) pētījumā vecākais slimnieks bija 101 gadu vecs, bet vidējais vecums – 64 gadi.

Literatūrā aprakstītie CDAD riska faktori tika iekļauti izvērtēšanā kā iespējamie riska faktori pētāmās pieaugušo grupas slimniekiem. Analīze rāda: iepriekšējā hospitalizācija bija 47,4% (n=83) slimnieku. Ambulatori antibiotikas bija lietojuši 9,1% (n=16) slimnieku. Gastrointestinālā trakta manipulācijas pirms infekcijas uzliesmojuma bija veiktas 16,6% slimnieku (n=29). 4,6% slimnieku (n=8) *C.difficile* infekcija bija jau anamnēzē. Antacīdos līdzekļus pirms infekcijas attīstības lietoja 35,4% (n=62) slimnieku (n=113). Kā citi iespējamie riska faktori tika klasificēti ķīmijterapija n=1, imūnsupresija n=6, peritoneālā dialīze n=12, hemodialīze n=3, hroniska kuņģa čūla n=1, ileuss n=1. 154 no 175 anketētajiem pacientiem pirms paraugu ņemšanas uz *C.difficile* infekciju stacionārā tika izmantota antibakteriālā terapija. Pirms CDAD simptomu parādīšanās 30,8% slimnieku (n=54) tika izmantota antibakteriālā terapija ar vienu vai vairākām antibiotikām. Stacionārā ārstēšanā visbiežāk izmantoja ciprofloksacīnu (n=74). Ciprofloksacīns ir hinolons, kas ir iedarbīgs *in vitro* pret lielu skaitu gramnegatīvu aerobo baktēriju, kā arī pret dažiem grampozitīviem organismiem. Ciprofloksacīnam raksturīga strauja baktericīda iedarbība, inhibējot DNS girāzi, kā rezultātā notiek DNS sintēzes inhibēšana. Ciprofloksacīns pēc iekšējās ievadīšanas tiek ātri un efektīvi absorbēts. Starp devu un koncentrāciju plazmā ir lineāra korelācija. Pacientiem ar sarežģītām urīnceļu infekcijām (UCI) pašlaik izmanto empīrisku ārstēšanu ar plaša spektra antibiotiku (fluorhinolonu) un potenciālu tālāko 10 – 14 dienu

ilgu ārstēšanu, vadoties no urīna kultūras un jutības. Lai izvairītos no neveiksmes ārstēšanā un rezistences parādīšanās, priekšnoteikums ir adekvāta pacienta reakcija un dozēšana. Arī medicīniskā literatūra apliecina, ka *C.difficile* pacients ir cilvēks gados ar smagām pamatslimībām un variablu lietoto medikamentu klāstu ārstēšanā [Kuijper *et al.*, 2006]. O'Connor *et al* (2004) Minsteres reģionā, geriatrijas klīnikā no 1992. līdz 2002. gadam veica pētījumu un pierādīja, ka intravenoza cefalosporīnu lietošana ir vislielākais risks CDAD attīstībā veciem cilvēkiem, tāpēc ieteica izmainīt antibakteriālās terapijas politiku jau sākumā. Autors pneimoniju un glomerulonefrītu ārstēšanā ieteica lietot piperacilīnu – tazobaktāmu intravenozi vai moksifloksacīnu – perorāli.

Pētījumā iekļauto pacientu minimālais atrašanās laiks stacionārā divas dienas, maksimālais 90 dienas. Barbut *et al.*, 1996. gadā atzīmēja, ka stacionēšana ilgāka par vienu nedēļu ir viens no galvenajiem CDAD infekcijas attīstības cēloņiem. Vajadzētu samazināt vidējo stacionēšanas laiku arī P. Stradiņa KUS nodaļās. Jo ilgāk slimnieks ir slimnīcas vidē, jo pieaug risks inficēties ar *C.difficile* sporām. Jāievēro arī inficēto slimnieku izolācijas princips, jo iespējamība inficēties slimniekam no slimnieka ir ļoti liela. P. Stradiņa KUS nefroloģijas nodaļā pētījuma laikā atklāja visvairāk *C.difficile* slimnieku. Šajā nodaļā ievēro visus higiēnas un slimnieku izolēšanas principus, un infekcijas uzliesmojumi netika atklāti, bet visi gadījumi bija individuāli. *C.difficile*, iespējams, ir lielāka izplatības prevalence arī citās nodaļās, bet analīzi pieprasa reti un diagnoze paslīd garām. Barbut *et al.*, 1996. gadā atzīmē, ka Francijas slimnīcās izmeklējums uz *C.difficile* tiek pieprasīts reti un, pēc autora uzskatiem, tas ir saistīts ar personāla zināšanu trūkumu par šo infekciju.

Analizējot klīnisko simptomu - drudzī, kurš vidēji ilga piecas dienas, to novēroja 56,6% gadījumu (n=99). Galvenais simptoms šai infekcijai ir diareja, un to novēroja 93,1% slimnieku (n=163). Tika novēroti arī citi simptomi: sāpes vēderā, intoksikācija, slikta dūša un vemšana. Visi simptomi ir raksturīgi zarnu infekcijai, tāpēc svarīgi klīnisko simptomātiku izvērtēt kopā ar laboratoriskajām diagnostikas metodēm. Bartlett *et al.*, 1992. gadā atzīmē, ka 20% no hospitalizētajiem pacientiem *C.difficile* infekciju iegūst stacionārā un 30% no tiem attīstās diareja.

Saņemot pozitīvu rezultātu uz *C.difficile* infekciju, iepriekšējā terapija tika apturēta 15,5% gadījumu (n=27), izmainīta 35,4% (n=62) gadījumu, bet saglabāta iepriekšējā terapija 49,1% (n=86) gadījumu. 97 gadījumos, saņemot pozitīvu rezultātu

uz *C.difficile*, terapijā tika nozīmēts metronidazols 61,8% (n=97) un 18,5% (n=29) gadījumu – vankomicīns. Zāļu ievades veids – perorāli – bija 7,6% slimnieku (n=12), intramuskulāri 74,5% slimnieku (n=117) un intravenozi 17,8% (n=28).

Probiotikas ārstēšanā izmantoja 35,4% gadījumu (n=62). Tika lietotas gan jogurta kapsulas, gan enterols, gan acidofīlās baktērijas, gan līnēks. Mūsdienās *C.difficile* baktērija ir rezistenta pret visām antibiotikām, izņemot metronidazolu un vankomicīnu, bet, tā kā tās genoms ir spējīgs ātri uzkrāt mutācijas un mainīties, nav izslēgta iespēja, ka tā kļūs rezistenta arī pret šīm antibiotikām.

Pētījumā seši *C.difficile* paraugi tika testēti ar enterokoku specifiskiem *van* rezistenci kodējošiem praimeriem, un piecos *C.difficile* paraugos atklāja šos gēnus. Izmeklējot *C.difficile* paraugus ar specifiskiem praimeriem uz enteroku gēniem, atklājās, ka sešos klostrīdiju pozitīvajos paraugos ir enterokokiem – *E.faecalis* un *E.faecium* raksturīgie rezistences gēni. Šī pētījuma rezultāts apliecina to, ka pašlaik Latvijas stacionāros nav izplatīti vankomicīna rezistenti *C.difficile* celmi. Literatūras dati liecina, ka pasaulē arī nav vēl pierādīti *C.difficile* rezistenti celmi pret vankomicīnu un rezistence pret metronidazolu ir reti sastopama [Ciaran *et al.*, 2008]. Pētījumā Vācijas klīnikā no 164 *C.difficile* pozitīvajiem fēču paraugiem 17 paraugos atklāja vankomicīna rezistentu enterokoku gēnus. Tā kā enterokokiem ir plazmīdas, kas spēj nodot rezistences gēnus gan stafilokokiem, gan klostrīdijām, pastāv iespēja, ka gēnu pārvades rezultātā var rasties arī vankomicīna rezistenti klostrīdiju kloni.

Latvijā atklāti 39 *C.difficile* ribotipu cemi ar vienu raksturīgo ST. Iezīmējas 6 galvenās ribotipu grupas, kur vislielākā grupa apvieno 18 celmus, šai ribotipu grupai ir dots kods LV 13. Ribotipu nosaukumi ir izveidoti pēc kārtas skaitļa priekšā liekot LV – Latvijas valsts. Arī pasaulē ribotipu nosaukumi katrā laboratorijā tiek piešķirti pēc saviem principiem, jo uz ribotipēšanu nevar attiecināt vienotu standartizāciju visām laboratorijām. Uz 2010. gada 1. janvāri www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdlent.plfile=Cdifficile2_isolates ir apkopojusi 57 ribotipus, ietverot arī ribotipu nediferencētos celmus un ST. Latvijā izplatīts ST-3, kas pasaules mērogā pēc izplatības ieņem 6 vietu. No vienpadsmit zināmajiem toksinotipiem 0 toksinotips ir visizplatītākais. Latvijā atklātais TT-1 www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdlent.plfile=Cdifficile2_isolates datubāzē reģistrēts vienā gadījumā.

7. Secinājumi

1. Latvijā atklāti 39 dažādi *C.difficile* ribotipi, kuros apvienoti 95 *C.difficile* celmi.
2. Latvijas reģionam raksturīgs baktērijas trešais sekvenču tips (ST-3) un pirmais toksinotips (TT-1).
3. Pacientiem ar apstiprinātu *C.difficile* infekciju, DNS paraugi satur enterokokiem raksturīgos vankomicīna rezistences gēnus. Latvijā pagaidām nav atklāti vankomicīna rezistentie *C.difficile* celmi.
4. *C.difficile* diagnostikas algoritms apvieno jaunākās metodes, kuras ir aprobētas laboratorijas apstākļos.
5. *C.difficile* infekcijas attīstās slimniekiem uz smagi noritošu, hronisku slimību fona, kuri saņem florhinolonu vai cefalosporīnu grupas antibiotikas.
6. Bērnu vecuma grupā *C.difficile tcdA/tcdB* pozitivitātei saistībā ar pacientu vecumu, bērnu iestādes apmeklēšanu, iepriekšējo stacionēšanu, antibakteriālo terapiju pirms stacionēšanas, iestāšanās un klīnisko diagnozi, stāvokļa smagumu stacionējot, slimnīcā pavadītajām dienām, antibakteriālo terapiju stacionārā un tās ilgumu, kā arī izmantotajiem antibakteriālajiem preparātiem pēc Spirmena rangu korelācijas analīzes nenovēro statistiski ticamas sakarības ($p>0,05$), tāpēc bērnus uzskata par *C.difficile* baktērijas nēsātājiem.
7. Kriobankas izveide nodrošina *C.difficile* celmu tīrkultūru un DNS kolekciju Latvijā.

8. Konferenču tēzes un prezentācijas par pētījuma tēmu

1. K. Aksenoka, A. Balode, U. Dumpis, D. Gardovska, E. Miklaševičs. *C.difficile* izraisītās disbakteriozes aģenta noteikšana ar PĶR un eksprestestu, rezultātu interpretācija // 2007; RSU 6. zinātniskās konferences tēzes, 151 lpp.
2. Aksenoka K, Goonewardene S, Pujate, Miklasevics E, Dumpis U. Surveillance of *C.difficile* infection in Latvian multidisciplinary teaching hospital // 2008; 18th European congress of clinical microbiology and infectious diseases (ECMID), Abstract-P1485.
3. K. Aksenoka, I. Grope, D. Gardovska, E. Miklaševičs. *Clostridium difficile* prevalence bērniem ar diarejas klīniku // 2008; RSU 7. zinātniskās konferences tēzes, 129 lpp.
4. K. Aksenoka, A. Balode, D. Gardovska, U. Dumpis, E. Miklaševičs, *Clostridium difficile* molekulārā tipēšana // 2009; RSU 8. zinātniskās konferences tēzes, 127 lpp.
5. K. Aksenoka, A. Balode, I. Grope, D. Gardovska, E. Miklaševičs. *Clostridium difficile* Latvijas izolātu patogenitātes lokusa analīze // 2010; RSU 9. zinātniskās konferences tēzes, 179 lpp.
6. K. Aksenoka. *Clostridium difficile* Latvijas slimnīcās // 2010, 17. novembrī. Konference „Slimnīcā iegūto infekciju un antibiotiku patēriņa aktualitātes Latvijā”.
7. K. Aksenoka. Promocijas darba aprobācija RSU Pediatrijas katedras, RSU Infektoloģijas un dermatoloģijas katedras un RSU Pārmantotā vēža institūta apvienotajā sēdē, 22.09.2010.

9. Publikācijas par pētījuma tēmu

1. D. Gardovska, L. Eihvalde, I. Grope K. Aksenoka, E. Miklaševičs. *Clostridium difficile* prevalence stacionārā ārstētiem bērniem ar diareju // *RSU Zinātniskie raksti 2008*, 2008; 205–211.
2. Aksenoka K, Balode A, Grope I, Obidenova T, Gardovska D, Miklasevics E. *Clostridium difficile* Associated Disease Clinical and Molecular Data // *Acta Chirurgica Latviensis 2009*, 2009; 9:56–61.
3. K.Aksenoka, A.Balode, I.Grope, D.Gardovska, E.Miklaševičs. *Clostridium difficile* Latvijas izolātu molekulārā tipēšana // *RSU Zinātniskie raksti 2009*, 2009; 250–254.
4. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M, Monnet DL, van Dissel JT and Kuijper EJ, for the ECDIS Study Group. *Clostridium difficile* infection in Europe: the first pan-European hospital-based survey. *The Lancet*, 2010; 377, No.9759:63–73.

10. Pateicības

Siltus pateicības vārdus veltu promocijas darba vadītājiem profesorei Dacei Gardovskai un asociētajam profesoram Edvīnam Miklaševičam par padomiem, ieteikumiem, jaunām idejām un radošu ieguldījumu darba izstrādes procesā.

Augstu novērtēju CL Mikrobioloģijas nodaļas vadītājas Artas Balodes izpalīdzību un kompetenci.

Liels paldies Rīgas Stradiņa universitātes Pediatrijas katedras docentei Ilzei Gropei un LU asociētajam profesoram Ugam Dumpim par palīdzību publikāciju tapšanas procesā.

Paldies profesorei Ludmilai Viksnai par konkrētu, pamatotu aizrādījumu uzskaitījumu un ieteiktajiem vēlamajiem labojumiem.

Paldies RSU zinātņu prorektorei profesorei Ivetai Ozolantei, RSU Doktorantūras nodaļas vadītājam profesoram Aigaram Pētersonam un RSU doktora studiju programmas „Medicīna” vadītājai profesorei Sandrai Lejniecei par atbalstu doktorantūras laikā un pamudinājumiem sasniegt izvirzīto mērķi savlaicīgi.

Pateicos RSU Fizikas katedras vadītājam profesoram Uldim Teibem par palīdzību statistisko datu apstrādē.

Liels atbalsts un praktiski palīgi ir un būs mani kolēģi P. Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas CL Mikrobioloģijas laboratorijā un Molekulārās bioloģijas un ģenētikas laboratorijā, viņu iedvesma vienmēr būs kopā ar mani.

Pateicos KUS „Gaiļezers” mikrobioloģijas laboratorijas ārstēm Dacei Rudzītei un Elvīrai Lavrinovičai par palīdzību pētāmā materiāla atlasē.

Pateicos P. Stradiņa KUS Infekcijas uzraudzības dienesta epidemioloģei Elinai Dimiņai par sadarbību.

Paldies maniem radniekiem par sapratni, morālu, sirdstīru un pašreizējā palīdzību grūtos brīžos un patiesu prasmi priecāties par maniem sasniegumiem.

1.42 EUR

RSU BIBLIOTÉKA



0221007523