



Kārlis Rācenis

Bakteriofāgu antibakteriālā darbība multirezistentās un biofilmu veidojošās infekcijās

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – internā medicīna

Rīga, 2023



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Kārlis Rācenis

ORCID 0000-0001-7123-4048

Bakteriofāgu antibakteriālā darbība
multirezistentās un biofilmu
veidojošās infekcijās

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – internā medicīna

Rīga, 2023

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Latvija

Dr. med. profesors **Aivars Pētersons**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Iekšējīgo slimību katedra, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. profesore **Ilze Konrāde**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Iekšējīgo slimību katedra, Latvija

Dr. med. profesors **Uga Dumpis**,

Latvijas Universitāte, Medicīnas fakultāte

Dr. med. profesors **Christian Willy**,

Berlīnes Bundesvēra akadēmiskā slimnīca (angļu val. *Academic Hospital Bundeswehr Berlin*), Ortopēdijas un traumatoloģijas nodaļa, Vācija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts klīniskās medicīnas promocijas padomes atklātā sēdē 2023. gada 18. decembrī plkst. 15.00 Hipokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16, Rīgas Stradiņa universitātē un attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

Promocijas padomes sekretāre:

Dr.med. asociētā profesore **Natalja Kurjāne**

Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	6
Ievads.....	10
Darba mērķis.....	13
Darba uzdevumi.....	13
Darba hipotēze.....	14
Darba novitāte.....	14
Personīgais ieguldījums.....	15
Ētiskie aspekti.....	15
1. Materiāli un metodes.....	16
1.1. Pētījuma laiks, vieta un uzbūve.....	16
1.2. Izmantotie materiāli.....	18
1.2.1. Izmantotās baktēriju kultūras.....	18
1.2.2. Izmantotie bakteriofāgi.....	18
1.3. Izmantotās metodes.....	19
1.3.1. <i>S. aureus</i> mikrobioloģiskā izmeklēšana.....	19
1.3.2. Antibakteriālās jutības noteikšana.....	19
1.3.3. Bakteriofāgu koncentrācijas jeb titra noteikšana.....	19
1.3.4. Fāgu izsēšanas efektivitātes noteikšana, salīdzinot ar saimnieka vai references kultūru.....	20
1.3.5. Divslāņu agara punktu metode bakteriofāgu lītiskā efekta noteikšanai.....	20
1.3.6. Bakteriofāgu pavairošana, izmantojot saimnieka vai references kultūru.....	21
1.3.7. Bakteriofāgu adaptācija.....	21
1.3.8. Baktēriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana, izmantojot kristālvioletā metodi.....	22
1.3.9. Biofilmas produkcijas optiskā blīvuma interpretācija.....	23
1.3.10. Baktēriju augšanas inhibīcijas, minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC), minimālās biofilmas eradikācijas koncentrācijas (MBEC) un biofilmas profilaktiskās koncentrācijas noteikšana (BPC) biofilmu modeļos.....	23
1.3.11. Baktēriju jutības izmaiņu un rezistences noteikšana pret bakteriofāgiem biofilmu modeļos.....	24
1.3.12. Datu statistiskā analīze.....	26
2. Rezultāti.....	27
2.1. Bakteriofāgu efekts <i>S. aureus</i> kultūrās peritoneālās dialīzes pacientiem.....	27
2.1.1. Iekļauto pacientu raksturojums.....	27

2.1.2.	Klīniskie iznākumi <i>S. aureus</i> nēsātājiem un nenēsātājiem...	28
2.1.3.	Izdalīto <i>S. aureus</i> antibakteriālā jutība un biofilmas veidošanas spēja	29
2.1.4.	<i>S. aureus</i> bakteriofāgu jutība un fāgu adaptācijas rezultāti	30
2.2.	Bakteriofāgu efekts uropatogēnās <i>E. coli</i> planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās.....	33
2.2.1.	<i>E. coli</i> biofilmas veidošanas spēja.....	33
2.2.2.	<i>E. coli</i> antibakteriālā un bakteriofāgu jutība.....	33
2.2.3.	Ciprofloksacīna un amoksicilīna/klavulanāta efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās.....	35
2.2.4.	Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās	36
2.3.	Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezidenta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> augšstilba osteomiēlīta ārstēšanā	40
2.3.1.	Pacienta gadījuma raksturojums.....	40
2.3.2.	Fāgu terapijas izmantošana, pacienta tālākā ārstēšana, izmeklēšana un terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts.....	41
2.3.3.	<i>P. aeruginosa</i> , kura izolēta no pacienta ar osteomiēlītu, antibakteriāla un fāgu jutība	46
2.3.4.	Bakteriofāgu un ceftazidīma/avibaktāma efekts planktoniskās šūnās un biofilmas novēršanā <i>P. aeruginosa</i> PA (4) izolātā pacientam ar osteomiēlītu	46
2.4.	Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezidenta <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LVAD kabeļa infekcijas ārstēšanā	49
2.4.1.	Pacienta gadījuma raksturojums, pacienta izmeklēšana	49
2.4.2.	Fāgu terapijas izmantošana	51
2.4.3.	Lietotās terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts	54
2.4.4.	<i>P. aeruginosa</i> , kura izolēta no pacienta ar LVAD kabeļa infekciju, antibakteriāla un fāgu jutība.....	54
2.4.5.	Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas eradikācijas modeli.....	57
2.4.6.	Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas profilakses modeli	59
2.4.7.	Bakteriofāgu un antibiotiku mijiedarbība planktonisko šūnu līzē un biofilmas eradikācijā, izmantojot sākotnēji fāgus un tad antibiotikas.....	62
3.	Diskusija.....	63

Secinājumi	76
Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu	78
Literatūras saraksts	81
Pateicības	88

Darbā izmantotie saīsinājumi

Saīsinājums	Skaidrojums latviešu valodā	Skaidrojums angļu valodā
ADNP	autosomāli dominanta nieru policistoze	<i>Autosomal dominant polycystic kidney disease</i>
AMC	amoksicilīns/klavulanāts	<i>Amoxicillin/clavulanate</i>
AMK	amikacīns	<i>Amikacin</i>
AMP	ampicilīns	<i>Ampicillin</i>
BPC	biofilmas prevencijas koncentrācija	<i>Biofilm prevention concentration</i>
CAZ	ceftazidīms	<i>Ceftazidime</i>
CAZ/AVI	ceftazidīms/avibaktāms	<i>Ceftazidime/avibactam</i>
CD	cukura diabēts	<i>Diabetes mellitus</i>
CIP	ciprofloksacīns	<i>Ciprofloxacin</i>
CL	pilna līze	<i>Confluent lysis</i>
CLI	klindamicīns	<i>Clindamycin</i>
CMV	citomegalovīruss	<i>Cytomegalovirus</i>
CST	kolistīns	<i>Colistin</i>
CTX	cefotaksīms	<i>Cefotaxime</i>
DN	diabētiska nefropātija	<i>Diabetic nephropathy</i>
EDTA	etilēndiamīntetraetiķskābe	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EOP	fāgu izsēšanas efektivitāte	<i>Efficiency of Plating</i>
ERY	eritromicīns	<i>Erythromycin</i>
ESBL	paplašināta spektra beta-laktamāze	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>
EUCAST	Eiropas Antimikrobiālās jutības noteikšanas komiteja	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FEP	cefepīms	<i>Cefepime</i>

FOF	fosfomicīns	<i>Fosfomycin</i>
FOX	cefoksitīns	<i>Cefoxitin</i>
GEN	gentamicīns	<i>Gentamicin</i>
GN	glomerulonefrīts	<i>Glomerulonephritis</i>
HIN	hronisks intersticiāls nefrīts	<i>Chronic interstitial nephritis</i>
HN	hipertensīva nefropātija	<i>Hypertensive nephropathy</i>
HNS	hroniska nieru slimība	<i>Chronic kidney disease</i>
HOPS	hroniska obstruktīva plaušu slimība	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
HSM	hroniska sirds mazspēja	<i>Congestive heart failure</i>
I	jutīgs paaugstinātā devā	<i>Susceptible, increased exposure</i>
IMP	imipenēms	<i>Imipenem</i>
IP	atsevišķi plaki	<i>Individual plaques</i>
KVV	baktēriju koloniju veidojošās vienības	<i>Colony-forming unit</i>
LVAD	kreisā kambara mehāniskās palīgācirkulācijas ierīce	<i>Left Ventricular Assist Device</i>
MBEC	minimālā biofilmas eradikācijas koncentrācija	<i>Minimum biofilm eradication concentration</i>
MDR	multirezistents	<i>Multidrug-resistant</i>
MEM	meropenēms	<i>Meropenem</i>
MIC	minimālā inhibējošā koncentrācija	<i>Minimum inhibitory concentration</i>
MRSA	meticilīna rezistentais <i>S. aureus</i>	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>
MSSA	meticilīna jutīgais <i>S. aureus</i>	<i>Methicillin-susceptible S. aureus</i>
N/A	nav attiecināms	<i>Not applicable</i>
N/D	netika noteikts	<i>Not determined</i>

NIT	nitrofurantoīns	<i>Nitrofurantoin</i>
NOR	norfloksacīns	<i>Norfloxacin</i>
OD	optiskais blīvums	<i>Optical density</i>
ODc	optiskā blīvuma robežvērtība	<i>Optical density cut-off value</i>
ODs	baktērijas izolāta optiskais blīvums	<i>Optical density of the bacterial isolate</i>
PD	peritoneālā dialīze	<i>Peritoneal dialysis</i>
PFU	fāgu plaku veidojošās vienības	<i>Plaque-forming unit</i>
PL	vāja līze	<i>Partial lysis</i>
PSKUS	Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca	<i>Pauls Stradiņš Clinical University Hospital</i>
<i>QAMH</i>	Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīca	<i>Queen Astrid Military Hospital</i>
R	rezistents	<i>Resistant</i>
RAKUS	Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca	<i>Riga East Clinical University hospital</i>
RIF	rifampicīns	<i>Rifampicin</i>
RR	relatīvais risks	<i>Relative risk</i>
RSU	Rīgas Stradiņa universitāte	<i>Rīga Stradiņš University</i>
S	jutīgs	<i>Susceptible</i>
SCL	daļēja līze	<i>Semi-confluent lysis</i>
SD	standartnovirze	<i>Standard deviation</i>
SXT	sulfametoksazols/ trimetoprims	<i>Sulfamethoxazole/ trimethoprim</i>
TET	tetraciklīns	<i>Tetracycline</i>
TIC	tikarcilīns	<i>Ticarillin</i>
TIM	tikarcilīns/klavulanāts	<i>Ticarillin/clavulanate</i>
TOB	tobramicīns	<i>Tobramycin</i>

TSA	triptikāzes sojas agars	<i>Trypticase soy agar</i>
TSB	triptikāzes sojas buljons	<i>Trypticase soy broth</i>
TZP	piperacilīns/tazobaktāms	<i>Piperacillin/tazobactam</i>
UCI	urīnceļu infekcija	<i>Urinary tract infection</i>
VRE	vankomicīna rezistentais <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Vancomycin-resistant Enterococcus faecium</i>

Ievads

Mūsdienās pieaug multirezistentu mikroorganismu infekciju izplatība, savukārt efektīvu antimikrobiālo līdzekļu kļūst arvien mazāk (1). Eiropas Slimību un profilakses un kontroles centrs 2022. gadā ziņoja, ka antibakteriālā rezistence ierosina vidēji 35 tūkstošus nāves gadījumu Eiropas Savienībā un Eiropas Ekonomikas zonā, 1,27 miljonu nāves gadījumu pasaulē, tāpēc Eiropas Komisija 2022. gada jūlijā ierindoja antimikrobiālo rezistenci kā vienu no trim būtiskākajām veselības problēmām (2). Eiropas Savienībā ir izveidots rīcības plāns mikrobiālās rezistences mazināšanai, kurš ticis atkārtoti pārskatīts un pēdējo reizi pieņemts 2023. gada 1. jūnijā, tas paredz jaunu antimikrobiālo līdzekļu un alternatīvu metožu izstrādi multirezistentu mikroorganismu izplatības ierobežošanai (3). Viena no šādām metodēm ir bakteriofāgu terapija, kuras lietošana pēdējos gados tiek pētīta arvien vairāk, tomēr pētījumu skaits ir nepietiekams.

Bakteriofāgus pirmoreiz ir aprakstījis Viljams Tverts 1915. gadā un Felikss d'Erells 1917. gadā. Neilgi pēc tam tos sāka izmantot infekciju ārstēšanā, bet līdz ar antibiotiku atklāšanu un plašu lietošanu tie tika aizmirsti, jo to terapija ir salīdzinoši grūtāka un efektīvai lietošanai sarežģītāka nekā antibiotikām. Bakteriofāgi jeb fāgi ir baktēriju vīrusi, kas tiešā tulkojumā no grieķu valodas nozīmē "baktēriju ēdāji". Fāgiem piemīt unikāla spēja inficēt baktērijas un, veidojot baktērijā jeb saimniekšūnā jaunas vīrusu daļiņas, baktēriju lizēt. Šīs īpašības dēļ bakteriofāgi ir potenciāls līdzeklis cīņā pret patogēnajām baktērijām, īpaši pret tādām, kurām ir izveidojusies rezistence pret antibakteriālām vielām (4). Fāgiem galvenokārt ir raksturīgs saimniekorganisma sugas un celma specifiskums (5, 6), tādēļ ir būtiski identificēt bakteriālo ierosinātāju un piemeklēt tam atbilstošu bakteriofāgu veiksmīgai terapijai. Līdz šim par šāda veida pētījumiem Baltijas valstu reģionā nav publiski pieejamu datu. Saskatot perspektīvu šādā personalizētā terapijas pieejā pret multirezistentiem baktēriju

celmiem un to ierosinātām infekcijām, atsevišķās valstīs tiek veidoti reģionāli fāgu centri, piemēram, Beļģijā, Polijā un Vācijā. Šobrīd vērojama fāgu terapijas atkārtota interese un ieviešana klīniskā praksē.

Vieni no biežākajiem klīniski nozīmīgajiem mikroorganismiem ir *S. aureus*, *E. coli* un *P. aeruginosa*. Tie spēj ierosināt sadzīvē iegūtas un nozokomiālas infekcijas, urīnceļu infekcijas, endokardītu, peritonītu, brūču un citas infekcijas. *S. aureus* ir biežākais peritoneālās dialīzes (PD) katetra izejas atveres infekcijas ierosinātājs, kā arī ierosina PD asociētu peritonītu 6–14 % gadījumu (7–9). Tā ierosinātajam peritonītam ir lielāks recidīvu, katetra nomaiņas un nāves risks (10–12), kur būtisku lomu spēlē dažādie baktērijas virulences faktori, kā viens no tiem ir baktērijas spēja veidot biofilmas (13, 14). Atsevišķās klīniskās situācijās, piemēram, urīnceļu infekcija (UCI), baktēriju veidotās biofilmas ir iesaistītas slimības attīstībā līdz pat 60 % gadījumu (15). Biežākais UCI ierosinātājs ir *E. coli* (16, 17), kuram ir plaša antibakteriālās rezistences un biofilmas veidošanas spēja. Antibiotiku jutīgu baktēriju veidotajās biofilmās to koncentrācija bieži ir subinhibējoša, tas rada nepietiekamu antibakteriālo efektu un var veicināt baktērijas veidot vēl izteiktāku biofilmu (18, 19). Savukārt hronisku brūču infekciju gadījumā baktēriju veidotas biofilmas nozīme ir vērojama līdz pat 78,2 % gadījumu (20). *P. aeruginosa* ir izaicinošs komplikētu brūču ierosinātājs ar augstu slimības recidīva iespēju. Tas ir skaidrojams ar baktērijas straujo un plašo antibakteriālās rezistences attīstību, multipliem virulences faktoriem un izteiktu biofilmas veidošanās spēju, kurai ir izšķiroša loma hroniskas bakteriālas kolonizācijas attīstībā (21, 22). Šādu infekciju ārstēšana ir kompleksa un ietver kā antibakteriālu terapiju, tā arī ķirurģisku ārstēšanu ar nekrektomiju (23).

Bakteriofāgiem piemīt spēja degradēt biofilmas struktūru, jo tie producē vielas, kuras spēj to noārdīt, piemēram, polisaharīdu depolimerāzes un lizīnus, pēc kuru iedarbības fāgi spēj sasniegt biofilmas dziļākos slāņus (24–26). Šīs

īpašības padara fāgus par potenciāliem antibakteriāliem aģentiem, kurus var izmantot multirezistentu un biofilmu asociētu infekciju ierobežošanā. Pieejamie dati par bakteriofāgu efektu ar biofilmām asociētu infekciju ārstēšanā ir ar atšķirīgiem rezultātiem, kas saistāms ar multipliem mainīgajiem faktoriem, piemēram, dažādiem bakteriāliem ierosinātājiem un dažādiem bakteriofāgiem, kuri tikuši izmantoti ar antibiotikām vai bez tām.

Šobrīd nav pieejamu plašu klīnisko pētījumu datu par fāgu efektu klīniskās situācijās, tomēr esošie dati pietiekami pārliecinoši parāda, ka fāgu terapija ir droša. Pietrūkst zinātniski pamatotu un sistēmisku datu par fāgu ievades veidiem, devām, farmakokinētiku un farmakodinamiku, fāgu rezistences attīstību un mijiedarbību ar antibiotikām (27, 28). Visbiežāk fāgu terapija tiek izmantota kombinācijā ar antibiotikām, lai panāktu vēlamo efektu. Tomēr ne vienmēr fāgu un antibiotiku mijiedarbība var būt viegli paredzama, tā var būt sinerģiska, aditīva, bet reizēm pat antagonistiska, ko galvenokārt nosaka fāga dzīves cikls baktērijā, antibiotikas darbības mehānisms un šo abu līdzekļu izmantošanas ilgums un secība (4, 29). Lai precīzi definētu šīs mijiedarbības, nepieciešami plaši un sistēmiski pētījumi, jo fāgu terapijā tiek izmantoti ļoti dažādi un savstarpēji atšķirīgi vīrusi.

Ne mazāk svarīgs ir bakteriofāgu rezistences attīstības process un tā nozīme bakteriofāgu terapijā. Zināms, ka pret fāgiem rezistentu baktēriju klonu veidošanās attīstība notiek pat ārstēšanas laikā, tāpēc fāgu terapijā parasti tiek izmantoti vairāki fāgus saturoši kokteiļi, kā arī terapija tiek papildināta ar antibiotikām (30, 31). Būtiska ir baktērijas ģenētiskā mainība fāgu terapijas laikā, vairāki pētījumi ir parādījuši, ka kombinācijā ar fāgu rezistenci mainās baktērijas virulences faktoru ekspresija un var notikt esošo rezistences mehānismu izzušana pret antibiotikām, kas veicina infekcijas izārstēšanu (32, 33).

Šie apsvērumi padara bakteriofāgu terapiju par perspektīvu iespēju multirezistentu un ar biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā, tomēr, iztrūkstot galvenokārt klīnisko pētījumu datiem, fāgu izmantošana saglabājas kā eksperimentāla terapija. Nepieciešami pētījumi vairākos bakteriofāgu lietošanas aspektos, īpaši klīniskā lietojumā. Ņemot vērā fāgu daudzveidību un to iespējamās dažādās kombinācijas ar antibiotikām, svarīgi izvērtēt fāgu iedarbību biofilmās ar un bez antibiotikām *in vitro*. Nepieciešams vērtēt ne tikai efektivitāti, bet arī bakteriālo mainību, piemēram, baktēriju rezistences attīstību pret fāgiem un baktēriju antibakteriālās rezistences mainību fāgu terapijas ietekmē.

Darba mērķis

Izvērtēt bakteriofāgu antibakteriālo efektu un mijiedarbību ar antibiotikām atsevišķu multirezistentu un biofilmu veidojošu infekciju *in vitro* modeļos un dzīvībai apdraudošo klīnisko situāciju ārstēšanā.

Darba uzdevumi

1. Izvērtēt *S. aureus* kolonizācijas biežumu peritoneālās dialīzes pacientiem, to biofilmas veidošanas spēju un bakteriofāgu darbības efektivitāti, analizēt kolonizācijas ietekmi uz PD iznākumiem.
2. Noteikt un izvērtēt bakteriofāgu un to kombināciju ar antibiotikām antibakteriālo un biofilmu eradikācijas efektu uropatogēno *E. coli* kultūrās.
3. Vērtēt bakteriofāgu rezistenci un tās attīstības biežumu izolētajās baktērijās, kā arī veikt bakteriofāgu adaptāciju rezistences pārvarēšanai.

4. Izvērtēt fāgu kokteiļa BFC 1.10 darbības efektu kombinācijā ar ceftazidīmu/avibaktāmu multirezistentā *P. aeruginosa* osteomielīta terapijā un laboratorijas apstākļos.
5. Izvērtēt bakteriofāgu PNM un PT07 un to kombināciju ar antibiotikām lītisko efektu multirezistentas *P. aeruginosa* LVAD infekcijas ārstēšanā un laboratorijas modeļos.

Darba hipotēze

Bakteriofāgiem un to kombinācijai ar antibiotikām ir multirezistentu baktēriju biofilmu eradikācijas spēja.

Darba novitāte

Pētnieciskajā darbā ir veikta padziļināta bakteriofāgu terapeitiskā efekta izvērtēšana biofilmu asociētū, kā arī multirezistentu infekciju ārstēšanā. Pētījumā ir izvērtēti dažādi faktori, kā fāgu rezistence, baktēriju spēja veidot biofilmas, fāgu mijiedarbība ar antibiotikām, kuri nosaka fāgu lītiskā efekta atšķirības planktoniskajās šūnās un baktēriju biofilmās.

Vērtēta bakteriofāgu un to kombinācijas ar antibiotikām lītiskā darbība antibiotiku jutīgās un multirezistentās baktēriju kultūrās, kā arī izvērtēts biofilmu eradikācijas efekts, izmantojot dinamisku biofilmas modeli. Noteikta bakteriofāgu mijiedarbība ar antibiotikām, kā arī vērtēta to optimālā lietošanas secība.

Izvērtēta bakteriofāgu rezistences veidošanās, tās attīstības biežums biofilmu inhibīcijas modeļos. Izmantota bakteriofāgu adaptācija, lai pārvarētu bakteriofāgu rezistenci.

Šis ir viens no dažiem darbiem, kur fāgi lietoti pacientiem sarežģītās klīniskās situācijās, kā arī ir pirmais pētījums pasaulē (cik autoram zināms), kur to lietojums apsvērts peritoneālās dialīzes pacientiem. Līdz šim Latvijā nav

publiski pieejamu datu par bakteriofāgu terapijas lietošanu un tās efekta vērtējumu biofilmu asociētās multirezistentās infekcijās.

Personīgais ieguldījums

Darba autors ir veicis zinātniskā un klīniskā darba plānošanu, organizēšanu, piedalījies visos pētījuma posmos. Ievācis bioloģisko materiālu (baktēriju kultūras), apkopojis pacienta datus, izstrādājis ārstēšanas plānu. Raksturojis baktērijas, nosakot antibakteriālo jutību, bakteriofāgu jutību, veicis bakteriofāgu adaptāciju un bakteriofāgu efekta izvērtēšanu biofilmu modeļos. Autors ir ieviesis un modificējis darbā izmantotās metodes, kuras nepieciešamas fāgu un biofilmu pētniecībā. Apkopojis, apstrādājis un analizējis, t. sk. izmantojot statistiskas metodes, iegūtos datus. Sagatavojis zinātniskās publikācijas un sarakstījis šo darbu.

Ētiskie aspekti

Pētījums tika veikts atbilstoši Helsinku deklarācijas ētiskajiem aspektiem. Pētījuma protokoli tika saskaņot un atzīti Rīgas Stradiņa universitātes Pētījumu ētikas komitejā, atzinuma Nr. 32/28.01.2016 un Nr. 8/08.09.2016. Pacientu ārstēšana, izmantojot bakteriofāgus, tika veikta atbilstoši Helsinku deklarācijas 37. paragrāfam, pirms pacientu iesaistes tika saņemta rakstiska informētā piekrišana.

1. Materiāli un metodes

1.1. Pētījuma laiks, vieta un uzbūve

Promocijas pētījums tika izstrādāts RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā, kurā tika veikts darbs ar izolētajām baktēriju kultūrām un bakteriofāgiem. Pētījuma materiāls tika iegūts no pacientiem sadarbībā ar Paula Stradiņa Klīnisko universitātes slimnīcu (PSKUS). Rīgas Austrumu klīniskajā universitātes slimnīcā (RAKUS) un PSKUS tika veikta pētījuma eksperimentālā daļa, ārstējot pacientus ar bakteriofāgiem. Pētījuma aktivitātes norisinājās no 2016. gada septembra līdz 2022. gada decembrim. Pacientu klīnisko un demogrāfisko datu analīze tika veikta visiem pacientiem, no kuriem iegūtas un izmantotas baktēriju kultūras vai veikts baktēriju nēsāšanas skrīnings. Pētījuma uzbūve un katrā no tām izmantotās metodes atspoguļotas 1.1. attēlā. Promocijas pētījums ir veidots kā četru secīgu publikāciju kopa.

Pētījumu veidoja trīs sadaļas:

1. Biofilmas veidošanas noteikšana un bakteriofāgu efekta vērtējums *S. aureus* izolātos PD pacientiem.
2. Bakteriofāgu efektivitātes izvērtēšana biofilmu veidojošos uropatogēnos *E. coli* izolātos.
3. Eksperimentālās fāgu terapijas veikšana un izvērtēšana pacientiem ar multirezistentām *P. aeruginosa* infekcijām. Tika iekļauti divi pacienti, kuriem bija multirezistenta *P. aeruginosa* infekcija, vienam pacientam augšstilba osteomielīts, otram LVAD kabeļa infekcija.

Biofilmas veidošanas noteikšana un bakteriofāgu efekta vērtējums <i>S. aureus</i> izolātos PD pacientiem
<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> skrīnings visiem PD pacientiem PSKUS Nefroloģijas centrā • <i>S. aureus</i> izolēšana un identifikācija izmantojot VITEK-2 sistēmu • Antibakteriālas jutības noteikšana izmantojot disku difūzijas metodi • Bakteriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana ar kristālvioletā krāsojuma mikroplašu metodi • Bakteriofāgu jutības noteikšana ar divslāņu agara punktu metodi • Bakteriofāgu īrīskā efekta pastiprināšana vāji jutīgās vai rezistentās <i>S. aureus</i> kultūras izmantojot adaptācijas metodi • Klīnisko iznākumu (peritonīts, nāve, PD katera evakuācija, nieres transplantācijas) vērtēšana <i>S. aureus</i> nesātāju un nenesātāju grupās divu gadu periodā

Bakteriofāgu efekts biofilmu veidojošos uropatogēnos <i>E. coli</i> izolātos
<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> izolātu iegūšana no PSKUS ārstētiem pacientiem ar UCI • Antibakteriālas jutības noteikšana izmantojot disku difūzijas metodi, paplašinātā spektra beta laktamāzes (ESBL, angļiski <i>extended-spectrum beta-lactamase</i>) fenotipiskā apsūpināšana izmantojot kombinēto disku metodi • Bakteriofāgu jutības noteikšana ar divslāņu agara punkta metodi • Bakteriofāgu īrīskā efekta pastiprināšana veicot adaptāciju • Bakteriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana ar kristālvioletā krāsojuma mikroplašu metodi • Minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC, angļiski <i>minimum inhibitory concentration</i>) un minimālās biofilmas eradikācijas koncentrācijas (MBEC, angļiski <i>minimum biofilm eradication concentration</i>) noteikšana fāģiem un antibiotikām izmantojot Kalgarī biofilmas eradikācijas metodi

Ekspertintāļā fāģu terapija pacientiem ar multirezistentām <i>P. aeruginosa</i> infekcijām
<ul style="list-style-type: none"> • Bakteriju izolēšana pacientiem ar multirezistentām <i>P. aeruginosa</i> infekcijām • Antibakteriālas jutības noteikšana izmantojot disku difūzijas, E-tesa un mikroplašu MIC testa metodes • Biofilmas veidošanas spējas noteikšana noteikšana ar kristālvioletā krāsojuma mikroplašu metodi • Bakteriofāgu jutības noteikšana ar divslāņu agara punkta metodi, fāģu izsēšanas efektivitātes (EOP, angļiski <i>efficiency of plating</i>) noteikšana veicot bakteriofāģu tīrēšanu • Bakteriofāģu sagatavošana un testēšana pirms pacientu ārstēšanas • Bakteriofāģu izdales noteikšana no pacienta brūces un asinis pacientam, kurš saņēma intravenozu fāģu terapiju • MIC, MBEC, biofilmas prevencijas koncentrācijas (BPC, angļiski <i>biofilm prevention concentration</i>) noteikšana fāģiem +/- ar antibiotikām izmantojot modificēto Kalgarī biofilmas eradikācijas metodi • Bakteriofāģu un antibiotiku mijiedarbības vērtēšana izmantojot modificēto Kalgarī biofilmas eradikācijas metodi • Bakteriofāģu rezistences noteikšana MBEC un BPC modeļos • Pacientu klīnisko, radioloģisko datu analīze, izvērtēšana, pacientu novērošana

1.1. attēls. Pētījuma uzbūve ar trim sadaļām, galvenās izmantotās metodes katrā sadaļā

1.2. Izmantotie materiāli

1.2.1. Izmantotās baktēriju kultūras

Pētījumā tika izmantotas no pacientiem iegūtas *S. aureus*, *E. coli* un *P. aeruginosa* kultūras. *E. coli* un *P. aeruginosa* kultūras tika iegūtas no PSKUS vai RAKUS laboratorijām. Lai vērtētu un salīdzinātu pacientu baktēriju biofilmas veidošanas spēju, kā arī veiktu bakteriofāgu pavairošanu, tika izmantotas šādas references kultūras: *S. aureus* ATCC 4336 un ATCC 15923, *E. coli* ATCC 29522, *P. aeruginosa* ATCC 14209, ATCC 27853 un CN573.

1.2.2. Izmantotie bakteriofāgi

S. aureus un *E. coli* eksperimentos tika izmantoti komerciāli lītisko bakteriofāgu preparāti, kuriem ir zināms to sastāvs un darbības spektrs. Šie bakteriofāgu preparāti no *Eliava BioPreparations*, Tbilisi, Gruzijā: stafilokoku bakteriofāga preparāts, *Pyo*, *Ses*, *Fersisi*, *Enko* un *Intesti* bakteriofāgu preparāti. Kā arī bakteriofāgu preparāts *Pyobacteriophag* no *Microgen*, Permas, Krievijā.

Pacientu ārstēšanai un tālākiem pētījumiem ar *P. aeruginosa* fāgi tika iegūti no Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcas Briselē, Beļģijā. Šie fāgi tiek ražoti atbilstoši drošības un kvalitātes standartiem bakteriofāgu terapijai (34, 35). Šie fāgi iepriekš ir tikuši izmantoti pacientu ārstēšanā (36-38), pirms to lietošanas veikta neatkarīga preparāta kvalitātes izvērtēšana Beļģijas veselības institūtā *Sciensano*.

Pacientam ar osteomielītu tika izmantots lītisko bakteriofāgu preparāts BFC 1.10. Pacientam ar LVAD kabeļa infekciju tika izmantots *Podoviridae* dzimtas bakteriofāgs PNM un *Myoviridae* bakteriofāgs PT07.

1.3. Izmantotās metodes

1.3.1. *S. aureus* mikrobioloģiskā izmeklēšana

Pacienta iztriepes tika ņemtas, izmantojot universālo transporta barotni *AMIES*. Transportētas uz laboratoriju divu stundu laikā un kultivētas, izmantojot selektīvās barotnes. Baktēriju identifikācija tika veikta, izmantojot *VITEK-2* (*bioMerieux*, Francija) sistēmu.

1.3.2. Antibakteriālās jutības noteikšana

Antibakteriālā jutība tika noteikta visām izmantotajām baktēriju kultūrām, to veica ar disku difūzijas metodi atbilstoši aktuālajam Eiropas Antimikrobiālās jutības noteikšanas komitejas (EUCAST, anglicki *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) standartam.

1.3.3. Bakteriofāgu koncentrācijas jeb titra noteikšana

Vīrusa veidoto baktēriju šūnu līzes zonas jeb plaku (negatīvās baktēriju kolonijas) metode tika izmantota bakteriofāgu koncentrācijas jeb titra noteikšanai. Pamatā tika izveidoti vairāki desmitkārtīgi bakteriofāgu preparātu atšķaidījumi, 50 µl no katra atšķaidījuma tika sajaukti ar 100 µl baktēriju suspensijas pusšķidrā TSA, kas izliets uz TSA Petrī platēm. Plates inkubētas 16–18 stundu ilgi. Nākamajā dienā tika vērtēta katra plate un noteikta bakteriofāgu koncentrācija. Pētījuma eksperimentālajā sadaļā bakteriofāgu titru noteica pacienta asins paraugā. Šajā gadījumā sākotnējais paraugs bija 4–5 ml pacienta asiņu, kuras paņemtas, izmantojot EDTA asins stobriņu.

1.3.4. Fāgu izsēšanas efektivitātes noteikšana, salīdzinot ar saimnieka vai references kultūru

Sākotnēji nosaka fāga koncentrāciju saimnieka kultūrā vai references kultūrā, kā arī fāga koncentrāciju pacienta kultūrā. Tiek pieņemts, ka saimnieka vai references kultūrā fāga efektivitāte ir lielāka. Iegūtos rezultātus savstarpēji salīdzina, izmantojot 1.1. formulu. Lielāka efektivitāte ir vērojama gadījumā, ja EOP skaitlis konkrētajam baktērijas izolātam tuvāks 1.

$$EOP = F_{CT} / F_{CR} \quad (1.1.)$$

EOP – fāgu izsēšanas efektivitāte testējamā pacienta izolātā

F_{CT} – fāga koncentrācija pacienta izolātā

F_{CR} – fāga koncentrācija saimnieka baktērijā vai references celmā

1.3.5. Divslāņu agara punktu metode bakteriofāgu lītiskā efekta noteikšanai

Bakteriofāgu lītiska efekta noteikšanai tika izmantota divslāņu agara punktu metode. 100 µl baktēriju suspensijas tiek sajaukta ar 4–5 ml iepriekš sašķidrinātu 0,7 % TSA un viegli samaisīta 15 ml stobriņā, kas pēc tam tiek izlieta kā virskārta uz TSA Petrī plates. Tad uz plates ar mikropipeti tiek uznesti 10 µl bakteriofāgu preparāta pilienu un tās tiek inkubētas 35 °C 16–18 h ilgi. Fāgu rezultāti tiek vērtēti un nolasīti vizuāli. *E. coli* un *S. aureus* līzes zonas tiek vērtētas kā pilna līze (CL vai +++), daļēja līze (SCL vai ++), vāja līze vai atsevišķi plaki (PL/IP vai +), līzes zonas neesamība (R jeb –). *P. aeruginosa* līzes zonas tiek vērtētas kā pilna līze (CL vai +++++), daļēja līze (SCL vai +++), vāja līze (PL vai ++), atsevišķi plaki (PL vai +), līzes zonas neesamība (R jeb –).

1.3.6. Bakteriofāgu pavairošana, izmantojot saimnieka vai references kultūru

Pavairošanai tika izmantoti *S. aureus* ATCC 4336, *E. coli* ATCC 29522 un *P. aeruginosa* ATCC 27853 un CN 573 celmi. Pavairošanas process notiek, izmantojot plates no fāgu titrēšanas, kurās redzams liels plaku skaits, ko vizuāli apzīmē kā sietiņam līdzīgu struktūru baktēriju zālienā. Tiek savākta barotnes augšējā daļa, uz tās uzlejot TSB, pēc tam veic šūnu līzi ar hloroformu un paraugu centrifugē, pēc tā preparāts tiek filtrēts caur 0,2 μm izmēra filtru (*Filtropur S, Sarstedt*, Vācija). Ja fāga koncentrācija nebija pietiekama, tad iegūto preparātu atkārtoti filtrēja un sakoncentrēja, centrifugējot 4000× g 20 min. 4 °C temperatūrā *Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore, Īrija)* filtrā.

1.3.7. Bakteriofāgu adaptācija

Tika izmantota modificēta Apelmans metode (39). Adaptācijas procedūra sastāvēja no vairākiem cikliem, kuros darbības atkārtojās. Katram ciklam tika veidoti vairāki desmitkārtīgi bakteriofāgu preparātu atšķaidījumi, pievienotas baktērijas un veikta inkubācija 48 h 37 °C. Pēc inkubācijas perioda mērīts katra stobriņa optiskais blīvums. Stobriņš ar augstāko atšķaidījuma pakāpi, kura optiskais blīvums bija līdzvērtīgs negatīvās kontroles stobriņam, tika izmantots tālākai adaptācijas procedūrai. Stobriņā lizētas baktērijas ar hloroformu un veikta parauga centrifugēšana, pēc tam filtrēšana. Iegūtais preparāts tika atkārtoti atšķaidīts un inkubēts, kā aprakstīts iepriekš, šādā veidā veicot parauga adaptēšanas nākamās ciklus. Pirms adaptētā fāga lītiskā efekta pārbaudes tas adaptēts vismaz trijos ciklos.

1.3.8. Baktēriju biofilmas veidošanas spējas noteikšana, izmantojot kristālvioletā metodi

Baktēriju spēja veidot biofilmu tika noteikta, izmantojot 96 bedrīšu mikroplati. Sākotnēji tika izdalīta baktēriju tīrkultūra, tad 3–5 morfoloģiski līdzīgas baktēriju kolonijas kultivēja šķidrā barotnē 16–18 stundas. Pēc kultivēšanas tika veidota baktēriju suspensija šķidrā buljona barotnē ar atšķaidījumu 1:100, iegūstot gala koncentrāciju $1-3 \times 10^7$ KVV/ml. Izmantojot multikanālu pipeti, kultūras tika pārnestas 96 bedrīšu platē, katrā bedrītē iepildot 200 µl iepriekš pagatavotās suspensijas. Vienai baktērijai tika izmantotas vismaz astoņas bedrītes. Katrā mikroplatē tika iekļauta negatīvā kontrole – sterila atbilstošā kultivēšanas buljona barotne (vismaz astoņas bedrītes). Biofilmu produkcijai mikroplates tika inkubētas 37 °C (*E. coli* un *S. aureus*) un 35 °C (*P. aeruginosa*) 2–48 stundas atbilstoši izvēlētajam mērķim. Pēc inkubācijas perioda mikroplatēs saaugušās planktoniskās šūnas tika nolietas, tad mikroplašu bedrītes skalotas ar multikanālu pipeti divas reizes ar 250 µl fizioloģiskā šķīduma. Pēc skalošanas veikta biofilmas krāsošana ar 200 µl 0,1 % kristālvioletā šķīduma 15–20 minūtes. Tad tika atkārtota mikroplašu skalošana, uzpildot katru bedrīti ar 250 µl destilēta ūdens trīs reizes. Kā biofilmu atkrāsotājs tika izmantots 96 % etanola šķīdums, kurš tika uzpildīts (200 µl). Rezultāta izvērtēšanai tika mērīts krāsoto biofilmu optiskais blīvums, izmantojot *TECAN INFINITE F50* optiskā blīvuma mērītāju baktērijai atbilstošā viļņu garumā. Par baktēriju augšanas robežvērtību tika izmantota OD vērtība, kura bija lielāka par 0,1.

1.3.9. Biofilmas produkcijas optiskā blīvuma interpretācija

Biofilmas producēšana tika vērtēta kvantitatīvi, kā arī dažādās pakāpēs, salīdzinot ar negatīvo kontroli, kuras definējis *Stepanovic et al.* (40). Baktēriju biofilmas veidošanās spējas rezultāts tika izvērtēts, ņemot vērā vidējo aprēķināto baktērijas izolāta optiskā blīvuma vērtību (ODs). ODc – optiskā blīvuma robežvērtība, kuru aprēķina kā vidējo visu mērījumu negatīvās kontroles vērtību vienā mikroplatē + 3 standarta deviācijas (SD) no negatīvās kontroles.

1.1. tabula

Biofilmas produkcijas pakāpes iedalījums

Vidējā kultūras OD vērtība	Biofilmas produkcijas pakāpe
$ODs \leq ODc$	Nevēro
$ODc < ODs \leq 2 \times ODc$	Vāja
$2 \times ODc < ODs \leq 4 \times ODc$	Vidēja jeb mērena
$4 \times ODc < ODs$	Izteikta

OD, optiskais blīvums; ODc, optiskā blīvuma robežvērtība; ODs, baktērijas izolāta optiskais blīvums.

1.3.10. Baktēriju augšanas inhibīcijas, minimālās inhibējošās koncentrācijas (MIC), minimālās biofilmas eradikācijas koncentrācijas (MBEC) un biofilmas profilaktiskās koncentrācijas noteikšana (BPC) biofilmu modeļos

Bakteriofāgu un antibiotiku iedarbības izvērtēšanai baktēriju biofilmās tika izmantota modificēta Kalgarī metode (41-43). Baktēriju kultūras inkubēja 16–18 h TSA platēs, kolonijas ielēja šķidrā buljonā un sagatavoja atšķaidījumu, lai sasniegtu inokulāta koncentrāciju $1,0 \times 10^7$ KVV/ml. Sterilā 96 bedrīšu plakandibena mikroplatē (*Nunc™ MicroWell™ 96-Well*, *Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate*, *Thermo Fisher Scientific*, Roskilde, Dānija) tika iepildīts sagatavotais baktēriju inokulāts, 150 µl katrā bedrītē. Pēc tam 96 bedrīšu mikroplate tika slēgta ar 96 bedrīšu vāciņu ar tapām (*Nunc™ Immuno*

TSP Lids) un inkubēta 24 h rotējošā galda inkubatorā (*InforsTM HT Ecotron*, Bāzele, Šveice) 35 °C temperatūrā, 150 apgr./min.

Pēc tam, kad biofilma bija izveidojusies, mikroplates vāciņš ar tapām tika pārlikts jaunā 96 bedrīšu mikroplatē, kur katrā iedobē bija 200 µl buljona ar vēlamu antibiotiku, fāgu vai to kombināciju. Pēc izvēlēta inkubācijas perioda tika mērīts mikroplates bedrīšu optiskais blīvums. Iegūtā vērtība antibiotikām atspoguļoja MIC, bet fāgiem un antibiotiku–fāgu kombinācijai baktēriju augšanas inhibīciju, kuru rezultātos salīdzināšanas nolūkā arī apzīmē kā MIC. Lai palielinātu fāgu iedarbību *P. aeruginosa*, vāks ar tapām tika pārvietots uz jaunu 96 bedrīšu mikroplati ar tādiem pašiem fāgiem un/vai antibiotikām un to koncentrācijām tālākai 12 h inkubācijai. Pēc tam vāku ar tapām ievietoja svaigā 96 bedrīšu mikroplatē, kur katrā bedrītē bija 200 µl sterila buljona. Lai noņemtu izveidojušos biofilmu no tapām, mikroplati ar vāku ievietoja sonifikatorā uz 25–30 min. 44 Hz frekvencē, izmantojot ultraskaņas vannu (modelis 08855-02, *Cole-Parmer*, *Vernon Hills*, IL, ASV). Izdzīvojošo baktēriju audzēšanai mikroplate tika pārklāta ar sterilu vāciņu bez tapām un inkubēta 22 h stacionāri 35 °C temperatūrā. Pēc tam tika noteikta minimālā biofilmas eradikācijas koncentrācija (MBEC), mērot mikroplates optisko blīvumu. Biofilmu profilakses koncentrāciju (BPC) noteica, vienlaikus inokulējot baktērijas, fāgus un antibiotikas to attiecīgajās koncentrācijās, uzreiz uzliekot mikroplatēm vāku ar tapām.

1.3.11. Baktēriju jutības izmaiņu un rezistences noteikšana pret bakteriofāgiem biofilmu modeļos

Lai pārbaudītu fāgu jutības izmaiņas, baktēriju kultūras no biofilmu modeļiem 96 bedrīšu mikroplatēs tika kultivētas uz cietām barotnēm. Nejaušas izlases veidā tika ņemtas divdesmit divas baktēriju kultūras, kurās tika izmantots pacienta *P. aeruginosa* PAP01 izolāts. Izaudzētajām baktērijām tika noteikta

bakteriofāgu jutība, izmantojot divslāņu agara punktu metodi (sk. 1.3.5. apakšnodaļu).

Robežvērtību fāgu rezistences noteikšanai aprēķināja, izmantojot pozitīvo kontroli (tikai baktērijas) atbilstoši 1.2. formulai.

$$OD_R = OD_{PC} - (3 \times SD_{PC}) \quad (1.2.)$$

OD_R – aprēķinātā robežvērtība, kura definē bakteriofāgu rezistences esamību

OD_{PC} – pozitīvās kontroles mērījumu vidējā optiskā blīvuma vērtība

SD_{PC} – pozitīvās kontroles mērījumu aprēķinātā standartdeviācija

Baktērijas klons ($OD_{bedrīte}$) tika uzskatīts par rezistentu pret bakteriofāgu, ja tās izmērītais optiskais blīvums bija lielāks vai vienāds ar aprēķināto rezistences robežvērtību (OD_R). Lai atspoguļotu attiecību starp izmērīto vidējo optisko blīvumu izolāta klonam mikroplates bedrītē ($OD_{bedrīte}$) salīdzinājumā ar aprēķināto rezistences optiskā blīvuma robežvērtību (OD_R), tika izmantota 1.3. formula.

$$OD_{attiecība} = OD_{bedrīte} / OD_R \quad (1.3.)$$

$OD_{bedrīte}$ – izaudzētās baktērijas izolāta klona optiskā blīvuma vērtība

OD_R – aprēķinātā robežvērtība, kura definē bakteriofāgu rezistences esamību

Ja vērtība bija mazāka par 1, baktērijas netika uzskatītas par rezistentām, bet, ja vērtība bija lielāka vai vienāda ar 1, baktērijas tika uzskatītas par rezistentām pret fāgu.

1.3.12. Datu statistiskā analīze

Datu statistisko analīzi veica, izmantojot *Microsoft Excel 2016*, *IBM SPSS Statistics 27*. versijas, kā arī *Graph Pad Prism 9*. versijas datorprogrammas.

Visiem kvantitatīvajiem mērījumiem tika aprēķināts un atspoguļots izlases vidējais aritmētiskais lielums un aprēķināta standartnovirze (SD) ar datu izkliedes diapazonu 95 %. Nepārtraukto datu normālsadalījumu vērtēja, izmantojot Šapiro-Vilka (*Shapiro-Wilk*) un Kolmogorova-Smirnova (*Kolmogorov-Smirnov*) testus. Parametrisko datu analīzei divu izlašu salīdzināšanai izmantoja t-testu, trīs vai vairāk izlašu salīdzināšanai *one way ANOVA* testu. Neparametrisko datu analīzei divu izlašu salīdzināšanai izmantoja Manna-Vitnija (*Mann-Whitney U*) testu, trīs vai vairāku izlašu salīdzināšanai Kruskola-Volisa (*Kruskal-Wallis*) testu. Noraidot nulles hipotēzi un konstatējot būtiskas atšķirības starp grupām, tika veikta vairāku pāru salīdzināšana, izmantojot *post-hoc* analīzi ar Tukeja (*Tukey*) testu. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski ticamiem, ja p vērtība bija mazāka par 0,05.

Klīnisko iznākumu riska aprēķināšanai peritoneālās dialīzes pacientiem tika aprēķināts relatīvais risks (RR) ar 95 % ticamības intervālu.

2. Rezultāti

2.1. Bakteriofāgu efekts *S. aureus* kultūrās peritoneālās dialīzes pacientiem

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Kārļa Rāceņa, Jutas Kroičas, Daces Rezevskas, Laura Avotiņa, Edgara Šķudiša, Annas Popovas, Ilzes Puides, Viktorijas Kuzemas un Aivara Pētersona publikācijā *S. aureus Colonization, Biofilm Production, and Phage Susceptibility in Peritoneal Dialysis Patients*. *Antibiotics* (Basel). 2020 Sep 7;9(9):582. doi: 10.3390/antibiotics9090582.

2.1.1. Iekļauto pacientu raksturojums

Septiņdesmit vienam peritoneālās dialīzes pacientam tika veikti skrīninga izmeklējumi *S. aureus* nēsāšanas noteikšanai. Pētījumā tika iekļauti septiņdesmit pacienti, jo vienam pacientam ar ievietotu PD katetru dialīze nebija uzsākta. No visiem pacientiem 51 % (n = 36) bija vīrieši, bet 49 % (n = 34) sievietes, vidējais vecums 59,96 gadi (SD 15,9).

Terminālas nieru slimības iemesli pētījuma grupā bija šādi: glomerulonefrīts (40 %, n = 28), diabētiska nefropātija (14,3 %, n = 10), hronisks intersticiāls nefrīts (20 %, n = 14), autosomāli dominanta nieru policistoze (ADNP) (10 %, n = 7), hipertensīva nefropātija (12,9 %, n = 9) un nezināms (2,9 %, n = 2).

S. aureus nēsātāji bija 30 % pacientu (n = 21). No tiem 71,4 % nēsātāju bija vīrieši (n = 15) un 28,6 % sievietes (n = 6). Starp *S. aureus* nēsātājiem un nenēsātājiem statistiski ticamas atšķirības klīniskajos parametros netika novērotas, vērtējot blakusslimības, kā hroniska sirds mazspēja (HSM), vīrushepatīts, podagra, hroniska obstruktīva plaušu slimība (HOPS) ($p > 0,05$). Atzīmējams, ka cukura diabēts nēsātāju grupā bija 28,6 % (n = 6), salīdzinot tikai ar 10,2 % nenēsātāju grupā (n = 5), ($p = 0,05$). Pirms pētījuma un pētījuma

laikā neviens no pacientiem nelietoja lokālo antibakteriālo terapiju, kā mupirocīnu un hlorheksidīnu *S. aureus* dekolonizācijai. Vidējais pacientu novērošanas ilgums pētījumā nenēsātāju grupā bija 16,61 mēnesis, bet nēsātāju grupā – 13,95 mēneši.

2.1.2. Klīniskie iznākumi *S. aureus* nēsātājiem un nenēsātājiem

Pētījuma laikā tika konstatēti 32 peritonīti (78,1 %, n = 25 nenēsātāju grupā; 21,9 %, n = 7 nēsātāju grupā). Nēsātāju grupā peritonītu ierosināja šādi mikroorganismi: jaukta kultūra, meticilīna jutīgais *S. aureus* (MSSA, angļiski *methicillin-susceptible S. aureus*) / *Pseudomonas spp.* (14,3 %, n = 1), *Streptococcus spp.* (42,9 %, n = 3) un neidentificētas baktērijas (42,9 %, n = 3). Nenēsātāju grupā ierosinātāji bija *Streptococcus spp.* (36 %, n = 9), neidentificētas baktērijas (28 %, n = 7), MSSA (8 %, n = 2), kā arī pa vienam (4 %, n = 1) no šādiem: *Aerococcus spp.* kopā ar *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Candida spp.*, *Enterococcus spp.*, *Aeromonas spp.*, meticilīna jutīgais koagulāzi negatīvais *Staphylococcus* un meticilīna rezistentais koagulāzes negatīvais *Staphylococcus*.

Peritonītu kopējā sastopamība bija 0,35 epizodes vienā pacientgadā. Nenēsātāju grupā 0,37 epizodes vienā pacientgadā, bet nēsātāju grupā 0,29 epizodes vienā pacientgadā.

Nāve kā iznākums tika konstatēta 31,1 % (n = 8) nēsātāju un 16,3 % (n = 8) nenēsātāju. Tika konstatēta tendence, ka nāves risks nēsātāju grupā bija 2,33 reizes lielāks nekā nenēsātāju grupā, klīniskie rezultāti un to RR ir atspoguļoti 2.1. tabulā.

Divu gadu klīniskie iznākumi *S. aureus* nēsātājiem un nenēsātājiem

Klīniskie iznākumi	<i>S. aureus</i> nēsātāji	<i>S. aureus</i> nenēsātāji	Kopā	RR	CI 95 %
Pacientu skaits	30,0 % (n = 21)	70,0 % (n = 49)	100 % (n = 70)	–	–
Nāve	31,1 % (n = 8)	16,3 % (n = 8)	22,9 % (n = 16)	2,33	1,01–5,38
Transplantācija	28,6 % (n = 6)	18,4 % (n = 9)	21,4 % (n = 15)	1,56	0,63–3,81
PD katetra izņemšana	0 % (n = 0)	20,4 % (n = 10)	14,3 % (n = 10)	–	–
Peritonīts	19,1 % (n = 4)	34,7 % (n = 17)	30,0 % (n = 21)	0,55	0,21–1,44

2.1.3. Izdalīto *S. aureus* antibakteriālā jutība un biofilmas veidošanas spēja

Kopumā no 213 pacientu paraugiem tika izdalīti 34 *S. aureus* celmi, no kuriem visi bija jutīgi pret biežāk lietotajām antibiotikām (cefoksitīnu, ciprofloksacīnu, sulfametoksazolu/trimetoprimu, klindamicīnu, gentamicīnu, tetraciklīnu, rifampicīnu), divi celmi bija rezistenti pret eritromicīnu. Nevieni no izolētajiem celmiem nebija rezistents pret metilcīnu. Visbiežāk *S. aureus* kolonizācija tika konstatēta deguna dobumā (53 %, n = 18) (skatīt 2.2. tabulu). Visu pētījumā iekļauto *S. aureus* antibakteriālās jutības dati un biofilmu produkcijas vidējie OD lielumi ir atspoguļoti 3. pielikumā.

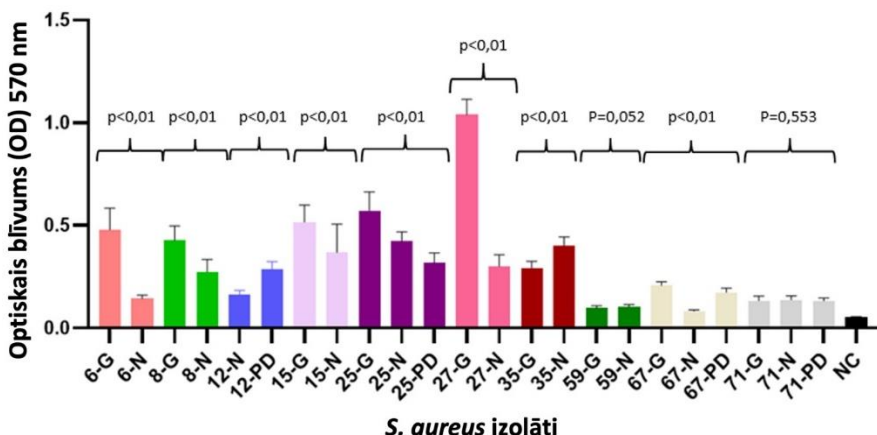
Visas izolētās *S. aureus* kultūras spēja veidot biofilmu. Visbiežāk *S. aureus* izolāti veidoja izteiktu biofilmu (21, 61,8 %), mērenas un vājas biofilmas veidošanas spēja tika novērota 10 (29,4 %) un 3 (8,8 %) kultūrām. Piecpadsmit no divdesmit viena pacienta, kurš bija *S. aureus* nēsātājs, vismaz vienā no uzsējuma ņemšanas vietām vēroja kultūru, kura bija spēcīga biofilmas veidotāja (skatīt 2.2. tabulu). Salīdzinot biofilmas veidošanas spēju *S. aureus* izolātiem, kuri izdalīti no viena pacienta dažādām uzsējuma ņemšanas vietām,

vēroja, ka astoņiem no desmit pacientiem izdalīta *S. aureus* izolātu biofilmas veidošanās spēja būtiski atšķīrās ($p < 0,01$) (skatīt 2.1. attēlu).

2.2. tabula

S. aureus biofilmu veidošanās spēja

		<i>S. aureus</i> nēsāšanas vieta, kods un biofilmas produkcijas pakāpe		
		Deguns	Cīrksnis	PDK
		18 (53 %)	11 (32 %)	5 (15 %)
Biofilmas produkcijas pakāpe, n	Vāja	2	1	–
	Mērena	6	2	2
	Izteikta	10	8	3



2.1. attēls. 23 *S. aureus* izolātu biofilmas veidošanās spēja 96 bedrīšu mikroplatēs*

* Stabiņi atspoguļo katra izolāta vidējo OD vērtību (mērīta 570 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona OD vidējo vērtību.

2.1.4. *S. aureus* bakteriofāgu jutība un fāgu adaptācijas rezultāti

No visiem septiņiem bakteriofāgu kokteiļiem stafilokoku bakteriofāgam (*Eliava*) sākotnējais titrs bija 10^4 PFU/ml, bet *Pyo*, *Enko*, *Intesti* bakteriofāgiem (*Eliava*) un *Pjobakteriofag* (*Microgen*), izmantojot *S. aureus* ATCC 4336, titrs

bija 10^5 PFU/ml. Tikai *Ses* un *Fersisi* bakteriofāgiem (*Eliava*) oriģinālais titrs, izmantojot *S. aureus* ATCC 4336, bija 10^6 PFU/ml.

Pēc bakteriofāgu kokteiļu pavairošanas, izmantojot *S. aureus* ATCC 4336 visiem fāgu preparātiem, izņemot vienu, tika sasniegta koncentrācija 10^9 PFU/ml, proti, *Pyo*, *Ses*, *Fersisi*, *Intesti* un *Pyobacteriophag* kokteiļiem. Savukārt stafilokoku bakteriofāgam (*Eliava*) titrs pieauga līdz 10^7 PFU/ml. Pirms fāgu lītiskās aktivitātes noteikšanas pret *S. aureus* izolātiem visi fāgu titri tika vienādoti, tos atšķaidot līdz 10^7 PFU/ml.

Izmantojot 34 *S. aureus* izolātus, tika novērots pozitīvs lītiskais efekts visiem bakteriofāgiem, izņemot stafilokoku (*Eliava*) bakteriofāgu. Pret to bija rezistenti deviņi (26 %) no 34 *S. aureus* izolātiem, kā arī vāju lītisko efektu ar atsevišķiem plakiem vēroja diviem izolātiem. Tāpēc bakteriofāgu adaptācija tika veikta, izmantojot stafilokoku (*Eliava*) bakteriofāgu un rezistentos vai ar vāju lītisko efektu esošos *S. aureus* izolātus.

Bakteriofāgu Itriskais spektrs *S. aureus* izolātos

Fāgu Itriskā aktivitāte	Staffilokoku (<i>Elavv</i>) fāgs		<i>Pyo</i> , n (%)	<i>Ses</i> , n (%)	<i>Fersisi</i> , n (%)	<i>Enko</i> , n (%)	<i>Intesti</i> , n (%)	<i>Pyobacteriophag</i> , n (%)
	Pirms adaptācijas, n (%)	Pēc adaptācijas, n (%)						
CL (++++)	4 (12)	0 (0)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (0)	0 (0)
SCL (++)	19 (56)	11 (100)	31 (91)	32 (94)	33 (97)	32 (94)	34 (100)	31 (91)
IP vai PL (+)	2 (6)	0 (0)	1 (3)	2 (6)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	3 (9)
R (-)	9 (26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Fāgu adaptācijai izmantoja stafilokoku bakteriofāgu (*Eliava*) pret 11 *S. aureus* izolātiem, kuri uzrādīja rezistenci vai vāju lītisko efektu (9 ar rezistenci un 2 ar atsevišķiem plakiem). Visos gadījumos adaptācijas procedūras rezultātā tika pārvarēta baktēriju rezistence vai tika pastiprināts fāgu lītiskais efekts. Visiem 11 baktēriju izolātiem (100 %) pēc adaptācijas tika novērota daļēja līze (++) (skatīt 2.3. tabulu).

2.2. Bakteriofāgu efekts uropatogēnās *E. coli* planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Laimas Mukānes, Kārļa Rāceņa, Daces Rezevskas, Aivara Pēterona un Jutas Kroičas publikācijā *Anti-Biofilm Effect of Bacteriophages and Antibiotics against Uropathogenic Escherichia coli*. Antibiotics (Basel). 2022 Nov 26;11(12):1706. doi: 10.3390/antibiotics11121706.

2.2.1. *E. coli* biofilmas veidošanas spēja

Pieci *E. coli* izolāti bija būtiski biofilmas producētāji, tos salīdzinot pret negatīvo kontroli ($p < 0,001$). Divi izolāti 021ur (mērens biofilmas veidotājs) un 01206ur (izteikts biofilmas veidotājs) uzrādīja visspēcīgāko biofilmas veidošanas spēju, tāpēc tie tika izmantoti tālākai MIC un MBEC testēšanai ar bakteriofāgiem. Pārējie izolāti (01032ur, 01081ur, 01168ur) bija vāji biofilmas veidotāji, savukārt 01108ur izolāts biofilmu neveidoja.

2.2.2. *E. coli* antibakteriālā un bakteriofāgu jutība

Izolētajām *E. coli* kultūrām tika vērota atšķirīga jutība pret antibakteriālām vielām (skatīt 2.4. tabulu). No sešiem baktēriju celmiem 01081UR un 01108UR bija jutīgi pret visiem pārbaudītajiem antibakteriālajiem

līdzekļiem; 01032UR bija ar visplašāko antibakteriālo rezistenci, tas bija rezistents pret sešiem antibakteriālajiem līdzekļiem un bija ESBL producējošs; 021UR un 01206UR bija rezistenti pret trim antibakteriālajiem līdzekļiem; 01168UR bija rezistents pret diviem antibakteriālajiem līdzekļiem.

Bakteriofāgu kokteiļa *Ses* sākotnējais titrs bija 4×10^5 PFU/ml, *Intesti* 7×10^5 PFU/ml un *Pyobacteriophag* 3×10^6 PFU/ml, titru nosakot *E. coli* ATCC 29522 references celmā. Pēc fāgu kokteiļa pavairošanas uz tā paša references celma titrs *Ses*, *Intesti* un *Pyobacteriophag* pieauga, attiecīgi līdz 4×10^6 , 1×10^8 un 4×10^6 PFU/ml. Dati par baktēriju celmu jutību pret fāgiem ir apkopoti 2.4. tabulā.

E. coli izolāts 021UR bija visjutīgākais pret visiem fāgu kokteiļiem, uzrādot daļēju līzi, izmantojot *Ses* un *Pyobacteriophag*, un pilnu līzi, izmantojot *Intesti* fāgu kokteili. Vismazākā fāgu preparātu jutība tika novērota 01108UR un 01206UR izolātiem. 01108UR bija rezistents pret *Intesti* un *Pyobacteriophag* un vāji jutīgs pret *Ses* fāgu kokteiļiem. Izolāts 01206UR bija rezistents pret *Ses* un *Intesti* fāgu kokteiļiem un vāji jutīgs pret *Pyobacteriophag*. Lai uzlabotu *Pyobacteriophag* preparāta lītisko efektivitāti 01206UR izolātā, tika veikta fāgu adaptācija, jo šis celms tika izvēlēts tālākai fāgu un biofilmu mijiedarbības testēšanai. Pēc *Pyobacteriophag* adaptācijas tā titrs palielinājās līdz 7×10^7 PFU/ml. Lai veiktu fāgu jutības izvērtēšanu, tā titrs tika pielīdzināts pārējiem testējamiem fāgu preparātiem, respektīvi, 10^6 PFU/ml. Pēc adaptācijas tika novērtēta *Pyobacteriophag* efekta uzlabošanās 01206UR, lītiskais efekts no vāja (+) pieauga līdz pilnai līzei (++) (skatīt 2.4. tabulu).

***E. coli* antibakteriālā un fāgu jutība**

Antibiotikas, fāgs	021UR	01032UR	01081UR	01108UR	01168UR	01206UR
AMP	R	R	S	S	R	R
AMC	R	R	S	S	S	S
TZP	S	I	S	S	S	S
CTX	S	R	S	S	S	S
CAZ	S	R	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S
MEM	S	S	S	S	S	S
CIP	S	R	S	S	S	R
NOR	S	N/A	N/A	N/A	S	R
GEN	S	R	S	S	S	S
SXT	R	S	S	S	R	S
NIT	S	S	S	S	S	S
ESBL	–	Producē	–	–	–	–
<i>Ses</i>	++	+	++	+	++	–
<i>Intesti</i>	+++	+	++	–	+	–
<i>Pyobacteriophag</i>	++	+	+	–	+	+
<i>Pyobacteriophag</i> *	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+++

S – jutīgs; R – rezistents, I –jutīgs paaugstinātā devā; +++ CL; ++ SCL; + IP vai PL; ampicilīns (AMP); amoksicilīns/klavulanāts (AMC); piperacilīns/tazobaktāms (TZP); cefotaksīms (CTX); ceftazidīms (CAZ); imipenēms (IMP); meropenēms (MEM); ciprofloksacīns (CIP); norfloksacīns (NOR); gentamicīns (GEN); sulfametoksazols/trimetoprimis (SXT); nitrofurantoīns (NIT); paplašināta spektra beta-laktamāze (ESBL); * *Pyobacteriophag* preparāts pēc adaptācijas; nav attiecināms (N/A).

2.2.3. Ciprofloksacīna un amoksicilīna/klavulanāta efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

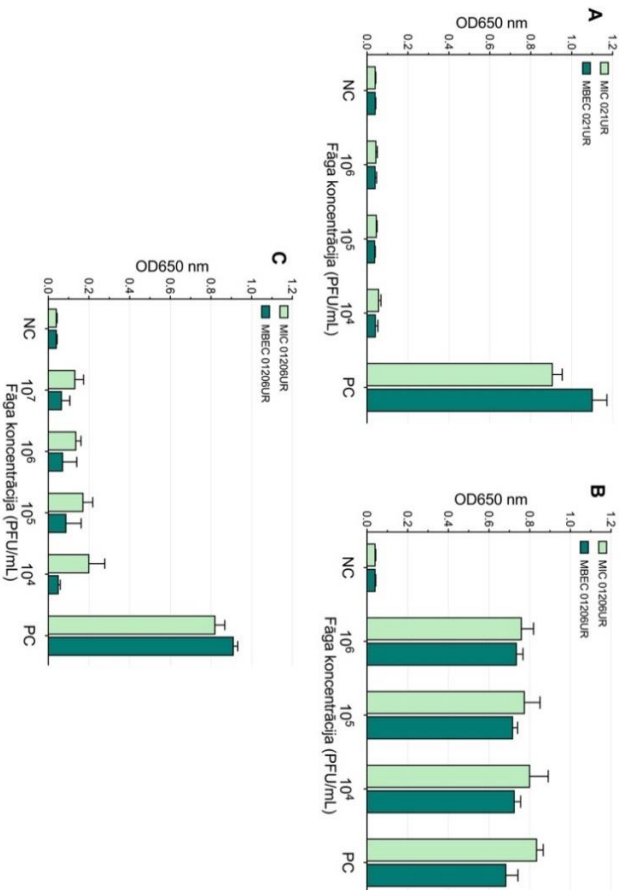
Atbilstoši EUCAST standartam amoksicilīna/klavulanāta un ciprofloksacīna MIC vērtības ir attiecīgi 8 mg/L un 0,25 mg/L. *E. coli* 021UR bija rezistents pret amoksicilīnu/klavulanātu (skatīt 2.4. tabulu), un MIC vērtība tika sasniegta tikai koncentrācijā 256 mg/L, bet MBEC netika sasniegta pat augstākajā izmantotajā koncentrācijā (1024 mg/L). Ciprofloksacīna MIC vērtība tika sasniegta pie 0,25 mg/L, bet tika vērota rezistence pret to baktērijas biofilmā,

jo MBEC vērtība bija 64 mg/L. Lai gan izolāts 01206UR bija jutīgs pret amoksicilīnu/klavulanātu un MIC, vērtība bija 8 mg/ml, šī antibiotika nespēja efektīvi iedarboties uz baktērijas biofilmu, jo MBEC netika sasniegts pat augstākajā izmantotajā koncentrācijā 1024 mg/L. Izolāts 01206UR bija rezistents pret ciprofloksacīnu (skatīt 2.4. tabulu), līdz ar to nebija pārsteidzoši, ka MIC vērtība bija 128 mg/L, bet MBEC vērtība netika sasniegta pat pie 1024 mg/L. Tas liecina, ka arī ciprofloksacīns nespēja iznīcināt baktērijas noformētajā baktērijas biofilmā. Neatkarīgi no iepriekš noteiktās (disku difūzijas tests, rezultāti atspoguļoti 2.4. tabulā) antibakteriālās jutības abām antibiotikām netika novērota spēja iznīcināt biofilmā esošās *E. coli* šūnas, savukārt iegūtās MIC vērtības sakrīta ar antibakteriālās jutības datiem, kuri tika iegūti disku difūzijas metodē.

2.2.4. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

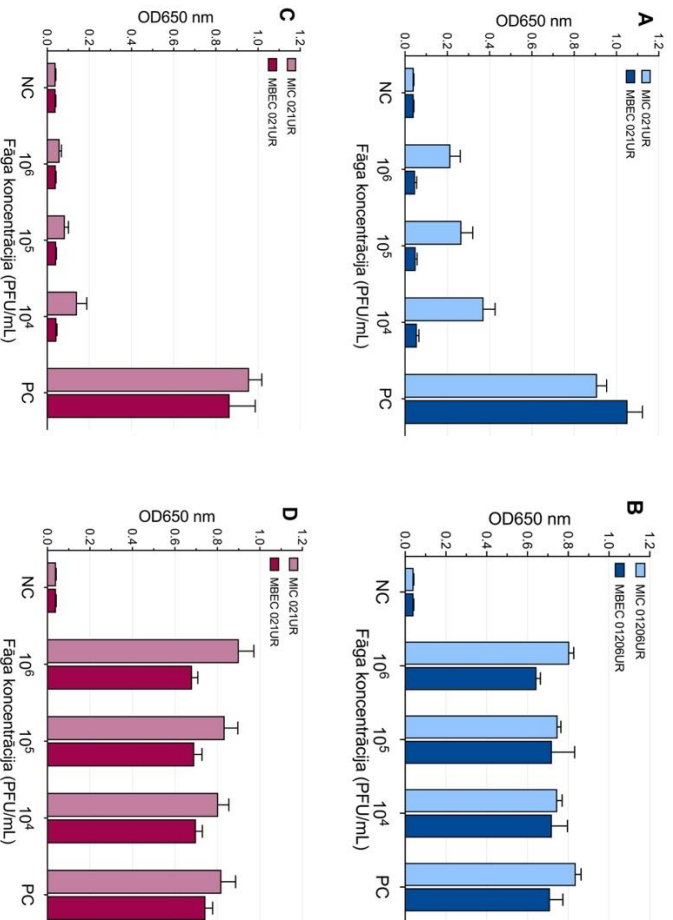
Fāgu MIC un MBEC testu vidējās vērtības ir norādītas 2.2., 2.3. attēlā. Baktērija bija jutīga pret fāgu, ja OD vērtības bija $< 0,1$, rezultātu mērot 650 nm viļņu garumā, vai ja rezultāts bija tuvu negatīvai kontrolei. Izmantojot fāgus, *E. coli* izolāta 021UR augšana salīdzinājumā ar pozitīvo kontroli samazinājās visos gadījumos gan planktoniskās šūnās (MIC), gan biofilmā esošās baktērijās (MBEC). Visos gadījumos tika novērots statistiski ticams bakteriofāgu lītiskais ($p < 0,01$) efekts neatkarīgi no lietotās bakteriofāgu koncentrācijas. Lītiskais efekts nebija pietiekams, lai secinātu, ka biofilmā esošo šūnu augšana ir pilnībā nomākta ar *Ses* un *Intesti* fāgiem. Pilnīgu *E. coli* šūnu iznīcināšanu vēroja, izmantojot *Pyobacteriophag* preparātu visās tā koncentrācijās. Otram *E. coli* izolātam 01206UR tika vērota rezistence pret visiem trim fāgu kokteiļiem (*Pyobacteriophag*, *Ses* un *Intesti*), kas bija sagaidāms, jo fāgu jutības testā (skatīt 2.4. tabulu) jau tika vērota rezistence pret *Ses* un *Intesti* fāgu preparātiem.

Savukārt *Pyobacteriophag* preparātam, kuram novēroja vāju lītisko efektu un tika veikta tā adaptācija efekta uzlabošanai, konstatēja, ka pēc adaptācijas baktēriju augšana visās fāga koncentrācijās ievērojami samazinājās gan planktoniskās (MIC), gan biofilmu veidojošajās šūnās (MBEC), $p < 0,01$. Tomēr OD vērtības attiecībā uz MIC bija nedaudz virs 0,1, kas ir sagaidāms, jo MIC vērtība tiek standartā izmantota vielām, nevis dzīvām būtnēm, šajā gadījumā vīrusiem. Rezultāti parādīja, ka, veicot adaptāciju, var uzlabot bakteriofāgu efektu un pārvarēt to rezistenci (skatīt 2.2. attēlu).



2.2. attēls. *Pyobacteriophage* fāga MIC un MBEC 021UR (A), 01206UR pirms adaptācijas (B) un 01206UR pēc adaptācijas (C)*

* Stabini atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību, izmantojot dažādas fāga koncentrācijas (mērita 650 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona, PC atspoguļo pozitīvās kontroles jeb tikai baktērijas OD vidējo vērtību.



2.3. attēls. *Ses* (A, B) un *Intesii* (C, D) fāgu MIC un MBEC 021UR (A, C), 01206UR (B, D)*

* Stabīni atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mēriņa 650 nm), NC atspoguļo negatīvās kontroles jeb tikai buljona, PC atspoguļo pozitīvās kontroles jeb tikai baktērijas OD vidējo vērtību.

2.3. Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezidenta *Pseudomonas aeruginosa* augšstilba osteomielīta ārstēšanā

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Kārļa Rāceņa, Daces Rezevskas, Montas Madelānes, Ervīna Lavrinoviča, Sarah Djebara, Aivara Pētersona un Jutas Kroičas publikācijā *Use of Phage Cocktail BFC 1.10 in Combination With Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Femur Osteomyelitis-A Case Report*. Front Med (Lausanne). 2022 Apr 25;9:851310. doi: 10.3389/fmed.2022.851310.

2.3.1. Pacienta gadījuma raksturojums

2018. gada jūlijā 21 gadu vecs vīrietis tika stacionēts slimnīcā pēc ceļu satiksmes negadījuma ar vaļēju, šķembainu acetabulāru un labā augšstilba proksimālās segmenta lūzumu, labā apakšdelma plēstu brūci un hemorāģisku šoku. Pacientam 14. jūlijā tika veikta nekrotisko audu evakuācija veselo audu robežās (debridments), fasciotomija, labā augšstilba kaula stabilizācija ar gamma naglu, kā arī audu rekonstrukcija. Pacientam pēc operācijas attīstījās sekundāra multirezidenta (MDR, angļiski *multidrug-resistant*) *P. aeruginosa*, karbapenēmu rezistenta *Acinetobacter baumannii* un vankomicīna rezistenta *Enterococcus faecium* (VRE) ierosināta brūču infekcija un multiorgānu disfunkcijas sindroms. Pacientam tika veiktas piecas operācijas ar debridmentu un terapija, izmantojot brūču vakuuma sistēmu. Pacients saņēma plaša spektra intravenozu antibakteriālu terapiju ar meropenēmu, kolistīnu, piperacilīnu/tazobaktāmu, linezolidu un flukonazolu, kā arī pacientam tika veikta nieru aizstājterapija. Neatkarīgi no lietotās ārstēšanas pacientam attīstījās ar osteosintēzi saistīta infekcija un osteomielīts, izdalījumos no brūcēm atkārtoti auga multirezistentas baktērijas VRE, MDR *P. aeruginosa* un MDR *A. baumannii*. Lai nodrošinātu tālāku ārstēšanu, 13. augustā tika izņemta gamma nagla, veikta augšstilba kaula proksimālā segmenta rezekcija, kam sekoja audu

rekonstrukcija un apakšstilba ārēja fiksācija. Balstoties uz ierosinātāju antibakteriālo jutību, terapija tika mainīta uz intravenozu fosfomicīnu, meropenēmu un kolistīnu. Dinamikā tika vērots klīnisks uzlabojums, un 13. septembrī, izmantojot audu lēveri, tika slēgta labā augšstilba brūce. Pacienta stāvoklis pakāpeniski uzlabojās, netika novērotas sistēmiska vai lokāla iekaisuma pazīmes. Atkārtotos brūču uzsējumos baktēriju augšanu nekonstatēja. Slimnieks tika izrakstīts 15. oktobrī un turpināja ambulatori saņemt intravenozu meropenēma un kolistīna terapiju, kas tika pārtraukta pēc divām nedēļām, jo attīstījās akūta nieru mazspēja, domājams, kolistīna izraisīts tubulārs bojājums. Novembrī pacientam parādījās strutaini izdalījumi no labā augšstilba. Datortomogrāfija ar kontrastvielas ievadi brūces atverē norādīja uz fistulas izveidošanos, kura savieno labā augšstilba galviņu un ādas virsmu augšstilba laterālajā augšējā trešdaļā. Pacientam tika veikta fistulotomija, no iegūtā brūces materiāla atkārtoti izauga MDR *P. aeruginosa* un VRE. Ņemot vērā aizdomas par atkārtotu augšstilba kaula osteomielītu, tika plānota divu etapu operācija, lai saglabātu gūžas locītavas endoprotezēšanas iespēju nākotnē. Lai panāktu pēc iespējas labāku klīnisko iznākumu, tika nolemts lietot bakteriofāgu terapiju kopā ar ķirurģisku un antibiotisku ārstēšanu. Sadarbībā ar Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcu Briselē, Beļģijā, tika plānota lītiskā bakteriofāgu kokteiļa BFC 1.10 izmantošana, kura sastāvā ir fāgi, ar lītisko aktivitāti pret *P. aeruginosa* un *S. aureus*.

2.3.2. Fāgu terapijas izmantošana, pacienta tālākā ārstēšana, izmeklēšana un terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts

Bakteriofāgu eksperimentālā izmantošana tika veikta atbilstoši Helsinku deklarācijas 37. paragrāfam (51). Pirms terapijas uzsākšanas tika saņemta rakstiska piekrišana no pacienta par fāgu terapijas lietošanu.

5. decembrī pacientam tika veikta augšstilba galviņas rezekcija un defekta aizpildīšana ar kolistīnu impregnētu cementa materiālu. Atkārtoti tika ņemti uzņēmumi, kuros no proksimālās augšstilba kaula daļas izauga MDR *P. aeruginosa*, VRE un *Staphylococcus epidermidis*. Histoloģiska un vizuāla intraoperatīvā atrade apstiprināja augšstilba galviņas osteomielītu ar fistulu. Pēc operācijas pacients septiņas dienas saņēma intravenozi kolistīnu un 23 dienas linezolidu. 7. decembrī Rīgas Stradiņa universitātē tika saņemts BFC 1.10 fāgu kokteilis 2000 ml ar koncentrāciju 10^7 PFU/ml katram kokteili esošajam fāgam. Sterilos apstākļos tika sagatavoti sterili konteineri ar 30, 40 vai 50 ml fāgu šķīdumu. Trīs dienas pirms operācijas pacientam tika uzsākta terapija ar intravenozu ceftazidīma/avibaktāma ievadi, ko pacients turpināja saņemt kopā 15 dienas.

13. decembrī tika veikta operācija, kurā tika izņemts iepriekš ievietotais kolistīnu saturošais kaulu cements, paņemti uzņēmumi no dažādām brūces vietām, kuri bija pozitīvi, arī uzņēmums no acetabulārās virsmas bija pozitīvs, uzņēmumos auga MDR *P. aeruginosa*. Tālāk tika veikta nekrotisko audu evakuācija normālo audu ietvarā, brūces skalošana ar 50 ml 4,2 % nātrija bikarbonāta šķīdumu, tika nogaidītas 5 min. un operācijas vieta skalota ar 50 ml BFC 1.10 bakteriofāgu suspensiju. Pēc tam audu bojājumi tika aizvietoti ar *m. serratus* lēveri, kā arī tika ievietots katetrs brūcē lokālai bakteriofāgu ievadei turpmākajās dienās. Pirmās septiņas pēcoperācijas dienas pacientam trīs reizes dienā tika lokāli ievadīti 40 ml BFC 1.10 bakteriofāgu suspensijas ar ātrumu 1 ml/min. Pirms katras fāgu ievades reizes brūce tika skalota, izmantojot katetru ar 50 ml 4,2 % nātrija bikarbonāta šķīdumu. Otrajā pēcoperācijas nedēļā fāgi tika ievadīti divas reizes dienā ar kopējo vienas reizes tilpumu 30 ml, šādu terapiju turpināja septiņas dienas. Kopējais fāgu terapijas ilgums bija 15 dienas. Vienlaikus ar lokālo fāgu ievadi tika turpināta jau uzsāktā terapija ar intravenozu linezolidu un ceftazidīma/avibaktāma ievadi. Fāgu ārstēšanas laikā un pēc tās 1., 3., 4., 7., 10.

un 15. pēcooperācijas dienā ņemtie uzsējumi no brūces bija negatīvi. Paralēli tika noteikta arī fāgu izdale no brūces rīta buferšķīduma paraugā pirms fāgu ievadīšanas 1., 3., 4., 7., 10. un 15. dienā, visos paraugos konstatēja fāgu klātbūtni. Ārstēšanas beigās brūce sadzija bez lokālām vai sistēmiskām iekaisuma pazīmēm. Pabeidzot terapiju, fāgu ievades katetrs tika izņemts un nosūtīts mikrobioloģiskai izmeklēšanai, no tā gala izauga *Candida tropicalis*, kuras ārstēšana netika veikta. Saņemtā antibakteriālā un fāgu terapija, baktēriju uzsējumu un fāgu uzsējumu apkopojums ir atspoguļots 2.4. attēlā. Fāgu terapijas laikā netika novērotas nelabvēlīgas blakusparādības, piemēram, drudzis, lokāli izsitumi, nieze, slikta dūša, vai citi simptomi, kā arī nieru, aknu bojājuma rādītāji saglabājās normas robežās. Decembra beigās pacients tika izrakstīts no stacionāra līdz gūžas locītavas endoprotezēšanas operācijai, pacientam tika saglabāta apakšstilba ārējā fiksācija.

Divus mēnešus pēc fāgu terapijas brūce bija sadzījusī un netika vērotas lokālas vai sistēmiskas iekaisuma pazīmes, arī labās gūžas locītavas magnētiskās rezonanses izmeklējuma patoloģiskā atrade, kas varētu liecināt par iekaisuma ainu, netika konstatēta. Trīs mēnešus pēc fāgu terapijas labās gūžas un augšstilba kaula datortomogrāfijā netika konstatēta osteomielīta aina, kā arī šķīduma kolekciju klātesamība. Tālākā sešu mēnešu periodā tika veiktas divas labā augšstilba proksimālās daļas punkcijas, lai vērtētu baktēriju klātesamību, paņemtie uzsējumi bija negatīvi. Pacientam jūnijā tika noņemts ārējās fiksācijas aparāts un tika plānota labās gūžas locītavas endoprotezēšana.

Antimikrobiālā terapija

IV Kolistina 9 miljoni IU 1 x, tad 3 miljoni IU 3 dienā

IV linezolidā 600 mg 2 x dienā

IV Ceftriadim-saabaktāms 2,5 g x 3 dienā

Lokāla bakteriofāgu levade BFC 1.10, 50ml (traoperatīvi → 40 mL 3 x dienā 7 dienas → 30 mL 2 x dienā 7 dienas)

✓
MDR *P. aeruginosa*, VRE: 5
epidermidis

MDR
P.aeruginosa

✓
Negatīvs
Negatīvs Negatīvs

✓
Negatīvs

✓
Negatīvs

✓
*Candida
tropicalis*

Bakterioloģisko uzsējumu rezultāti

Histoloģiskā
izmeklēšana

✓
Augststība galvijas osteomielīts ar fistulu

Fāgu izdala
no brīdes

2018.g., decembris	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
										Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs	Positīvs

Augststība galvijas rezekcija un defekta aizplūdisana
ar kolīstīnu impregnētu cementa materiālu.

Cementa materiāla evakuācija, audu defekta aizvietošana ar *m. serratus* lāveri.
Katetra lievtošana brīdē fāgu lokālai levadei.

2.4. attēls. Saņemtais terapijas, bakteriālo uzsējumu un fāgu izdales rezultāti stacionēšanas epizodē, kad tika izmantota fāgu terapija

2019. gada 3. septembrī pacientam tika veikta gūžas endoprotezēšana ar sudrabu pārklātu implantu. Operācijas laikā tika ņemti uzņēmumi no vairākām brūces vietām. Tika konstatēta MDR *P. aeruginosa* un VRE (jutīga pret fosfomicīnu) augšana no augšstilba kaula distālās daļas, bet uzņēmumi no acetubulārā rajona un muskuļiem proksimālajā augšstilba daļā bija bakteriālo kultūru negatīvi. Pacients saņēma vienu intravenozu vankomicīna devu perioperatīvajai profilaksei un intravenozu kolistīna terapiju, kuru turpināja lietot līdz mikrobioloģisko izmeklējumu atbildes saņemšanai. Saņemot pozitīvu bakterioloģisko atbildi, pacientam tika turpināta terapija ar kolistīnu un pievienota fosfomicīna terapija. Pēc sešpadsmit dienām pacientam tika veikta DAIR procedūra (debridments, antibiotiku terapija un implantāta saglabāšana), jo tika konstatēta hematoma brūces rajonā un bija aizdomas par iespējamu protēzes infekciju. Operācijas laikā tika ņemtas vairākas iztriepes, no kurām MDR *P. aeruginosa* augšana tika konstatēta augšstilba audu distālajā segmentā. Tika turpināta antibakteriālā terapija un 4. oktobrī tika veiktas punkcijas un to uzņēmumi no audiem apkārt gūžas endoprotēzei, šajos materiālos baktēriju augšanu nekonstatēja. Trīs dienas vēlāk pacients tika izrakstīts un turpināja kolistīna un fosfomicīna antibakteriālu terapiju ambulatori. Šajā ārstēšanas epizodē pacients saņēma kolistīnu sešas nedēļas un fosfomicīnu piecus mēnešus. Novērošanas periodā pēc gada pacientam netika konstatētas lokālas vai sistēmiskas infekcijas pazīmes, slimnieks atzīmēja, ka ir ierobežota kustība labajā kājā, tomēr viņš varēja turpināt spēlēt basketbolu. Piecpadsmit mēnešus pēc endoprotezēšanas labās gūžas un augšstilba radioloģiskajos izmeklējumos iekaisuma pazīmes nevēroja.

2.3.3. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar osteomielītu, antibakteriāla un fāgu jutība

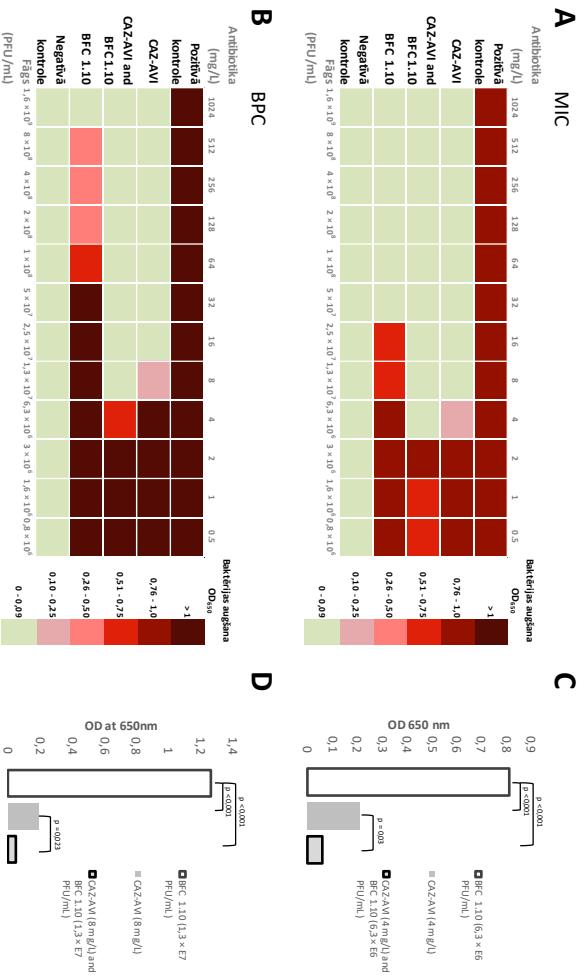
No visiem iegūtajiem paraugiem pētījumā tika izmantoti septiņi *P. aeruginosa* izolāti. Bakteriofāgu jutības, MIC un BPC testēšanai tika izmantots izolāts PA (4), kuru izdalīja 23.11.2018. no brūces. Vērtējot PA (4) jutību pret BFC 1.10 bakteriofāgu preparātu, vēroja daļēju līzes zonu divslāņu agarā.

Lai veiktu tālākos eksperimentus, tika veikta bakteriofāga kokteiļa pavairošana, pēc pavairošanas bakteriofāgu koncentrācija pieauga no $1,6 \times 10^7$ PFU/ml uz $2,5 \times 10^9$ PFU/ml. Iegūtais pavairotais bakteriofāgu preparāts tika izmantots tālākai testēšanai MIC un BPC noteikšanai. *P. aeruginosa* izolātu antibakteriālā jutība laika gaitā mainījās.

2.3.4. Bakteriofāgu un ceftazidīma/avibaktāma efekts planktoniskās šūnās un biofilmas novēršanā *P. aeruginosa* PA (4) izolātā pacientam ar osteomielītu

Ceftazidīma/avibaktāma MIC un BPC vērtības bija attiecīgi 8 un 16 mg/L. Tādējādi saskaņā ar EUCAST standartu iegūtās vērtības uzrādīja planktonisko šūnu jutību pret ceftazidīmu/avibaktāmu. Biofilmas veidošanos novēršanā nepieciešamā antibiotikas koncentrācija bija lielāka par iespējamo lietojamo koncentrāciju *in vivo*, līdz ar to biofilmas novēršanā PA (4) uzrādīja rezistenci pret ceftazidīmu/avibaktāmu. Izmantojot fāgu preparātu BFC 1.10, baktēriju planktonisko šūnu augšanu nekonstatēja fāgu koncentrācijā 5×10^7 PFU/ml. Fāgu preparāts pilnībā spēja novērst biofilmas veidošanos, tikai izmantojot augstāko testēto koncentrāciju – $1,6 \times 10^9$ PFU/ml. Ceftazidīma/avibaktāma un BFC 1.10 kombinācijas gadījumā tika vērota aditīva mijiedarbība *P. aeruginosa* planktonisko šūnu iznīcināšanā (MIC), kā arī biofilmas veidošanās profilaksē (BPC). Lietojot ceftazidīmu/avibaktāmu

kombinācijā ar BFC 1.10, ceftazidīma/avibaktāma MIC un BPC vērtības samazinājās attiecīgi no 8 līdz 4 mg/L ($p = 0,03$) un no 16 līdz 8 mg/L ($p = 0,023$), salīdzinot ar vērtībām, kas iegūtas, lietojot ceftazidīmu/avibaktāmu vienu pašu. Biofilmas profilaksei nepieciešamā antibiotiku koncentrācija samazinājās līdz MIC robežvērtībai (≤ 8 mg/L) saskaņā ar EUCAST standartu, padarot baktērijas celmu jutīgu pret ceftazidīmu/avibaktāmu, rezultāti ir attēloti 2.5. attēlā.



2.5. attēls. BFC 1.10 un ceftazidīma/avibaktāma MIC (A) un BPC (B) vērtība

P. aeruginosa cēlmā pacientam ar osteomielītu*

* C attēlā redzama baktērijas augšanas atšķirība planktoniskās šūnās, izmantojot ceftazidīmu/avibaktāmu, BFC 1.10 un to kombinācijas antibiotikas koncentrācijā 4 mg/L, fāga koncentrācijā $6,3 \times 10^6$ PFU/ml; D attēlā redzama baktērijas augšanas atšķirība, biofilmas novērsšanai izmantojot ceftazidīmu/avibaktāmu, BFC 1.10 un to kombinācijas antibiotikas koncentrācijā 8 mg/L, fāga koncentrācijā $1,3 \times 10^7$ PFU/ml. Sterils triptikāzes sojas agars tika izmantots kā negatīvā kontrole.

2.4. Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistentā *Pseudomonas aeruginosa* LVAD kabeļa infekcijas ārstēšanā

Pētījuma daļa ir aprakstīta un publicēta Kārļa Rāceņa, Jāņa Lāča, Daces Rezevskas, Laimas Mukānes, Aijas Vildes, Inta Putniņa, Sarah Djebara, Maya Merabishvili, Jean-Paul Pirnay, Marikas Kalniņas, Aivara Pētersona, Pētera Stradiņa, Sanda Mauriņa un Jutas Kroičas publikācijā *Successful Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Left Ventricular Assist Device Driveline Infection*. *Viruses*. 2023 May 20;15(5):1210. doi: 10.3390/v15051210.

2.4.1. Pacienta gadījuma raksturojums, pacienta izmeklēšana

2020. gada oktobrī PSKUS tika stacionēs 54 gadus vecs vīrietis ar strutainiem izdalījumiem no LVAD *HeartMate 3* (HM3) kabeļa izejas atveres, kā arī ar lokālu iekaisumu izejas atveres rajonā, febrilu temperatūru un paaugstinātiem iekaisuma rādītājiem (C reaktīvais proteīns (CRP) 44 mg/L).

No slimību vēstures zināms, ka pacientam 2016. gada novembrī tika implantēta LVAD HM3 ierīce, jo pacientam bija smagas pakāpes sirds mazspēja (*INTERMACS* 1. profils), kuras cēlonis bija dilatācijas kardiomiopātija. Ierīces ievietošana tika veikta, lai nodrošinātu pietiekamu sirds funkciju līdz tās iespējamai transplantācijai, 2017. gadā pacients tika uzņemts sirds transplantācijas gaidīšanas sarakstā.

Izdalījumi no LVAD HM3 kabeļa izejas atveres pacientam pirmo reizi parādījās 46 mēnešus pēc ierīces implantācijas. Pacientam tika uzsākta terapija ar piperacilīnu/tazobaktāmu, kuru pacients saņēma divas nedēļas. Tika paņemti uzņēmumi no brūces, kuros izauga *P. aeruginosa*. Pakāpeniski iekaisuma process mazinājās un pacientam tika mainīta antibakteriāla terapija uz ilgstošu perorālu ciprofloksacīna terapiju ambulatori, pacients tika izrakstīts 2020. gada oktobra beigās.

Deviņpadsmit nedēļas vēlāk, 2021. gada martā, pacients atkal tika stacionēts, jo atkārtoti parādījās strutaini izdalījumi no kabeļa izejas atveres, kā arī bija izveidojusies fistula. Atkārtotos brūces uzņēmumos auga MDR *P. aeruginosa*, kuras ārstēšana bija iespējama tikai ar intravenoziem antibakteriāliem līdzekļiem. Pacientam tika uzsākta terapija ar kolistīnu, pirmā deva 9 miljoni un pēc tam 3 miljoni IU trīs reizes dienā, šī terapija tika turpināta līdz operācijai. Tika pieņemts lēmums veikt LVAD kabeļa repozīciju jaunā zemādas tunelī. Tika veikta fluora-18-fluorodeoksiglikozes pozitronu emisijas tomogrāfija ar datortomogrāfiju (¹⁸F-FDG PET/CT), kurā tika konstatēta hipermetabola aktivitāte pa LVAD kabeļa gaitu līdz vēdera muskuļu līmenim, kā arī tika konstatēts viegli infitrēts *m. rectus abdominis*, iegūtā atrade liecināja par bakteriālu infekciju.

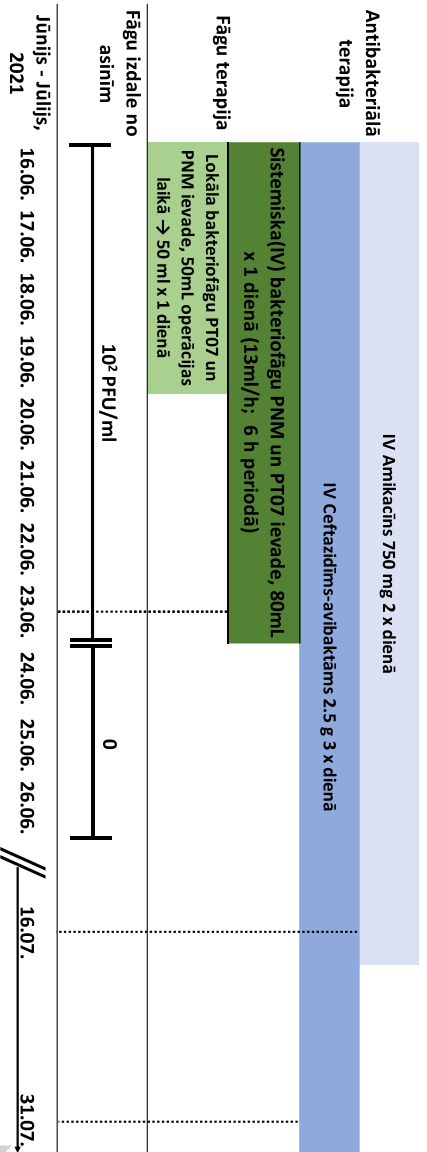
Lai nodrošinātu pēc iespējas labāku ārstēšanas iznākumu, tika pieņemts lēmums izmantot bakteriofāgus lokālā un intravenozā veidā. Šāds lēmums tika pieņemts, pamatojoties uz iepriekšējo neveiksmīgo antibakteriālo ārstēšanu, kā arī bija ierobežotas antibakteriālas terapijas alternatīvas iespējas. Balstoties uz izdalītās MDR *P. aeruginosa* kultūras antibakteriālo jutību, efektīva terapija bija iespējama, izmantojot tikai ceftazidīmu/avibaktāmu un amikacīnu. Sadarbībā ar Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcu (*QAMH*) Briselē, Beļģijā, tika saņemti divi lītiskie *P. aeruginosa* fāgi – PNM un PT07. Fāgu lietošanas veids tika apspriests ar lokālo ārstniecības komandu un *QAMH* speciālistiem. Ārstēšana tika veikta saskaņā ar Helsinku deklarācijas 37. paragrāfu (44), un pirms procedūras no pacienta tika saņemta informētā piekrišana par fāgu terapijas lietošanu.

2.4.2. Fāgu terapijas izmantošana

16. jūnijā notika operācija, kuras laikā veica nekrotisko audu ekscīziju pa kabeļa gaitu, ieskaitot daļēju *m. rectus abdominis* rezekciju. Operācijas laikā tika ņemtas vairākas iztriepes no brūces, lai varētu vērtēt infekcijas izplatību un identificētu bakteriālo ierosinātāju. LVAD kabelis ir klāts ar velūru, lai veicinātu tā saaugšanu ar zemādas audiem, bet tas rada infekcijas perēkļa risku, kuru ir grūti sanēt, tāpēc operācijas laikā velūrs tika noņemts no kabeļa. Velūru nosūtīja tālākai mikrobioloģiskai analīzei. Turpmākā operācijas gaitā tika veikta brūces skalošana un lokāla apstrāde ar *Prontosan*® šķīdumu (*B. Braun*, Vācija), kurš satur virsmaktīvu vielu betaīnu un 0,1 % poliaminopropilbiguanīdu (polihexsidīnu). Tad vēdera priekšējā sienā tika sagatavots jauns zemādas tunelis, lai tajā ievietotu LVAD kabeli. Lai samazinātu iespēju, ka jaunais modulārais kabeļa savienotājs varētu tikt kontaminēts no apkārtesošā šķidruma vai audu materiāla, un pārvietošanas laikā nodrošinātu sterilitāti, tika izmantots sterils ultraskaņas zondes apvalks, lai izklātu zemādas tuneļa sienas. Jaunais zemādas tunelis un iepriekšējais ar *P. aeruginosa* inficētais tunelis tika skalots ar 250 ml 0,9 % NaCl un tad ar 250 ml 4,2 % NaHCO₃, lai apkārtējā vide būtu sārmaina. Piecas minūtes vēlāk katru no tuneļiem skaloja ar 50 ml fāgu suspensijas, kuras sastāvā bija PNM un PT07 fāgi, katrs koncentrācijā 10⁷ PFU/ml. Caur jauno zemādas tuneli tika ievietots jauns modulārais kabelis, kas jau bija savienots ar LVAD kontrolierīci. Notika īslaicīga iekārtas atslēgšana, lai atvienotu veco un pievienotu jauno kabeli LVAD iekārtai. Pārlicinoties, ka pacients ir hemodinamiski stabils un LVAD darbojas, kabelis tika ievietots jaunajā zemādas kanālā. Fāgu lokālai ievadīšanai jaunajā tunelī tika ievietots arī 8-FR katetrs. Brūce tika atstāta vaļēja sekundārai dzīšanai.

Divas stundas pirms operācijas, izmantojot infūzijas sūkni ar ātrumu 13 ml/h, sešas stundas caur centrālo venozo katetru tika ievadīti 80 ml PNM un PT07 fāgi, katra fāga koncentrācija bija 10⁷ PFU/ml. Šāda intravenoza fāgu

terapija tika turpināt kopumā astoņas dienas. Nākamajā dienā pēc operācijas tika veikta lokāla 50 ml PNM un PT07 fāgu ievade, izmantojot 8-FR iepriekš ievietoto katetru. Lokāla fāgu terapija tika turpināta trīs dienas. Pirms lokālas fāgu lietošanas brūci skaloja caur katetru ar 250 ml 0,9 % NaCl un tad ar 250 ml 4,2 % NaHCO₃. Divas stundas pirms operācijas tika uzsākta arī intravenoza antibiotiku terapija ar ceftazidīmu/avibaktāmu 2,5 g trīs reizes dienā un amikacīnu 750 mg divas reizes dienā. Amikacīnu turpināja lietot četras nedēļas, bet ceftazidīmu/avibaktāmu sešas nedēļas (skatīt 2.6. attēlu). Visos ņemtajos intraoperatīvajos brūču uzsējumos izauga *P. aeruginosa*. Pacientam tika veikta regulāra (katru dienu) brūces pārsiešana un iztriepju bakterioloģiskā izmeklēšana, kurā baktēriju augšanu nekonstatēja. Sešas dienas pēc operācijas brūce bija bez iekaisuma pazīmēm un tika slēgta. Fāgu terapijas laikā nevēlamas blakusparādības, kā slikta dūša, febrilitāte, izsitumi un citas, netika novērotas, kā arī aknu un nieru bojājumu marķieri saglabājās normas robežā. Fāgu titrs slimnieka asinīs bija stabils septiņas ārstēšanas dienas pēc kārtas, respektīvi, 10² PFU/ml. Fāgu klātesamību asinīs vairs nevarēja noteikt, sākot ar pirmo dienu pēc fāgu ievades pārtraukšanas (2.6. attēls).



● IWAD kabeļa repozīcija, jauna tunela izveidošana, brūces revīzija

2.6. attēls. Saņemtās terapijas un fāgu koncentrācijas rezultāti stacionēšanas epizodē, kad tika izmantota fāgu terapija

2.4.3. Lietotās terapijas iznākums, ilgtermiņa rezultāts

Sešas nedēļas pēc LVAD kabeļa repozīcijas operācijas pacientam tika veikts atkārtots ¹⁸F-FDG PET/CT, kurā vēroja vieglu atlieku metabolu aktivitāti proksimālā kabeļa daļā, kas salīdzinājumā ar iepriekšējo izmeklējumu bija izteikti samazinājusies. Šādas radioloģiskās izmaiņas skaidrojamas ar agrīnu izmeklējuma veikšanu un reaktīvām audu izmaiņām. Brūce vizuāli bija bez iekaisuma pazīmēm, iekaisuma rādītāji bija normas robežā. Pacients tika izrakstīts no stacionāra 45. pēcooperācijas dienā.

Trīsdesmit četras nedēļas pēc kabeļa repozīcijas operācijas tika veikts atkārtots PET/CT, kurā iekaisuma ainu nekonstatēja. Pacients turpina regulāru novērošanos pie ārsta, 21 mēnesi pēc operācijas infekcija nav atkārtojusies.

2.4.4. *P. aeruginosa*, kura izolēta no pacienta ar LVAD kabeļa infekciju, antibakteriāla un fāgu jutība

Pētījumā tika iekļauti pieci *P. aeruginosa* izolāti. To antibakteriālā jutība laika gaitā bija mainīga, saglabājot plašu antibakteriālo rezistenci. Pirms tika izmantota bakteriofāgu terapija, to jutība tika noteikta izolātam PA03, kurš iegūts no izdalījumiem no LVAD izejas atveres. Tālākiem *in vitro* testiem tika izmantots PAP01 izolāts, kurš iegūts, kultivējot materiālu no LVAD kabeļa velūra, kas tika noņemts operācijas laikā. Iegūtie rezultāti parāda, ka fāgu jutība, izmantojot divkārsu agara punktu metodi, bija ar mērenu līzi PT07 un ar daļēju līzi PNM fāgam. Savukārt, vērtējot EOP PT07 fāgam, izmantojot abus izolātus, tas bija 0,1, bet PNM fāgam, izmantojot PA03 – 0,001, PAP01 – 0,0005. Rezultāti liecina, ka PNM fāga lītiskais efekts bija izteiktāks un tas bija virulentāks pret pacienta *P. aeruginosa* izolātiem, savukārt PNM bija mazāk virulents un tā lītiskais efekts, vērtējot EOP rezultātus, dinamiskā pret jaunāko no izolātiem (PAP01) samazinājās. Rezultāti ir atspoguļoti 2.5. tabulā.

Antibakteriālās un fāgu jutības rezultāti *P. aeruginosa* izolātiem pacientam ar LVAD kabeļa infekciju

	CNS73	PA01	PA02	PA03	PAP01	PAP02
Izolāta veids	Fāga saimiekkultūra	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Velns no LVAD kabeļa	Velns no LVAD kabeļa
Izolēšanas laiks	–	04/10/20	05/03/21	19/04/21	16/06/21	16/06/21
AMK	S (MIC ≤ 4)	S	S	S	S (MIC ≤ 4)	S (MIC ≤ 4)
PEP	I (MIC = 4)	N/A	N/A	N/A	I (MIC = 2)	I (MIC = 4)
CAZ	I (MIC = 2)	I	R	I	I (MIC = 2)	I (MIC = 2)
CAZ/AVI	S (MIC ≤ 1)	N/A	N/A	N/A	S (MIC ≤ 1)	S (MIC ≤ 1)
CIP	I (MIC = 0.25)	I	R	R	I (MIC = 0.25)	I (MIC = 0.25)
CST	S (MIC = 2)	N/A	S	S	S (MIC ≤ 1)	S (MIC = 2)
FOF	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)	N/A	R (MIC > 128)	R (MIC > 128)
IPM	I (MIC ≤ 1)	I	R	R	I (MIC ≤ 1)	I (MIC ≤ 1)

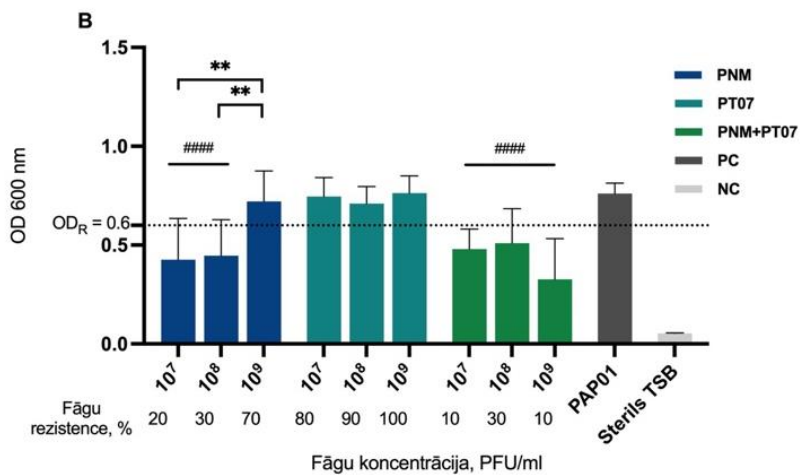
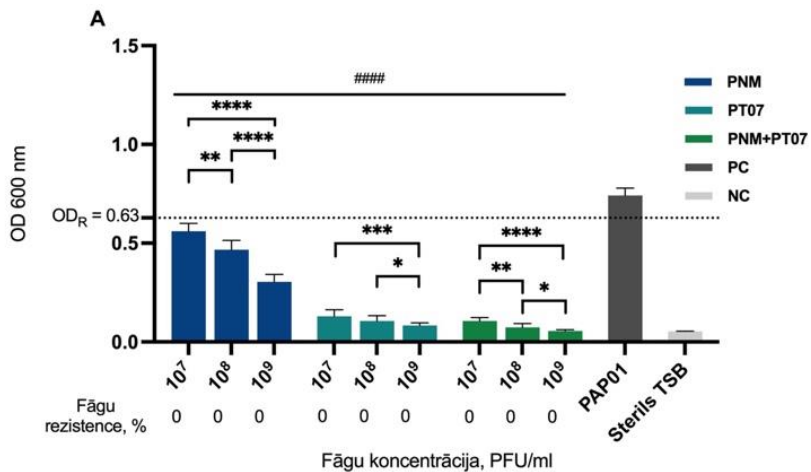
2.5. tabulas turpinājums

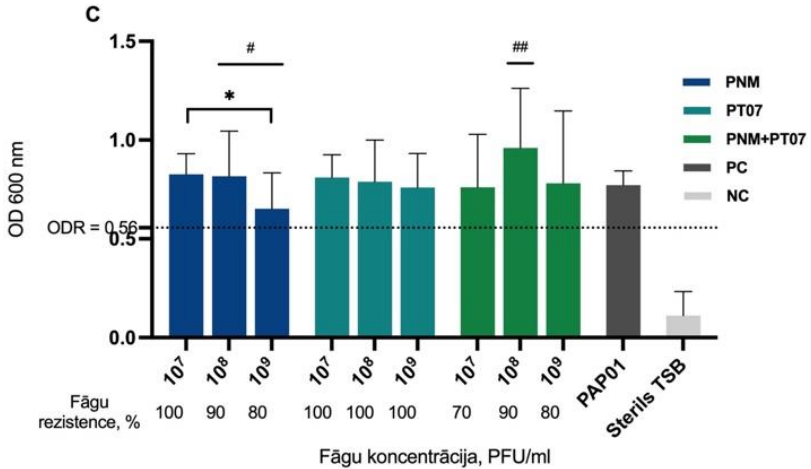
Izolāta veids	CN573	PA01	PA02	PA03	PAP01	PAP02
	Fāga saimniekkultūra	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Izdalījumi no LVAD kabeļa izejas atveres	Velūrs no LVAD kabeļa	Velūrs no LVAD kabeļa
MEM	S (MIC = 1)	S	R	I	S (MIC ≤ 0,125)	S (MIC = 1)
TOB	S (MIC = 0,5)	N/A	R	R	S (MIC = 0,5)	S (MIC = 0,5)
TZP	I (MIC = 8)	I	R	I	I (MIC = 4)	I (MIC = 8)
PNM fāgs	++++	N/A	N/A	++ EOP = 0,001	++ EOP = 0,0005	N/A
PT07 fāgs	++++	N/A	N/A	+++ EOP = 0,1	+++ EOP = 0,1	N/A

2.4.5. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmas veidojošās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas eradikācijas modeli

Izmantojot PAP01 izolātu, tika vērots, ka tikai fāgs PNM koncentrācijā 10^9 PFU/ml spēja samazināt biofilmas veidošanos nelielā apmērā (2.7. attēls). Pārējos gadījumos, lietojot PNM, PT07 un to kombinācijas dažādās koncentrācijās, biofilmas eradikāciju nevēroja. Planktonisko šūnu augšana pēc 12 h samazinājās, izmantojot visus fāgus, visās to koncentrācijās. Savukārt pēc 24 h nozīmīgs lītiskais efekts bija vērojams tikai PNM fāgam koncentrācijā no 10^7 līdz 10^8 PFU/ml un fāgu kombinācijai visās testētajās koncentrācijās (2.7. B attēls). Visos gadījumos pēc 12 h fāgu lītiskais efekts planktoniskās šūnās bija labāks, izmantojot lielākas fāgu koncentrācijas, izņemot PT07 fāga koncentrācijās 10^7 un 10^8 PFU/ml. Šādu sakarību nevēroja, nosakot fāgu lītisko efektu 24 h pēc inkubācijas planktoniskās šūnās, atsevišķos gadījumos pat tika novērota pretēja sakarība, proti, fāgu efekts bija labāks, izmantojot tā mazākas koncentrācijas – 10^7 pret 10^9 PFU/ml un 10^8 pret 10^9 PFU/ml.

Fāgu rezistence tika novērota visos gadījumos pēc 24 h inkubācijas, tā bija mazāk izteikta, izmantojot PNM un PT07 kombinācijas. Izmantojot PT07 fāgu visās tā koncentrācijās un PNM fāgu 10^7 PFU/ml, fāgu rezistence bija 100 % (2.7. C attēls).





2.7. attēls. PNM, PT07 un to kombinācijas MIC un MBEC PAP01 izolātā – biofilmas eradikācijas modelis*

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību + SD, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 600 nm). Fāgu procentuālā rezistence ir atspoguļota zem katra grafika. (A) MIC12; (B) MIC24; (C) MBEC; PC – pozitīvā kontrole, PAP01 kultūra atsevišķi; NC – negatīvā kontrole, sterils TSB; OD_R – aprēķinātā bakteriofāgu rezistences robežvērtība. Stabiņi, kuriem ir tēmtura zīme (#), norāda uz statistiski ticamu atšķirību pret pozitīvo kontroli, stabiņi, kuriem ir zvaigznīte (*), norāda uz statistiski ticamu atšķirību starp viena fāga vai fāgu kombinācijas dažādām koncentrācijām;

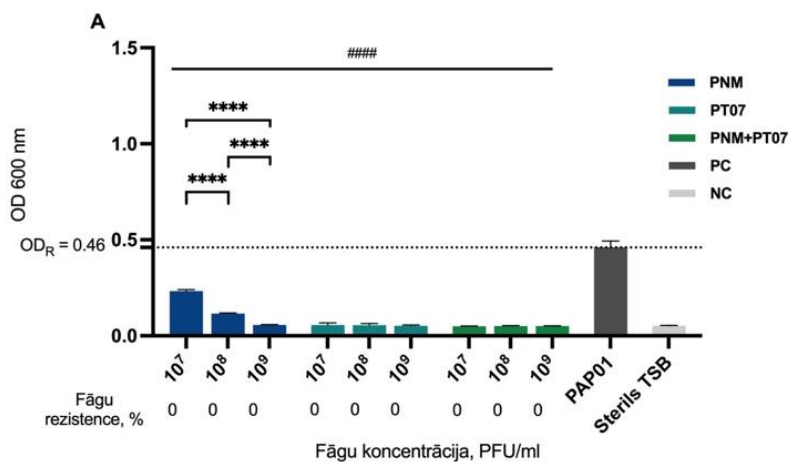
*/# p vērtība < 0,05, **/## p vērtība < 0,01, ***/### p vērtība < 0,001 un ****/#### p vērtība < 0,0001.

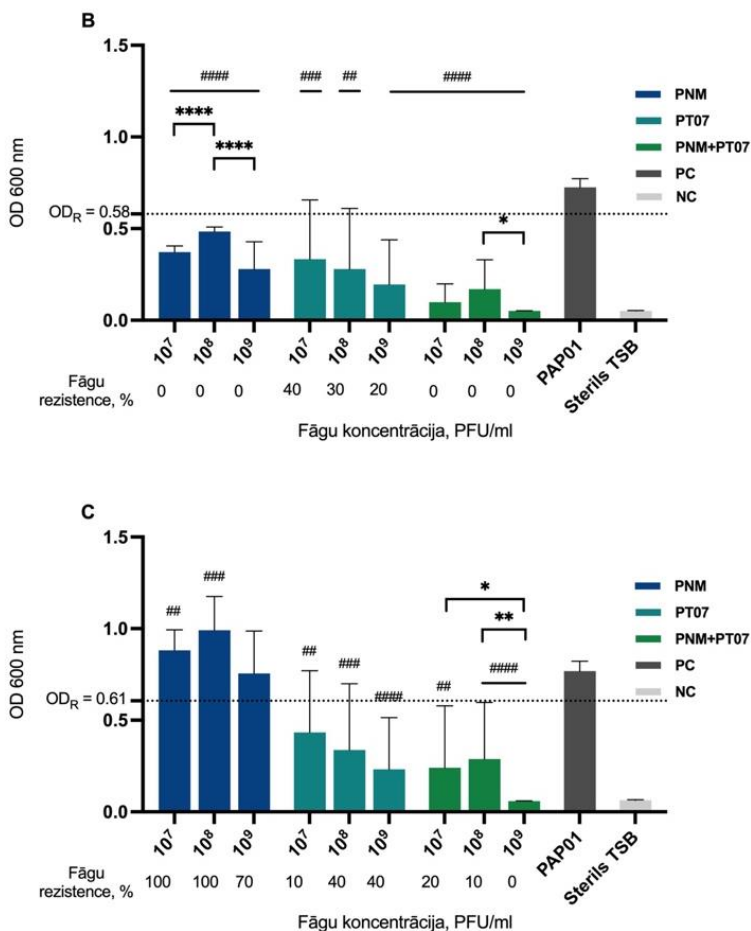
2.4.6. Bakteriofāgu efekts planktoniskās un biofilmu veidošanās šūnās, bakteriofāgu rezistences attīstība PAP01 kultūrā, izmantojot biofilmas profilakses modeli

Bakteriofāgu PNM, PT07 un to kombinācijas spēja profilaktiski inhibēt biofilmas veidošanos tika noteikta, izmantojot tās pašas fāgu koncentrācijas, kuras izmantoja biofilmas eradikācijas modelī. Rezultāti atspoguļo, ka PNM fāgam un tā kombinācijai ar PT07 fāgu tika novērota biofilmas veidošanās inhibīcija visās izmantotajās fāga koncentrācijās. Savukārt PNM fāgam netika novērota spēja ierobežot biofilmas veidošanos, gluži pretēji, atsevišķās tā

koncentrācijās 10^7 un 10^8 PFU/ml vēroja biofilmas biomasas pieaugumu. Lītisks efekts planktoniskās šūnās tika vērots visiem fāgiem gan 12 h, gan 24 h pēc inkubācijas.

Bakteriofāgu rezistence attīstījās, izmantojot visus fāgus baktēriju biofilmās, to nevēroja PNM un PT07 fāgu kombinācijai 10^9 PFU/ml koncentrācijā, savukārt PNM fāga koncentrācijās 10^7 un 10^8 PFU/ml tā sasniedza 100 %. Planktoniskās šūnās rezistence attīstījās tikai pēc 24 h inkubācijas un tikai PT07 fāgam (2.8. attēls).





2.8. attēls. PNM, PT07 un to kombinācijas MIC un BPC PAP01 izolātā – biofilmas profilaktiskais modelis*

* Stabiņi atspoguļo baktēriju vidējo OD vērtību + SD, izmantojot dažādas fāgu koncentrācijas (mērīta 600 nm). Fāgu procentuālā rezistence ir atspoguļota zem katra grafika. (A) MIC12; (B) MIC24; (C) BPC; PC – pozitīvā kontrole, PAP01 kultūra atsevišķi; NC – negatīvā kontrole, sterils TSB; OD_R – aprēķinātā bakteriofāgu rezistences robežvērtība. Stabiņi, kuriem ir tēmtura zīme (#), norāda uz statistiski ticamu atšķirību pret pozitīvo kontroli, stabiņi, kuriem ir zvaigznīte (*), norāda uz statistiski ticamu atšķirību starp viena fāga vai fāgu kombinācijas dažādām koncentrācijām;

*/# p vērtība < 0,05, **/### p vērtība < 0,01, ***/#### p vērtība < 0,001 un ****/##### p vērtība < 0,0001.

2.4.7. Bakteriofāgu un antibiotiku mijiedarbība planktonisko šūnu līzē un biofilmas eradikācijā, izmantojot sākotnēji fāgus un tad antibiotikas

Izmantojot biofilmas eradikācijas modeli, kurā sākotnēji CN573 kultūra pakļauta fāgu PNM, PT07 vai to kombinācijas iedarbībai 10^7 PFU/ml 12 h un tad terapeitiskais līdzeklis mainīts uz ceftazidīmu/avibaktāmu vēl 12 h inkubācijai, tika novērots, ka fāgu un antibiotiku kombinācijai bija statistiski ticama atšķirība ($p < 0,05$) biofilmas modelī, salīdzinot ar antibiotiku vienu pašu 24 h garumā. Planktoniskās šūnās ceftazidīms/avibaktāms viens pats nespēja iznīcināt CN573, izmantojot tā koncentrāciju 2 mg/L. Izmantojot lielākas ceftazidīma/avibaktāma koncentrācijas, CN573 planktoniskās šūnas tika iznīcinātas. Lietojot fāgus pirmās 12 h un tad terapiju mainot uz 12 h ceftazidīma/avibaktāma iedarbību, vēroja, ka baktēriju iznīcināšana notika jau 2 mg/L koncentrācijā. Šis rezultāts norāda uz fāgu un ceftazidīma/avibaktāma aditīvo mijiedarbību.

Vērtējot fāgu un ceftazidīma/avibaktāma mijiedarbības ietekmi uz CN573 noformētas biofilmas eradikāciju, vēroja sinerģistisku efektu visās izmantotajās antibiotikas koncentrācijās ($p < 0,05$), kur antibiotika viena pati nespēja iznīcināt baktēriju šūnas biofilmā. Rezultāti liecina, ka sinerģija, lai iznīcinātu biofilmu, pastāv, izmantojot vispirms fāgus 12 h inkubācijai un tad mainot terapeitisko līdzekli uz antibiotiku atlikušo 12 h iedarbībai.

3. Diskusija

Promocijas darbs veltīts tēmai par bakteriofāgu iespējamo lietojumu multirezistentu ar biofilmu asociētu infekciju apkarošanā dažādās klīniskās situācijās, kur šīs problēmas ir īpaši aktuālas, kā implantējamo ierīču infekcijas (PD katetri, LVAD), smagu kaulu un mīksto audu bojājuma gadījumā, tā arī pacientiem ar riska faktoriem (imūnsupresija, strukturālas un/vai fizioloģiskas audu izmaiņas).

Bakteriofāgi jeb fāgi ir baktēriju vīrusi, kuriem piemīt unikāla spēja inficēt baktērijas un tās iznīcināt. Lītiskie fāgi ir izplatīti apkārtējā vidē, un tie nespēj inficēt ne cilvēka, ne dzīvnieka šūnas. Šo specifisko īpašību dēļ bakteriofāgi ir potenciāls līdzeklis cīņā ar bakteriālām infekcijām, īpaši tādām, kuras nav iespējams ārstēt ar antibiotikām. Bakteriofāgu terapija kā alternatīva infekciju ārstēšanā ir iekļauta Eiropas Savienības antimikrobiālās rezistences ierobežošanas plānā.

Veiktie pētījumi par bakteriofāgu efektu multirezistentās infekcijās norāda uz to potenciālu, tomēr nav skaidras atbildes par fāgu mijiedarbību šo baktēriju veidotajās biofilmās. Tāpat trūkst klīnisko datu, lai droši un efektīvi varētu izmantot bakteriofāgus pacientu ārstēšanā.

Bakteriofāgu efekts *S. aureus* kultūrās peritoneālās dialīzes pacientiem

Rezultāti atspoguļoja dažādu komerciāli pieejamu bakteriofāgu plašo lītisko aktivitāti, norādot uz izteiktu fāgu antimikrobiālo iedarbību pret izolētajām *S. aureus* kultūrām. Pozitīvs vai lītisks bakteriofāga efekts tika konstatēts pret visiem *S. aureus* (n = 71) izolātiem, izmantojot *Eliava* (*Pyo*, *Ses*, *Fersisi*, *Enko*, *Intesti*) un *Microgen* (*Pyobacteriophag*) komerciāli pieejamos bakteriofāgu kokteiļus, savukārt, izmantojot *Eliava* stafilokoku bakteriofāga preparātu, rezistences biežums vai lītiska efekta neesamība bija 26 % (n = 9).

Visbiežāk novērotā pozitīvā fāgu lītiskā efekta veids bija daļēja līze, kas izolātu vidū bija no 56 % līdz 100 %, izmantojot dažādus bakteriofāgu preparātus. Iegūtie rezultāti par plašo fāgu lītisko efektu (100 %) visiem, izņemot *Eliava* stafilokoku bakteriofāga preparātam, varētu būt saistīti arī ar iespējami maza ģenētisko *S. aureus* izolātu daudzveidību pētītajā populācijā (45). Baktēriju rezistences vai vāja lītiskā efekta gadījumā, izmantojot *Eliava* stafilokoku bakteriofāga preparātu, tika veikta adaptācijas procedūra jeb saimniekbaktēriju spektra paplašināšana. Adaptācijas rezultātā tika novērota izteikta bakteriofāgu lītiskā efekta pastiprināšanās, kas rezultējās ar 100 % lītisko aktivitāti izmantotajos *S. aureus* izolātos. Deviņiem izolātiem, kuri bija rezistenti pret izmantoto fāgu, adaptācija rezultējās ar rezistences pārvarēšanu un pozitīvu lītisko efektu; diviem izolātiem sākotnēji vājais fāgu lītiskais efekts pastiprinājās no atsevišķiem plakiem (+) līdz vājai līzei (++). Fāgu adaptācijas princips galvenokārt ir saistīts ar spontānām mutācijām un iespējamu gēnu rekombināciju starp ģenētiski atšķirīgiem bakteriofāgiem vīrusa kokteiļa ietvaros. Šādu izmaiņu rezultātā mainās strukturālie gēnu produkti, piemēram, fāgu astes proteīni, kas nepieciešami fāga piesaistei pie saimniekšūnas vai adsorbīcijai, kas ir pirmais fāga infekcijas solis baktērijā. Adaptācijas process var arī samazināt līzes laiku un palielināt jauno vīrusa kopiju skaitu (46, 47). Nesenie atklājumi par *Eliava* stafilokoku bakteriofāgu preparātu, kas sastāv no *Twort* līdzīgā fāga Sb-1, parādīja, ka pēc adaptācijas procesa fāgu preparātā tika atrasti dažādi tā mutantie varianti, kas rezultējās ar fāga preparāta lītiskā spektra palielināšanos no 87 % līdz 96 %, efektu vērtējot ģenētiski daudzveidīgos *S. aureus* celmos no ģeogrāfiski dažādiem reģioniem. Interesanti, ka ģenētiskās atšķirības starp oriģinālo jeb sākotnējo Sb-1 fāgu un tā kloniem tika konstatētas fāga genoma hipervariablajā kompleksa atkārtojumu struktūrā, bet adsorbīcijas ātrums starp oriģinālo fāgu un tā mutantajiem variantiem bija līdzīgs, no kā var secināt, ka Sb-1 fāga saimniekbaktēriju spektra paplašināšanās mehānisms joprojām nav

skaidrs (48). Citā Šveicē veiktā pētījumā tika iegūti līdzīgi rezultāti – pēc *Eliava Pyo* bakteriofāga adaptācijas, izmantojot *E. coli* izolātus no pacientiem ar urīnceļu infekciju, lītiskais spektrs palielinājās no 65,9 % līdz 92,7 % (49).

Iegūtie rezultāti atspoguļo klīniski nozīmīgu (izteiktu un mērenu) biofilmas veidošanos spēju 91,2 % (n = 31) *S. aureus* izolātiem, kas ir tāpat kā citā pētījumā Brazīlijā, kur, pētot *S. aureus* izolātus PD peritonīta pacientiem, tie biofilmu veidoja 88,7 % (n = 55). Jāatzīmē, ka šajā pētījumā tika izmantota cita biofilmas noteikšanas metode (50), kas norāda, ka kristālvioletā krāsojuma metode 96 bedrīšu mikroplatē var tikt izmantota kā izmaksu efektīva un salīdzinoša metode klīniski nozīmīgu *S. aureus* izolātu biofilmas noteikšanai. Fāgu lītiskā aktivitāte neatšķīrās dažādās *S. aureus* biofilmu veidošanās pakāpju grupās, kas liecina, ka *S. aureus* biofilmas veidošanās spēja neietekmē fāgu lītisko efektu *in vitro* planktoniskās baktēriju šūnās.

Iegūtie rezultāti par biofilmu veidošanas fenotipu (biofilmas lielumu) un jutību pret fāgiem apstiprina *S. aureus* fenotipisko atšķirību pat viena pacienta ietvaros, $p < 0,01$ (2.1. attēls). Lai gan baktērijas bija fenotipiski atšķirīgas, tas neietekmēja bakteriofāga lītisko efektu, kas tika konstatēts vairumam izolātu.

Bakteriofāgu efekts uropatogēnās *E. coli* planktoniskās un biofilmu producējošās šūnās

Pētījuma dati liecina, ka *E. coli*, kas izolētas no pacientiem ar UCI, bieži var veidot biofilmas. Rezultāti parāda, lai gan amoksicilīns/klavulanāts un ciprofloksacīns var veiksmīgi iznīcināt baktēriju planktoniskās šūnās, tie nespēj iznīcināt baktēriju veidotās biofilmas. Rezultāti atspoguļo, ka atšķirībā no antibiotikām, ja bakteriofāgi spēj iznīcināt baktēriju planktoniskās šūnās, tad tie var iznīcināt arī konkrētās baktērijas biofilmu. Situācijās, kad bakteriofāgi sākotnēji uzrādīja vāju iedarbību pret *E. coli* izolātu, fāgus varēja pielāgot, veicot

adaptācijas procedūru, tādējādi panākot lītisku iedarbību gan planktoniskās, gan biofilmu veidojošās baktēriju šūnās.

E. coli biofilmas veidošana tiek vērota bieži (51-54), lai gan veiktā pētījuma rezultāti liecina, ka baktēriju spēja veidot biofilmu ir ļoti atšķirīga starp uropatogēnajiem *E. coli* izolātiem. Baktēriju spēja veidot biofilmu jāuzskata par būtisku faktoru infekcijas ārstēšanā. Antibiotiku lietošana parasti ir balsīta to iedarbības analīzē planktoniskās baktēriju šūnās, nepievēršot pietiekamu uzmanību biofilmu veidošanās riskam. Lai gan antibiotikas var veiksmīgi iznīcināt planktoniskās baktēriju šūnas, tās bieži nespēj iznīcināt biofilmas, tāpēc biofilmā esošās baktērijas spēj būt noturīgas pret ārstēšanu un var izraisīt infekcijas recidīvu (55).

Reizēm, lai sasniegtu MIC un MBEC vērtības biofilmu modeļos, ir nepieciešams izmantot lielas antibiotiku koncentrācijas (19). Lai sasniegtu atbilstošās antibiotiku koncentrācijas cilvēka organismā, nepieciešams izmantot lielas devas, kas pārsniedz antibiotiku maksimālo pieļaujamo devu un tādēļ var būt kaitīgas vai pat letālas pacientam. Šādas antibiotikas nenodrošina efektīvu ārstēšanu biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā, lai gan tiek vērots to efekts *in vitro*. Pētījuma rezultāti liecina, ka fāgu efekts ir līdzvērtīgs vai pat labāks baktēriju biofilmās (MBEC vērtības) nekā planktoniskās šūnās (MIC vērtības). Visskaidrāk to var novērot, analizējot *Ses* fāga iedarbību pret O21UR izolātu (sk. 2.3. attēlu), kur vērojams, ka baktēriju inhibīcija, izmantojot vienādas fāga koncentrācijas, ir labāka baktēriju biofilmās esošās šūnās, nevis planktoniskās baktēriju šūnās. To varētu skaidrot ar to, ka fāgi sāk aktīvu replikāciju brīdī, kad baktērijas izkļūst no biofilmas un kļūst metaboliski aktīvas (56). Visi trīs testētie fāgu preparāti spēja inhibēt O21UR izolāta baktēriju biofilmas, savukārt abas vērtētās antibiotikas amoksicilīns/klavulanāts un ciprofloksacīns to nespēja, MBEC vērtība tika sasniegta tikai 64 mg/L koncentrācijā. Rezultāti norāda, ka

šajā gadījumā fāgiem ir labāks *in vitro* antibiofilmas efekts salīdzinājumā ar testētajām antibiotikām.

Lai gan abi izolāti 021UR un 01206UR veido spēcīgas biofilmas un ir rezistenti pret vairākām antibiotikām, tie joprojām ir jutīgi pret fāgiem. Tas liek secināt literatūrā aprakstītas parādības, ka antibakteriālas rezistences attīstība nav vienlīdz saistīta ar bakteriofāgu rezistenci un fāgu, antibiotiku krusteniskā rezistence nenotiek (57). Kā ierobežojums precīzu fāgu analīzei jāmin, ka pētījumā netika izmantoti atsevišķi fāgi, bet gan komerciāli fāgu kokteiļi. Izmantojot komerciālos fāgu kokteiļus, ir grūti tos pavairot, jo nebija pieejami oriģinālie saimniekorganismu celmi, uz kuriem šie fāgi tika audzēti un pavairoti to ražotnēs.

Atšķirībā no antibiotikām fāgi ir dzīvi vīrusi, un to aktivitāti var ietekmēt dažādi faktori, piemēram, barības vielu daudzums, temperatūra un pH. Tāpēc pētījumu laikā ir ļoti svarīgi nodrošināt atbilstošus augšanas apstākļus un izmantot piemērotas laboratoriskās metodes. Kalgarī biofilmas modelis nodrošina ātrus un atkārtojamus rezultātus, nosakot minimālo biofilmas eradikācijas koncentrāciju (41). Šajā modelī ir iespējams nodrošināt dinamiskus apstākļus un pievienot svaigas barības vielas jau noformētajām biofilmām, un pēc to iznīcināšanas ir iespējams noteikt izdzīvojošo baktēriju šūnu esamību biofilmā, kas piešķir lielāku ticamību pētījumā iegūtajiem rezultātiem.

Katram bakteriofāgam ir savs darbības spektrs. Tāpēc iedarbība pret dažiem baktēriju celmiem var būt vāja vai pat baktērijas var būt pret tiem pilnīgi rezistentas. Viena no iespējām paplašināt fāgu aktivitātes spektru ir izmantot vairāku fāgu kokteiļus, kā tas tika darīts arī šajā pētījumā. Otrs veids, kā uzlabot fāgu aktivitāti, ir veikt fāgu adaptāciju, kas ievērojami var uzlabot to efektivitāti (58, 59), līdzīgi kā iepriekšējā pētījuma daļā ar *S. aureus* izolātiem. Sākotnēji *Pyobacteriophage* no *Microgen* nespēja inhibēt 01206UR augšanu, bet pēc adaptācijas tika novērots būtisks efekta uzlabojums no vājas līzes (+) līdz pilnīgai

baktēriju līzei (+++), līdzīgu rezultātu vēroja biofilmas modelī gan planktoniskās, gan biofilmu veidojošās baktēriju šūnās (sk. 2.2. attēlu). KomPLICĒTOS gadījumos, kad antibiotikām nav vēlamā efekta un fāgu efektivitāte ir zema, adaptācija var būt risinājums, lai iegūtu efektīvu līdzekli infekcijas ārstēšanai.

Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezistenta *Pseudomonas aeruginosa* augšstilba osteomielīta ārstēšanā

Smagu mīksto audu un kaulu struktūru bojājumu gadījumā bakteriāla infekcija ir viena no biežākajām komplikācijām, posttraumatiskais osteomielīts var attīstīties līdz pat 19 % (60). Antimikrobiālā rezistence rada būtisku risku posttraumatisku infekciju ārstēšanā. Tādi faktori kā vaļēja kaula lūzuma smaguma pakāpe, piemēram, III pakāpes lūzums pēc Gustilo-Andersona klasifikācijas, un plaši mīksto audu bojājumi ir saistīti ar augstu risku pēcoperācijas infekcijas attīstībai, tās biežums šādu traumu gadījumā variē 4–52 % (61, 62). Būtiski, ka arvien biežāk tiek novērots gramnegatīvo baktēriju un polimikrobiālās floras ierosinātāju biežums, īpaši III pakāpes vaļēju lūzumu gadījumā, kas ir saistīts ar sliktāku prognozi un sarežģītāku slimības gaitu (63). *P. aeruginosa* ierosinātās infekcijas, t. sk. kaulu un mīksto audu, ir grūtāk ārstējamas, un tām tiek novērots biežāks slimības recidīvs (64, 65). Tas skaidrojams ar multipliem baktērijas virulences faktoriem, piemēram, izteiktu spēju veidot blīvas biofilmas, spēju pielāgoties dažādiem vides apstākļiem, eksotoksīnu un proteāžu produkciju, līdz ar to *Pseudomonas* ierosinātām infekcijām ir nepieciešams ilgāks ārstēšanas kurss un nepieciešams kombinēt divus vai vairāk dažādu grupu antibakteriālos līdzekļus (21, 22, 66, 67).

Līdzīgi arī klīniskajā gadījumā, kur pacientam tika izmantota bakteriofāgu terapija, infekciju ierosināja polimikrobiāla flora, ko veidoja MDR *P. aeruginosa*, karbapenēmiem rezistentais *A. baumannii* un VRE. Neskatoties

uz vairākām nekrotisko audu ekscīzijām un brūces revīzijas operācijām, kā arī plaši lietoto antimikrobiālo terapiju, infekcija recidivēja un attīstījās augšstilba kaula osteomielīts, ko galvenokārt ierosināja tieši MDR *P. aeruginosa*. Pētījuma rezultāti liecina, ka izolētā MDR *P. aeruginosa* bija ne tikai rezistenta pret dažādām antibakteriālām vielām, bet arī spēcīga biofilmu veidotāja, kas veicināja recidivējošas infekcijas attīstību un rezultējās ar nesekmīgu standarta antibakteriālu un ķirurģisko terapiju. Izolētais MDR *P. aeruginosa* celms bija jutīgs pret ceftazidīmu/avibaktāmu, tomēr tā izmantošana monoterapijā var būt neefektīva, jo rezistences attīstības risks pret ceftazidīmu/avibaktāmu ir augsts un notiek salīdzinoši īsā laikā (68). Šie apsvērumi lika izmantot bakteriofāgu terapiju.

Bakteriofāgu spēja pašreplīcēties un ražot polisaharīdu depolimerāzes, kuras ir spējīgas noārdīt baktēriju izveidotās biofilmas struktūras, padara tos par pievilcīgu līdzekli arī *P. aeruginosa* biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā (36, 69). Vairāki *in vitro* pētījumi ir pierādījuši antibakteriālu līdzekļu un antipseidomonālo bakteriofāgu sinerģisku iedarbību, tomēr šāda mijiedarbība nav absolūta un ir saistīta ar antibakteriālā līdzekļa darbības mehānismu (29, 70). Fāgu un antibakteriālo līdzekļu mijiedarbībai būtiska loma ir arī vides faktoriem, piemēram, temperatūrai, skābekļa daudzumam, pH un citiem, kas būtiski ietekmē baktērijas biofilmas veidošanas spēju (71, 72). Šādi apsvērumi rada arī apgrūtinājumu, lai salīdzinātu klīniskos un laboratoriskos rezultātus biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā. Šobrīd pieejamie dati par fāgu terapiju liecina, ka tā ir droša (73, 74), ja bakteriofāgu preparāts tiek sagatavots pēc kvalitātes un drošības kritērijiem atbilstoši fāgu preparātiem (35, 39), tomēr šie dati ir ierobežoti un nepieciešami tālāki klīniskie pētījumi. Līdz ar to infekciju ārstēšanai būtu jāizmanto fāgu preparāti, kas ir labi apraksīti un droši pacientu ārstēšanā, piemēram, bakteriofāgu kokteilis BFC 1.10, kurš tika izmantots konkrētajam pacientam ar osteomielītu (34). Tika novērota BFC 1.10 un

ceftazidīma/avibaktāma aditīvā iedarbība planktonisko šūnu augšanā un biofilmas izveides profilaksē. Būtiski, ka biofilmas novēršanai nepieciešamā antibiotikas koncentrācija, kombinējot fāgus ar antibiotiku, samazināja ceftazidīma/avibaktāma MIC robežvērtību, panākot baktērijas jutību pret antibiotiku (2.5. attēls) atbilstoši EUCAST standartam biofilmas profilakses modelī.

Sešus mēnešus pēc ārstēšanas pabeigšanas pacienta brūces bija sadzijušas, iekaisuma rādītāji bija normas robežās, kā arī veiktie radioloģiskie izmeklējumi un audu punkcija neliecināja par infekcijas recidīvu. Neraugoties uz augšstilba proksimālās puses infekcijas izārstēšanu, augšstilba distālajā daļā saglabājās MDR *P. aeruginosa* un VRE infekcija. Līdz ar to izmantotā bakteriofāgu un antibiotiku ārstēšana nerezultējās ar pilnīgu bakteriālu eradikāciju, bet panāca osteomielīta izārstēšanu acetabulārajā rajonā, kas ļāva veikt gūžas endoprotezēšanu. Ne mazāk svarīgi, ka ārstēšanas laikā netika novērotas terapijas blakusparādības.

Augšstilba distālā segmenta infekcija pēc labās gūžas locītavas endoprotēzes implantācijas tika veiksmīgi ārstēta ar DAIR (angliski, *debridement, antibiotics and implant retention*) un supresīvo antibakteriālu terapiju, izmantojot kolistīnu un fosfomicīnu. Lai izvairītos no persistējošas infekcijas citā kaula segmentā, varētu veikt precīzākus izmeklējumus, piemēram, leikocītu scintigrāfiju vai pozitronu emisijas tomogrāfiju ar datortomogrāfiju (PET/CT). Vēl viens risinājums varētu būt bakteriofāgu sistēmiska lietošana vai to ievade augšstilba kanālā, bet šajā gadījumā to nebija iespējams veikt, jo kanālu veidoja sklerotiski audi un tajā nebija iespējams ievietot irigācijas sistēmu. Locītavu endoprotēzes asociētu infekciju gadījumā varētu izmantot hidrogeļa pārklājumu ar bakteriofāgiem. Šāda veida pieeja ir aprakstīta atsevišķos veiksmīgi ārstētos klīniskos gadījumos, tomēr dati par to ir ļoti ierobežoti (75).

Bakteriofāgu eksperimentālais lietojums multirezidenta *Pseudomonas aeruginosa* LVAD kabeļa infekcijas ārstēšanā

LVAD implantācija pēdējos gados ir kļuvusi arvien izplatītāka, galvenokārt kā tilts sirds transplantācijai (76). Papildus labā kambara mazspējai, asiņošanai, trombembolijai un LVAD pumpja darbības traucējumiem viena no biežākajām komplikācijām ir bakteriāla infekcija (77, 78). Tiek lēsts, ka tikai 58,9 % pacientu ar LVAD pirmajā gadā pēc ierīces implantācijas neattīstās ar to saistīta pirmā nopietnā bakteriālā infekcija; trīs gadus pēc ierīces implantācijas tikai 38,2 % pacientu nav bijusi ar ierīci asociēta bakteriāla infekcija (79). LVAD kabeļa infekcija ir viena no biežākajām ar LVAD saistītām infekcijām, tās izplatība ir 18,8–100 % (80). Tāpat kā citu implantēto ierīču infekciju gadījumā, arī ar LVAD asociētas infekcijas gadījumā ārstēšana ir apgrūtināta un bieži nepieciešama ķirurģiska iejaukšanās (81). Sākotnējā LVAD kabeļa infekcijas ārstēšana ietver sistēmisku antibiotiku lietošanu, tomēr parasti šāda veida pieeja rezultējas ar neveiksmīgu iznākumu un ir nepieciešama LVAD kabeļa ķirurģiska repozīcija. Polijā veiktā pētījumā kabeļa infekcijas izārstēšana, lietojot tikai antibiotikas, tika sasniegta 27 %, savukārt atlikušajos 73 % bija nepieciešama kabeļa ķirurģiska repozīcija, būtiski, ka šo pacientu vidū mirstība bija 11,5 % (81).

Galvenie ierosinātāji šāda veida infekcijām ir grampozitīvi koki, tomēr līdzīgi osteomielīta infekcijas gadījumam gramnegatīvās baktērijas ir sastopamas arvien biežāk un rada lielāku risku, jo to antibakteriālā rezistence ir plašāka (23, 82). ASSIST-ICD pētījumā, kurā piedalījās 19 centri, *P. aeruginosa* infekcijas tika konstatētas 13,7 % (83, 84).

Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka ar LVAD saistīto infekciju sekmīgai ārstēšanai vispiemērotākā var būt lokāla un intravenoza fāgu lietošana kopā ar antibiotikām un ķirurģisku ārstēšanu. Līdz šim publicēti divi ar MDR *P. aeruginosa* LVAD saistīto infekciju ārstēšanas gadījumi, izmantojot fāgus.

Vienā gadījumā, izmantojot to pašu ārstēšanas pieeju, kombinējot terapiju ar fāgiem, tika panākta pacienta izārstēšana un baktēriju eradikācija (85). Otrā gadījumā tika izmantoti tikai fāgi un antibiotikas, ārstēšana bija neveiksmīga, ārstēšanas laikā infekcija atjaunojās un attīstījās rezistence pret fāgiem (86). Vērtējot ārstēšanas drošuma aspektus, no iegūtajiem datiem var secināt, ka intravenozi lietotie fāgi koncentrācijā 10^7 PFU/ml neradīja blakusparādības, līdzīgi *Aslam et al.* publicētajā gadījumā (87). Tāpēc turpmākai fāgu lietošanai optimāla varētu būt 10^7 PFU/ml liela antipseidomonālo fāgu deva.

Veiktajos *in vitro* biofilmu modeļos tika konstatēti atšķirīgi rezultāti. Abi fāgi, izmantojot saimnieka (mātes) baktērijas celmu CN573, spēja iznīcināt planktoniskās šūnas un baktēriju šūnas noformēto biofilmu. Savukārt, izmantojot pacienta izolātu PAP01, biofilmās esošo baktēriju šūnu iznīcināšana bija nesekmīga. Viens no apsvērumiem, kas varētu izskaidrot iegūtos rezultātus, ir atšķirīgā baktēriju jutība pret izmantotajiem fāgiem: CN573 bija jutīgāka pret fāgiem, salīdzinot to ar PAP01, būtiski, ka EOP, izmantojot PNM PAP01 kultūrā, bija tikai 0,0005, kas norāda uz ļoti vāju bakteriofāgu lītisko efektu. Ja fāgi ir iepriekš pielāgoti saimniekbaktērijām, kā tas bija PNM un PT07 gadījumā pret CN573, tie ir efektīvāki. Tāpēc labākos fāgu terapijas rezultātus varētu sasniegt, izmantojot personalizētus fāgu preparātus, kas satur fāgus, kuri ir atlasīti vai pat iepriekš adaptēti, lai labāk iedarbotos uz pacienta inficējošo baktēriju (88). Tomēr šāda pieeja ir laikietilpīga un dārgāka, tāpēc fāgu terapija ir grūtāk lietojama klīniskajā praksē. Svarīgi atzīmēt, ka arī pēdējās iespējas ārstēšana ar antibiotikām ir ļoti dārga un ne vienmēr pieejama. Vēl viens būtisks faktors ir biofilmas struktūra; saskaņā ar iegūtajiem rezultātiem *P. aeruginosa* celms CN573 veidoja izteiktāku biofilmu nekā celms PAP01, pieņemot, ka fāgiem būtu vieglāk iznīdēt PAP01 biofilmu. Tomēr tas netika novērots, un to varētu izskaidrot ar biofilmas blīvuma atšķirībām. *Hu et al.* parādīja, ka fāgu iekļūšana un lītiskā efektivitāte biofilmā ir atkarīga ne tikai no tās lieluma, bet

arī biofilmas polisaharīdu blīvuma (89). Tas ir viens no pētījuma trūkumiem, jo netika noteikts biofilmas blīvums, kas būtu jāveic, izmantojot citas metodes, piemēram, konfokālā lāzera skenēšanas mikroskopiju. Tas spētu dot atbildi, vai fāgu vājš biofilmas iznīcināšanas efekts PAP01 kultūrā bija saistīts ar biofilmas blīvumu, nevis tās lielumu.

Baktēriju rezistences attīstība pret fāgiem var notikt relatīvi ātri gan *in vitro*, gan *in vivo* vidēs (90). Biofilmā, pēc tam kad fāgu iedarbības rezultātā tā ir daļēji destruēta, bakteriofāgi nokļūst pie baktēriju šūnām dziļākos slāņos, kur baktērijas var būt fenotipiski atšķirīgas, proti, var konstatēt fāgiem rezistentu baktēriju klātbūtni (26). Veiktā pētījuma rezultāti parāda, ka rezistence pret fāgiem visvairāk tika novērota biofilmas eradikācijas modelī, tās sastopamība bija no 70 % līdz 100 % PNM un PT07, kā arī to kombinācijām. Tas varētu izskaidrot fāgu nespēju iznīcināt noformēto PAP01 biofilmu, kur fāgi sasnieguši baktērijas tās dziļākajos slāņos. Fāgu rezistences klātesamība tika konstatēta arī biofilmas profilakses modelī, bet tā bija retāka; PNM gadījumā tā bija 70–100 %, PT07 gadījumā – 10–40 %, bet, izmantojot šo fāgu kombināciju, tā bija tikai 10–20 % (2.8. attēls). Stratēģijas, kas ietver kombinētu ārstēšanu ar fāgiem un antibiotikām, var nodrošināt labāku iznākumu, jo baktēriju rezistences attīstība pret fāgiem var radīt baktēriju antibakteriālās jutības izmaiņas, kas var padarīt bakteriālo ierosinātāju jutīgu pret izmantotajām antibiotikām un samazināt baktērijas virulenci (91). Līdzīgus rezultātus ir publicējis *Burmeister et al.*, kur vērojams, ka fāgu rezistentiem celmiem var attīstīties jutība pret iepriekš neefektīvām antibiotikām (92). Tomēr fāgu un antibiotiku mijiedarbība ir sarežģīta, un ne vienmēr tai piemīt sinerģisks efekts; gluži pretēji, var novērot pat antagonistisku efektu. Fāgu un antibiotiku kombināciju iedarbība ir atkarīga arī no to ievadīšanas secības, fāga koncentrācijas, kā arī no antibiotikas un fāga darbības mehānisma (29, 93). Iegūtie rezultāti parāda, ka ceftazidīms/avibaktāms viens pats nespēj iznīcināt planktoniskās šūnas. Lai to panāktu, nepieciešama

antibiotikas koncentrācijas palielināšana, savukārt, kombinējot terapiju, sākotnēji dodot 12 h fāgu PNM, PT07 vai abu kombināciju un tad 12 h antibiotiku, tiek vērots spēcīgs planktonisko šūnu augšanas inhibīcijas efekts. Lai inhibētu baktēriju šūnu augšanu biofilmā, bija nepieciešama trīs reizes lielāka ceftazidīma/avibaktāma koncentrācija, kas sasniedz sliekšni, lai baktēriju definētu kā rezistentu pret šo antibiotiku. Izmantojot stratēģiju, kad pēc 12 h fāgu iedarbības tiek izmantotas antibiotikas vēl 12 h, biofilmas eradikācija tika novērota visos eksperimentos neatkarīgi no antibiotikas koncentrācijas. Šie dati liecina, ka nav nepieciešama maksimālā antibiotikas koncentrācija, lai panāktu vēlamu biofilmas eradikācijas efektu, ja fāgus pareizi kombinē ar antibiotikām, t. i., precīzi nosaka to izmantošanas ilgumu un secību.

Šī brīža standarta pieeja LVAD asociētu infekciju ārstēšanā ietver audu nekrektomijas un brūces ķirurģisku sanēšanu, kas tiek kombinēta ar antibiotiku terapiju. Ķirurģiska iejaukšanās ir būtiska, lai mehāniski noņemtu un likvidētu biofilmu no LVAD kabeļa (80). Līdzīgi arī veiktajā pētījumā tika veikta LVAD kabeļa mehāniska tīrīšana un ievietošana jaunā vietā, kas, visticamāk, bija galvenais biofilmas eradikācijas aspekts, savukārt antibiotiku un fāgu lietošana nepieļāva jaunas biofilmas veidošanos un bakterēmijas vai septicēmijas attīstību no atlikušajām baktēriju šūnām.

Vēl viens iemesls, kāpēc nepieciešama kombinēta terapija ar fāgiem, ir *P. aeruginosa* straujā rezistences attīstība pret antibiotikām, kuras pamatā ir multipli iedzimtās un iegūtās rezistences mehānismi (94). Pacienta *P. aeruginosa* izolātiem infekcijas laikā bija vērojama mainīga antibakteriālā jutība (2.5. tabula), tāpēc mēs nevaram būt droši, ka rezistence pret amikacīnu un ceftazidīmu/avibaktāmu neradīsies ārstēšanas laikā. Tas pamato nepieciešamību MDR bakteriālo infekciju gadījumā izmantot citus efektīvus ārstēšanas līdzekļus, piemēram, fāgus, kuru rezistences attīstība nav saistīta ar antibiotiku rezistences attīstības gēniem.

Darba kritiskais vērtējums

Veiktajam pētījumam bija vairāki limitējoši faktori, kā viens no tiem iespējamā izolēto baktēriju mazā daudzveidība, kuru var palielināt, iesaistot pacientus no dažādiem reģioniem, valstīm. Līdz ar daudzveidības trūkumu var būt neprecīzi izvērtēts bakteriofāgu efekts.

Baktēriju veidotās biofilmas noteikšanas modelis un apstākļi būtiski ietekmē iegūto rezultātu, ir grūti paredzēt un pierādīt identiska rezultāta esamību cilvēka organismā, tāpēc iegūtie rezultāti tikai atspoguļo baktērijas biofilmas veidošanas spēju.

Bakteriofāgu lītisko efektu cilvēka organismā ietekmē multipli faktori, piemēram, pH, fāgu neitralizējošo antivielu veidošanās, nespecifiskie imunitātes faktori, tāpēc *in vitro* fāgu efektivitātes rezultāts tikai daļēji norāda uz to iespējamo efektu *in vivo*. Bakteriofāgu mijiedarbība ar baktērijām infekcijas gadījumā ir dinamisks process, kura laikā notiek abu iesaistīto mainība, var attīstīties fāgu rezistence un notikt dabiska fāgu adaptācija rezistences pārvarēšanai. Tāpēc noteiktie rezistences rezultāti un adaptācija rezistences pārvarēšanai teorētiski pierāda abu procesu pastāvēšanu un iespējamo ietekmi uz iznākumu. Bakteriofāgu mijiedarbība ar antibiotiskām vielām ir daudzveidīga, darba gaitā netika noteiktas visas iespējamās izmantoto antibiotiku un fāgu lietošanas kombinācijas un režīmi, kas var radīt selektīvu iegūto rezultātu atlasī.

Darba gaitā tika ārstēti tikai divi pacienti ar dzīvībai bīstamām multirezistentām infekcijām, kas neļauj izdarīt plašus secinājumus par fāgu terapijas efektivitāti un drošību klīniskā aspektā. Rezultāti drīzāk papildina esošos datus par fāgu terapiju. Precīzākam izvērtējumam būtu nepieciešams iesaistīt lielāku pacientu skaitu un veikt klīniskos pētījumus.

Secinājumi

1. Darbā izvirzītā hipotēze apstiprinās daļēji, jo bakteriofāgiem un to kombinācijai ar antibiotikām piemīt biofilmas eradikācijas spēja daļā izolēto baktēriju. Baktēriju biofilmās, kur eradikāciju nevēroja, ir nepieciešamas papildu darbības, kā fāgu adaptācija, vai specifiska bakteriofāgu un antibiotiku režīma ievērošana, lai panāktu vēlamu rezultātu.
2. *S. aureus* kolonizācija ir saistīta ar lielāku PD pacientu mirstību.
 - a. PD pacienti ir kolonizēti ar fenotipiski atšķirīgiem *S. aureus* izolātiem, vērtējot to biofilmas veidošanas spēju un fāgu jutību.
3. Bakteriofāgiem piemīt baktēriju biofilmas eradikācijas un planktonisko šūnu augšanas inhibīcijas spēja gan pret antibiotikām jutīgās, gan rezistentās uropatogēnās *E. coli* kultūrās.
4. *P. aeruginosa* rezistence attīstās relatīvi ātri *in vitro* modeļos un ietekmē biofilmas eradikācijas rezultātu, bet nav skaidra tās ietekme *in vivo*.
 - a. Izmantojot adaptācijas metodi, var pārvarēt *S. aureus* un *E. coli* rezistenci pret fāgiem.
5. Fāgu lokāla terapija un sistēmiska terapija kombinācijā ar antibiotikām ir droša un nerada nepārvaramas blakusparādības, kas papildina jau esošos publicētos datus un ļauj to izmantot nākotnē.
 - a. Fāgu preparātam BFC 1.10 ir aditīva mijiedarbība ar ceftazidīmu/avibaktāmu. Šos līdzekļus kombinējot ar ķirurģisku terapiju, var panākt MDR *P. aeruginosa* osteomielīta klīnisku izārstēšanu, bet ne pilnīgu bakteriālu eradikāciju.

- b. Fāgiem PNM un PT07 kombinācijā ar ceftazidīmu/avibaktāmu ir būtiska lietošanas secība: izmantojot vispirms fāgus un pēc tam antibiotiku, ir vērojama lielāka antibakteriālā efektivitāte. Šos līdzekļus kombinējot ar ķirurģisku terapiju, var izārstēt MDR *P. aeruginosa* LVAD kabeļa infekciju un panākt pilnīgu bakteriālu eradikāciju.

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas starptautiski recenzējamos zinātniskajos izdevumos:

1. **Racenis, K.**, Kroica, J., Rezevska, D., Avotins, L., Skuditis, E., Popova, A., . . . Petersons, A. 2020. *S. aureus* Colonization, Biofilm Production, and Phage Susceptibility in Peritoneal Dialysis Patients. *Antibiotics*, 9(9), 582. doi:10.3390/antibiotics9090582
2. Mukane, L., **Racenis, K.**, Rezevska, D., Petersons, A., & Kroica, J. 2022. Anti-Biofilm Effect of Bacteriophages and Antibiotics against Uropathogenic. *Antibiotics (Basel)*, 11(12). doi:10.3390/antibiotics11121706
3. **Racenis, K.**, Rezevska, D., Madelane, M., Lavrinovics, E., Djebara, S., Petersons, A., & Kroica, J. 2022. Use of Phage Cocktail BFC 1.10 in Combination With Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Multidrug-Resistant. *Front Med (Lausanne)*, 9, 851310. doi:10.3389/fmed.2022.851310
4. **Racenis, K.**, Lācis, J., Rezevska, D., Mukane, L., Vilde, A., Putnins, I., . . . Kroica, J. 2023. Successful Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against Multidrug-Resistant. *Viruses*, 15(5). doi:10.3390/v15051210

Publikācijas Latvijā recenzējamos zinātniskajos izdevumos:

1. **Rācenis, K.**, Kroiča, J., Eglīte, L., Mihailova, I., Reinis, A., Skadiņš, I., . . . Petersons, A. 2017. Bakteriofāgu lītiskā efekta vērtējums biofilmu producējošās uropatogēnās *E. coli* kultūrās. *RSU Zinātniskie raksti*, 166–173.

Ziņojumi un tēzes starptautiskās konferencēs:

1. **Racenis, K.** 2023. Phage therapy: a personalized approach in the treatment of multi-drug resistant infections. *PMNET Forum 2023*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
2. **Rācenis, K.**, Kroiča, J., Rezevska, D., Mukāne, L., Pētersons, A. 2023. The clinical application of bacteriophages in complicated biofilm-associated infections. *RSU Research week 2023: Knowledge for Use in Practice*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
3. **Racenis, K.**, Petersons, A., Kroica, J. 2022. Combination treatment of antibiotics and phages in biofilm-related infections. *44TH ICMM World congress 2021*. Brussels, Belgium. (Mutisks referāts).
4. **Rācenis, K.**, Pētersons, A., Munkena, Z., Rezevska, D., Broks, R., Gailīte, L., & Kroiča, J. 2021. Risk factor detection for biofilm formation in *E. coli*. 275. *RSU Research week 2021: Knowledge for Use in Practice*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).

5. **Racenis, K.**, Kroica, J., Petersons, A. 2019. Detection of biofilm formation among uropathogenic ESBL-producing Escherichia coli. *29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. Amsterdam, Netherlands. (Stenda referāts).
6. **Racenis, K.** 2019. Bacteriophage use in bacterial biofilm treatment. Reintroduction of *Bacteriophages in today's medicine space*. *Phage Meeting Berlin 2019*. Berlin, Germany. (Mutisks referāts).
7. **Racenis, K.**, Kroica, J., Mukane L., Petersons A., 2019. E. coli biofilm eradication using meropenem and INTESTI bacteriophage cocktail. *77th International Scientific Conference of the University of Latvia*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
8. **Racenis, K.**, Kroica, J., Mukane, L., Petersons, A. 2019. Bacteriophage Treatment in Biofilm Associated Infections. *RSU International conference on medical and health care sciences*. Riga, Latvia. (Mutisks referāts).
9. **Rācenis, K.**, Pētersons, A., Kroiča, J. 2018. Bacterial biofilm as a major factor for treatment of urinary tract infection. *XIV Baltic Nephrology Conference*. Tallinn, Estonia. (Stenda referāts).
10. **Racenis, K.**, Olive, A. S., Avotins, L., Petersons, A., Balode, A. O., Kroica, J. 2018. Biofilm formation screening among uropathogenic E.coli. *28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Madrid, Spain. (Stenda referāts).
11. **Rācenis, K.**, Matīsa, D., Pētersons, A., Kroiča, J. 2017. First steps in phage treatment among bacterial biofilms. *1st German Phage Symposium*. Stuttgart, Germany. (Stenda referāts).
12. **Racenis, K.**, Eglite, L., Reinis, A., Skadins, I., Kroica, J. 2016. Prevention of bioceramics against bacterial contamination using bacteriophages. *4th World Congress on Targeting Infectious Diseases "Phage Therapy 2016"*. Paris, France. (Stenda referāts).
13. **Rācenis, K.**, Eglīte, L., Avotiņš, L., Saulkalne, L., Vītola, L., Kuzema, V., Pētersons, A., Kroiča, J. Bacteriophages as potential treatment for infections in S.aureus colonised nephrological patients: an in vitro study. *XIII Baltic Nephrology Conference*. Jurmala, Latvia. (Mutisks referāts).

Ziņojumi un tēzes vietēja mēroga konferencēs Latvijā:

1. **Rācenis, K.**, Kroiča, J., Avotiņš, L., Vītola, L., Saulkane, L., Puide, I., Mihailova, I., Pētersons, A. 2018. S. aureus dekontaminācija nefroloģiskiem pacientiem, izmantojot dažādus bakteriofāgus. *Rīgas Stradiņa universitātes zinātniskā konference, 2018*. Rīga, Latvija. (Mutisks referāts).
2. **Rācenis, K.**, Eglīte, L., Balode, A. O., Pētersons, A., Silda, A., Kroiča, J. 2017. Bakteriofāgu lītiskā efekta izvērtējums no pacientiem izdalītās E. coli kultūrās. *RSU zinātniskā konference, 2017*. Rīga, Latvija. (Mutisks referāts).

3. **Rācenis, K.** Bakteriofāgu lītiskā efekta vērtējums biofilmu producējošās uropatogēnās *E. coli* kultūrās. 2017. RSU TIF rezidentu 20. zinātniski praktiskā konference un konkurss “Mūsdienu aktualitātes medicīnā”. Rīga, Latvija. (Mutisks referāts).
4. **Rācenis, K.,** Eglīte, L., Dišlers, A., Klinklava, V. O., Kroiča, J. 2016. Bakteriofāgu lītisko spēju raksturojums in vitro. *Rīgas Stradiņa universitātes 15. zinātniskā konference*. Rīga, Latvija. (Stenda referāts).

Literatūras saraksts

1. World Health Organization. 2021. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (glass) report 2021*. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/341666/9789240027336-eng.pdf> [Viewed: 15.07.2023].
2. European Centre for Disease Prevention and Control. 2022. *Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the eu/eea, 2016–2020*. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Health-burden-infections-antibiotic-resistant-bacteria.pdf> [Viewed: 15.07.2023].
3. European Parliament. 2023. *European parliament resolution of 1 june 2023 on eu action to combat antimicrobial resistance (2023/2703(rsp))*. Available from: https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-9-2023-0220_EN.html [Viewed: 15.07.2023].
4. Łusiak-Szelachowska, M. et al. 2022. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: What we have learned so far. *J Biomed Sci.* 29(1), 23.
5. Abedon, S. T. et al. 2011. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage.* 1(2), 66–85.
6. Holmfeldt, K. et al. 2007. Large variabilities in host strain susceptibility and phage host range govern interactions between lytic marine phages and their flavobacterium hosts. *Appl Environ Microbiol.* 73(21), 6730–6739.
7. Whitty, R. et al. 2017. Residual kidney function and peritoneal dialysis-associated peritonitis treatment outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 12(12), 2016–2022.
8. Kitterer, D. et al. 2015. Microbiological surveillance of peritoneal dialysis associated peritonitis: Antimicrobial susceptibility profiles of a referral center in germany over 32 years. *PLoS One.* 10(9), e0135969.
9. Govindarajulu, S. et al. 2010. Staphylococcus aureus peritonitis in australian peritoneal dialysis patients: Predictors, treatment, and outcomes in 503 cases. *Perit Dial Int.* 30(3), 311–319.
10. Xu, G., Tu, W. and Xu, C. 2010. Mupirocin for preventing exit-site infection and peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 25(2), 587–592.
11. Simões-Silva, L. et al. 2018. Oral colonization of. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2018, 5789094.
12. Li, P. K. and Chow, K. M. 2011. Infectious complications in dialysis – epidemiology and outcomes. *Nat Rev Nephrol.* 8(2), 77–88.
13. Kane, T. L., Carothers, K. E. and Lee, S. W. 2018. Virulence factor targeting of the bacterial pathogen staphylococcus aureus for vaccine and therapeutics. *Curr Drug Targets.* 19(2), 111–127.

14. Ricciardi, B. F. et al. 2018. Staphylococcus aureus evasion of host immunity in the setting of prosthetic joint infection: Biofilm and beyond. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 11(3), 389–400.
15. Tajbakhsh, E. et al. 2016. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic e. Coli isolated from clinical samples in iran. *Antimicrob Resist Infect Control.* 5, 11.
16. Lee, D. S., Lee, S. J. and Choe, H. S. 2018. Community-acquired urinary tract infection by. *Biomed Res Int.* 2018, 7656752.
17. Asadi Karam, M. R., Habibi, M. and Bouzari, S. 2019. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against uropathogenic escherichia coli. *Mol Immunol.* 108, 56–67.
18. Kaplan, J. B. 2011. Antibiotic-induced biofilm formation. *The International journal of artificial organs.* 34(9).
19. Penesyan, A. et al. 2020. Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Frontiers in microbiology.* 11.
20. Malone, M. et al. 2017. The prevalence of biofilms in chronic wounds: A systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of Wound Care.* 26(1), 20–25.
21. Depypere, M. et al. 2020. Pathogenesis and management of fracture-related infection. *Clin Microbiol Infect.* 26(5), 572–578.
22. Guerra, M. T. E. et al. 2017. Infection rate in adult patients with open fractures treated at the emergency hospital and at the ulbra university hospital in canoas, rio grande do sul, brazil. *Rev Bras Ortop.* 52(5), 544–548.
23. Lumish, H. S. et al. 2022. Driveline infection in left ventricular assist device patients: Effect of standardized protocols, pathogen type, and treatment strategy. *ASAIO J.* 68(12), 1450–1458.
24. Harada, L. K. et al. 2018. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol Res.* 212-213, 38–58.
25. Olsen, N. M. C. et al. 2018. Synergistic removal of static and dynamic. *Viruses.* 10(8).
26. Chegini, Z. et al. 2020. Bacteriophage therapy against pseudomonas aeruginosa biofilms: A review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 19(1), 45.
27. Luong, T., Salabarria, A. C. and Roach, D. R. 2020. Phage therapy in the resistance era: Where do we stand and where are we going? *Clin Ther.* 42(9), 1659–1680.
28. Suh, G. A. et al. 2022. Considerations for the use of phage therapy in clinical practice. *Antimicrob Agents Chemother.* 66(3), e0207121.
29. Gu Liu, C. et al. 2020. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry. *mBio.* 11(4).

30. Oechslin, F. 2018. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 10(7).
31. Egado, J. E. et al. 2022. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 46(1).
32. Mangalea, M. R. and Duerkop, B. A. 2020. Fitness trade-offs resulting from bacteriophage resistance potentiate synergistic antibacterial strategies. *Infect Immun*. 88(7).
33. Mcgee, L. W. et al. 2023. Phage-resistant mutations impact bacteria susceptibility to future phage infections and antibiotic response. *Ecol Evol*. 13(1), e9712.
34. Merabishvili, M. et al. 2009. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*. 4(3), e4944.
35. Pirnay, J. P. et al. 2015. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res*. 32(7), 2173-2179.
36. Onsea et al. 2019. Bacteriophage application for difficult-to-treat musculoskeletal infections: Development of a standardized multidisciplinary treatment protocol. *Viruses*. 11(10), 891.
37. Rose, T. et al. 2014. Experimental phage therapy of burn wound infection: Difficult first steps. *International journal of burns and trauma*. 4(2), 66–73.
38. Jennes, S. et al. 2017. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive pseudomonas aeruginosa septicemia in a patient with acute kidney injury—a case report. *Crit Care*. 21(1), 129.
39. Merabishvili, M., Pirnay, J. P. and De Vos, D. 2018. Guidelines to compose an ideal bacteriophage cocktail. *Methods Mol Biol*. 1693, 99–110.
40. Stepanović, S. et al. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8), 891–899.
41. Ceri, H. et al. 1999. The calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.
42. Harrison, J. J., Turner, R. J. and Ceri, H. 2005. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiology*. 5(1), 53.
43. Fernández-Olmos, A. et al. 2012. In vitro prevention of pseudomonas aeruginosa early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*. 40(2), 173-176.
44. Association, W. M. 2013. World medical association declaration of helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 310(20), 2191–2194.

45. Grundmann, H. et al. 2010. Geographic distribution of staphylococcus aureus causing invasive infections in europe: A molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 7(1), e1000215.
46. Burrowes, B. H., Molineux, I. J. and Fralick, J. A. 2019. Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: The appelmans protocol. *Viruses.* 11(3).
47. North, O. I. et al. 2019. Phage tail fibre assembly proteins employ a modular structure to drive the correct folding of diverse fibres. *Nat Microbiol.* 4(10), 1645–1653.
48. Sergueev, K. V. et al. 2019. Correlation of host range expansion of therapeutic bacteriophage sb-1 with allele state at a hypervariable repeat locus. *Appl Environ Microbiol.* 85(22).
49. Sybesma, W. et al. 2016. Bacteriophages as potential treatment for urinary tract infections. *Front Microbiol.* 7, 465.
50. Barretti, P. et al. 2012. Peritoneal dialysis-related peritonitis due to staphylococcus aureus: A single-center experience over 15 years. *PLoS One.* 7(2), e31780.
51. Sharma, G. et al. 2016. Escherichia coli biofilm: Development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol.* 121(2), 309-319.
52. Surgers, L. et al. 2019. Biofilm formation by esbl-producing strains of escherichia coli and klebsiella pneumoniae. *International journal of medical microbiology: IJMM.* 309(1).
53. Whelan, S. et al. 2020. Uropathogenic escherichia coli biofilm-forming capabilities are not predictable from clinical details or from colonial morphology. *Diseases (Basel, Switzerland).* 8(2).
54. Zhou, F. et al. 2022. Control measurements of escherichia coli biofilm: A review. *Foods (Basel, Switzerland).* 11(16).
55. Lebeaux, D., Ghigo J.-M., Beloin, C. 2014. Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 78(3).
56. Visnapuu, A. et al. 2022. Deconstructing the phage-bacterial biofilm interaction as a basis to establish new antibiofilm strategies. *Viruses.* 14(5).
57. Taati Moghadam, M. et al. 2020. How phages overcome the challenges of drug resistant bacteria in clinical infections. *Infect Drug Resist.* 13, 45–61.
58. Ballén, V. et al. 2022. Clinical escherichia coli: From biofilm formation to new antibiofilm strategies. *Microorganisms.* 10(6), 1103.
59. Liu, S. et al. 2022. Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: A review. *Pharmaceutics.* 14(2), 427.
60. Kremers, H. M. et al. 2015. Trends in the epidemiology of osteomyelitis: A population-based study, 1969 to 2009. *J Bone Joint Surg Am.* 97(10), 837–845.

61. Fang, C. et al. 2017. Infection after fracture osteosynthesis - part i. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 25(1), 2309499017692712.
62. Gustilo, R. B., Mendoza, R. M. and Williams, D. N. 1984. Problems in the management of type iii (severe) open fractures: A new classification of type iii open fractures. *J Trauma*. 24(8), 742–746.
63. Benito, N. et al. 2019. The different microbial etiology of prosthetic joint infections according to route of acquisition and time after prosthesis implantation, including the role of multidrug-resistant organisms. *J Clin Med*. 8(5).
64. Garner, M. R. et al. 2020. Antibiotic prophylaxis in open fractures: Evidence, evolving issues, and recommendations. *J Am Acad Orthop Surg*. 28(8), 309–315.
65. Sudduth, J. D. et al. 2020. Open fractures: Are we still treating the same types of infections? *Surg Infect (Larchmt)*. 21(9), 766–772.
66. Qin, S. et al. 2022. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 7(1), 199.
67. Ruffin, M. and Brochiero, E. 2019. Repair process impairment by. *Front Cell Infect Microbiol*. 9, 182.
68. Wang, Y. et al. 2020. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist*. 22, 18–27.
69. Stone, E. et al. 2019. Understanding and exploiting phage–host interactions. *Viruses*. 11(6), 567.
70. Tagliaferri, T. L., Jansen, M. and Horz, H. P. 2019. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: Phages and antibiotics as combined strategy. *Front Cell Infect Microbiol*. 9, 22.
71. Pires, D. P. et al. 2015. Phage therapy: A step forward in the treatment of *pseudomonas aeruginosa* infections. *J Virol*. 89(15), 7449–7456.
72. Manohar, P. et al. 2022. Synergistic effects of phage-antibiotic combinations against. *ACS Infect Dis*. 8(1), 59–65.
73. Clarke, A. L., De Soir, S. and Jones, J. D. 2020. The safety and efficacy of phage therapy for bone and joint infections: A systematic review. *Antibiotics (Basel)*. 9(11).
74. Liu, D. et al. 2021. The safety and toxicity of phage therapy: A review of animal and clinical studies. *Viruses*. 13(7).
75. Ferry, T. et al. 2020. The potential innovative use of bacteriophages within the dac. *Front Med (Lausanne)*. 7, 342.
76. Frigerio, M. 2021. Left ventricular assist device: Indication, timing, and management. *Heart Fail Clin*. 17(4), 619–634.

77. Kilic, A., Acker, M. A. and Atluri, P. 2015. Dealing with surgical left ventricular assist device complications. *J Thorac Dis.* 7(12), 2158–2164.
78. Varshney, A. S. et al. 2022. Trends and outcomes of left ventricular assist device therapy: Jacc focus seminar. *J Am Coll Cardiol.* 79(11), 1092–1107.
79. Molina, E. J. et al. 2021. The society of thoracic surgeons intermacs 2020 annual report. *Ann Thorac Surg.* 111(3), 778–792.
80. O'horo, J. C. et al. 2018. Left ventricular assist device infections: A systematic review. *ASAIO J.* 64(3), 287–294.
81. Juraszek, A. et al. 2021. Prevalence and management of driveline infections in mechanical circulatory support – a single center analysis. *J Cardiothorac Surg.* 16(1), 216.
82. Kunz Coyne, A. J. et al. 2022. Therapeutic strategies for emerging multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa. *Infect Dis Ther.* 11(2), 661–682.
83. Rahal, A. et al. 2020. Left ventricular assist device-associated infections: Incidence and risk factors. *J Thorac Dis.* 12(5), 2654–2662.
84. Tattevin, P. et al. 2019. Risk factors and prognostic impact of left ventricular assist device-associated infections. *Am Heart J.* 214, 69–76.
85. Tkhilaishvili, T. et al. 2021. Successful case of adjunctive intravenous bacteriophage therapy to treat left ventricular assist device infection. *J Infect.* 83(3), e1–e3.
86. Tkhilaishvili, T. et al. 2022. Bacteriophage therapy as a treatment option for complex cardiovascular implant infection: The german heart center berlin experience. *J Heart Lung Transplant.* 41(5), 551-555.
87. Aslam, S. et al. 2020. Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the united states. *Open Forum Infect Dis.* 7(9), ofaa389.
88. Glonti, T. and Pirnay, J. P. 2022. In vitro techniques and measurements of phage characteristics that are important for phage therapy success. *Viruses.* 14(7).
89. Hu, J., Miyanaga, K. and Tanji, Y. 2010. Diffusion properties of bacteriophages through agarose gel membrane. *Biotechnol Prog.* 26(5), 1213–1221.
90. Castledine, M. et al. 2022. Parallel evolution of. *Elife.* 11.
91. Nale, J. Y. and Clokie, M. R. 2021. Preclinical data and safety assessment of phage therapy in humans. *Curr Opin Biotechnol.* 68, 310–317.
92. Burmeister, A. R. et al. 2020. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(21), 11207–11216.

93. Leclerc, Q. J., Lindsay, J. A. and Knight, G. M. 2022. Modelling the synergistic effect of bacteriophage and antibiotics on bacteria: Killers and drivers of resistance evolution. *PLoS Comput Biol.* 18(11), e1010746.
94. Wheatley, R. et al. 2021. Rapid evolution and host immunity drive the rise and fall of carbapenem resistance during an acute *pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat Commun.* 12(1), 2460.

Pateicības

Vēlos izteikt vislielāko pateicību maniem darba vadītājiem prof. **Jutai Kroičai** un prof. **Aivaram Pētersonam** par iedrošinājumu, pacietību un velīto laiku darba izstrādē.

Īpašs paldies kolēģiem **Dacei Rezevscai**, **Laimai Mukānei**, **Lāsmai Eglītei**, ar kuriem šos gadus esam kopā strādājuši bakteriofāgu pētniecībā un apguvuši dažādas metodes bakteriofāgu terapijā. Paldies arī LU Biomedicīnas pētījumu un studiju centra molekulārajiem bioloģiem **Andrim Dišleram** un **Veltai Osei-Klinklāvai** par apmācību pirmajos soļos bakteriofāgu pētniecībā.

Darba veikšana nebūtu iespējama bez slimnīcas kolēģu iesaistes un palīdzības. Paldies kolēģiem nefroloģijā, īpaši asoc. prof. **Viktorijai Kuzemai** par morālu atbalstu, infektoloģiem **Montai Madelānei** un **Aijai Vildei**, klīniskajiem mikrobioloģiem **Dacei Rudzītei** un **Inesei Jansonei**, par padomiem un palīdzību dažādu mikrobioloģisku testu veikšanā. Paldies par sadarbību mikroķirurģam **Ervīnam Lavrinovičam**, kardiķirurģam **Jānim Lācim** un pārējiem iesaistītajiem kardiķirurģijas kolēģiem un citiem medicīnas darbiniekiem.

Pētījuma veiksmīgai norisei būtiska bija bakteriofāgu ražošana un iespējama izmantošana, par to saku paldies kolēģiem no Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcas, īpaši **Jean-Paul Pirnay**, **Maya Merabishvili** un **Sarah Djebara**, kolēģiem no *Eliava* institūta Gruzijā, īpaši tā vadītājai **Mzia Kutateladze**. Paldies arī Ludviga Hiršfelda Imunoloģijas un eksperimentālās terapijas institūta kolēģiem, īpaši prof. **Andžejam Gorskim**, par motivācijas un entuziasma radīšanu fāgu terapijā.

Esmu pateicīgs arī kolēģiem Rīgas Stradiņa universitātē par atbalstu un stimulāciju pētījumu turpināšanā un darba pabeigšanā, īpaši prof. **Aivaram Lejniekam** un asoc. prof. **Aināram Stepenam** un kolēģiem Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā.

Paldies arī iesaistītajiem pacientiem, kuri nesavtīgi veltīja laiku zinātnes attīstībai.

Darbs ir veltīts manai ģimenei, īpaši sievai **Laurai Rācenei** un mūsu dēlam, par viņu sapratni, atbalstu un pacietību.