



Mohits Kakars

**Kompleksa klīniska, molekulārbioloģiska
un mikrobioloģiska izpēte bērna vecuma
akūta komplicēta un
nekomplicēta apendicīta gadījumā**

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

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – ķirurģija (bērnu ķirurģija)

Rīga, 2023



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Mohits Kakars

ORCID 0000-0001-5765-8207

Kompleksa klīniska, molekulārbioloģiska
un mikrobioloģiska izpēte bērna vecuma
akūta komplicēta un
nekomplicēta apendicīta gadījumā

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

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – klīniskā medicīna

Apakšnozare – ķirurģija (bērnu ķirurģija)

Rīga, 2023

Promocijas darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Bērnu ķirurģijas katedrā, Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā un Bērnu klīniskās universitātes slimnīcā, Latvijā

Promocijas darba vadītāji:

Dr. med. profesors **Arnīs Engēlis**,

Rīgas Stradiņa universitātes Bērnu ķirurģijas katedra un Bērnu klīniskā universitātes slimnīca, Latvija

Dr. med. profesore **Juta Kroiča**,

Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras vadītāja, Latvija

Zinātniskie konsultanti:

Dr. habil. med. profesors **Amulya Saxena**,

Čelsijas Bērnu slimnīca un Vestminsteras slimnīca, Londonas Imperiālā koledža, Apvienotā Karaliste

Dr. med. docents **Aigars Reinis**,

Rīgas Stradiņa universitātes Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, Latvija

Oficiālie recenzenti:

Dr. med. asociētais profesors **Artūrs Ozoliņš**,

Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. profesors **Dalius Malcius**,

Lietuvas Veselības zinātņu universitātes slimnīca

Dr. med. profesors **Udo Rolle**,

Frankfurtes universitātes klīnika, Vācija

Promocijas darba tiks aizstāvēts Rīgas Stradiņa universitātes promocijas padomes Klīniskās medicīnas Promocijas padomes atklātā sēdē 2023. gada 19. decembrī plkst. 15.00, Hipokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16 un attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*

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

Pētījumu atbalstīja Latvijas Zinātnes padome un Rīgas Stradiņa universitāte

Promocijas padomes sekretārs:

Dr. med. asociētā profesore **Zane Ābola**

Satura rādītājs

Saīsinājumi	4
Ievads.....	5
Mērķis	5
Uzdevumi	5
Hipotēze	5
Novitāte.....	6
1. Materiāli un metodes.....	7
1.1. Pētījuma vide un pētījuma populācija	7
1.2. Statistiskā analīze.....	8
2. Rezultāti.....	10
2.1. Rezultāti – biomarkķieri	10
2.1.1. Pacientu demogrāfiskie rādītāji.....	10
2.1.2. Pirmsoperācijas un pēcoperācijas biomarkķieru līmeņi.....	10
2.1.3. IL-6 līmenis serumā.....	12
2.1.4. IL-6 līmenis urīnā	12
2.1.5. NGAL līmenis serumā.....	13
2.1.6. NGAL līmenis urīnā	13
2.1.7. LRG1 līmenis serumā	13
2.1.8. LRG1 līmenis urīnā.....	14
2.1.9. Biomarkķieru līmeņu salīdzinājums serumā un urīnā.....	15
2.1.10. Biomarkķieru robežjutīgums un specifiskums.....	15
2.2. Rezultāti – mikrobiots un antibakteriālā jutība	16
Secinājumi	20
Priekšlikumi.....	21
Publikācijas un ziņojumi par promocijas darba tēmu	22

Saīsinājumi

AA	Akūts apendicīts
AkA	Akūts komplikēts apendicīts
AnA	Akūts nekomplcēts apendicīts
AUC	Laukums zem uztvērēja darbības raksturlīknes
CRP	C-reaktīvais proteīns
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ktr	Kontroles grupa
ESBL	Paplašināta spektra β -laktamāzes
EUCAST	Eiropas Antimikrobiālās jutības testēšanas komiteja
IL-6	Interleikīns-6
IQR	Starpkvartiļu intervāli
LRG1	Leicīnu saturošais alfa glikoproteīns 1
Mdn	Mediāna
MTN	Maksimālās ticamības novērtēšana
NGAL	Ar neitrofilu želatināzi saistītais lipokalīns
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ROC	Uztvērēja darbības raksturlīkne
S-IL-6	Interleikīns-6 serumā
S-LRG1	Leicīnu saturošais alfa glikoproteīns 1 serumā
S-NGAL	Ar neitrofilu želatināzi saistītais lipokalīns serumā
U-IL-6	Interleikīns-6 urīnā
U-LRG1	Leicīnu saturošais alfa glikoproteīns 1 urīnā
U-NGAL	Ar neitrofilu želatināzi saistītais lipokalīns urīnā
USG	Ultrasonogrāfija

Ievads

Mērķis

Novērtēt jaunus urīna un seruma biomarķierus, bakteriālo etioloģiju un antibakteriālo jutību akūta apendicīta (AA) agrīnai un precīzai diagnostikai, kā arī akūta nekomplicēta (AnA) un akūta komplicēta (AkA) apendicīta diferenciācijai pediatriem pacientiem.

Uzdevumi

Pētījuma mērķa sasniegšanai ir izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Noteikt iekaisuma biomarķieru (CRP), interleikīna-6 (IL-6), ar neitrofilu želatīnāzi saistītā lipokalīna (*NGAL*) un leicīnu saturošā alfa glikoproteīna 1 (*LRG1*) līmeni serumā pacientiem ar diagnozi AA.
2. Noteikt iekaisuma biomarķieru (CRP, IL-6, *NGAL* un *LRG1*) līmeni urīnā pacientiem ar diagnozi AA.
3. Noteikt *Yersinia enterocolitica* antivielu līmeni serumā pacientiem ar diagnozi AA.
4. Identificēt AnA un AkA ierosinātājus, novērtēt to antibakteriālo jutību.

Hipotēze

- Asins seruma biomarķieru *NGAL* un *LRG1* un urīna biomarķiera *LRG1* nozīme ir būtiska agrīnā AkA diagnostikā un AnA nošķiršanā no AkA bērniem vecumā no septiņiem līdz 18 gadiem.
- Apendiksa mikrobiots un ierosinātāju antibakteriālā jutība var veicināt akūta komplicēta un nekomplicēta apendicīta ārstēšanu pediatriem pacientiem.

Novitāte

Pētījums parāda, ka urīna biomarķierim *LRGI* ir svarīga diagnostiska un diferencējoša nozīme AA nekomplicētas un komplikētas formas gadījumā. Urīnu var iegūt neinvazīvi. *U-LRGI* noteikšanas metode nodrošina ātru rezultātu un dod iespēju izvērtēt turpmāko ārstēšanas taktiku.

Pētījumā ir pierādīta visbiežāk sastopamo AkA baktēriju antibakteriālā jutība, kas ļaus izstrādāt antibakteriālās terapijas algoritmu AnA un AkA gadījumos.

1. Materiāli un metodes

1.1. Pētījuma vide un pētījuma populācija

Pētījums tika organizēts kā prospektīvs, viena centra kontrolētu grupu pētījums, kurā tika iekļauti bērni vecumā no 7 līdz 18 gadiem, kas uzņemti Bērnu klīniskajā universitātes slimnīcā ar akūtām vēdersāpēm, ar pazīmēm un simptomiem, kas norāda uz apendicīta iespējamību. Visi pacienti tika izmeklēti, lai apstiprinātu vai izslēgtu šo diagnozi. Pirms iekļaušanas pētījumā tika veikta fiziskā stāvokļa izmeklēšana, pilna asinsaina, vēdera dobuma USG, un IL-6 seruma vērtību noteikšana.

Visas šajā pētījumā veiktās procedūras, kurās iesaistīti pacienti, tika veiktas saskaņā ar institucionālās un/vai valsts pētniecības komitejas ētikas normām, un pētījumi atbilst Pacientu datu aizsardzības likuma prasībām un Helsinku deklarācijas principiem. Ētikas komitejas apstiprinājumu saņēma gan Bērnu klīniskā universitātes slimnīca, gan Rīgas Stradiņa universitāte (atsauces numurs: SP-37/2018 un 21/27.04.2017.) laikposmā no 2017. gada janvāra līdz 2020. gadam, kurā tika veikts pētījums. Klīniskie dati, kas tika apkopoti pirms operācijas, ietvēra pacientu vecumu, dzimumu un pašreizējo slimības vēsturi.

Pētījumā tika iekļauti pacienti ar apstiprinātu AA un tika ārstēti, veicot apendektomiju – laparoskopiski vai ar laparotomiju. Netika iekļauti pacienti, kuriem bija aizdomas par apendicītu, bet kuriem bija iepriekš veikta vēdera dobuma operācija, grūtniecība un hroniskas saslimšanas, kas potenciāli varētu ietekmēt nieru, kuņģa-zarnu traktu vai elpošanas sistēmu (piemēram, zarnu iekaisuma slimības, hronisks pankreatīts, akūti nieru bojājumi un imūnsupresēti pacienti). Kontroles grupā (Ktr) bija pacienti, kuriem nebija aizdomu par iekaisuma procesu elpošanas, nieru vai kuņģa-zarnu traktā, bet kuri tika uzņemti neatliekamās palīdzības nodaļā, g.k. ar viegliem traumatiskiem bojājumiem.

Mikrobioloģiskās kultūras uztriepes no apendiksa un vēdera dobuma tika ņemtas intraoperatīvi. Atkarībā no intraoperatīvās un bakterioloģiskās atrades tika izveidotas divas pacientu grupas – AkA un AnA.

Pētnieki saņēma rakstisku piekrišanas veidlapu no aprūpētāja un pacienta piekrišanu, ja viņš bija 13 gadu vecs vai vecāks. Piekrišanas veidlapā pacientam un aprūpētājam tika sniegta informācija par pētījuma mērķi un bioloģiskā materiāla izpētes metodiku. Informēta piekrišana tika saņemta no katra pētījumā iesaistītā dalībnieka vecāka.

1.2. Statistiskā analīze

Statistikajai analīzei tika izmantots *Microsoft Excel* 2016 un (Microsoft, ASV) *IBM SPSS Statistics* 27 (IMB, ASV), un visus datus apstiprināja statistikas analītiķis, lai nodrošinātu precizitāti. Lai izteiktu kvantitatīvo datu rezultātus, tika izmantotas mediānas vērtības un starpkvartiļu intervāli (IQR). Salīdzinājumi starp grupām tika aprēķināti, izmantojot Manna–Vitnija U testu divām grupām un Kruskala–Volisa testu visām trim kvantitatīvo mainīgo grupām neparametriska sadalījuma gadījumā. Pīrsona hī kvadrāta un Fišera eksaktie testi tika piemēroti nominālajiem mainīgajiem, lai noteiktu sakarības starp tiem.

Pētījumā par AA diagnostikas biomarķieriem tika izveidota uztvērēja darbības raksturlīkne (ROC), attēlojot viltus pozitīvo daļu pret patieso pozitīvo daļu katram iespējamam robežvērtības rādītājam, un tika aprēķināts laukums zem ROC līknes (AUC), kas noteica biomarķieru klīnisko nozīmi, kā arī to diagnostisko vērtību attiecībā uz apendicītu.

Bināra loģistiskā regresija ir piemērota statistikas metode, ja atkarīgais mainīgais ir binārs. Tas atspoguļo divas interešu grupas ar vērtībām 0 un 1, piemēram, jā/nē, esamība/neesamība vai veiksmē/neveiksmē. Koeficientu novērtēšanas procedūra ir maksimālās ticamības procedūra, un tās mērķis ir atrast labāko neatkarīgo mainīgo lineāro kombināciju, lai maksimizētu

novērojamo iznākuma frekvenču iegūšanas varbūtību. Biomarkieru prognozējošās vērtības tika novērtētas, izmantojot uztvērēja darbības raksturlielumu līkni (ROC) un bināros statistiskās regresijas modeļus. Tika analizēti divi dažādi modeļi – AA pret Ktr un AkA pret AnA. P vērtība $< 0,05$ bija saistīta ar statistisko nozīmīgumu.

2. Rezultāti

2.1. Rezultāti – biomarķieri

2.1.1. Pacientu demogrāfiskie rādītāji

Paraugi tika ņemti no 153 pacientiem, kas atbilda šim pētījumam. Apendicīts tika diagnosticēts 97 pacientiem (63,4 %) (AnA vai AkA), bet 56 (36,6 %) nebija aizdomu par infekcijas vai iekaisuma patoloģiju (Ktr). Dalībnieku vecums svārstījās no septiņiem līdz 18 gadiem, ar mediānu 13 (IQR 10,0–15,0) gadu (AnA), 12 (IQR 9,0–14,0) gadu (AkA) un 13,5 (IQR 10,3–15,0) gadi (Ktr). No tiem 89 pacienti (58,2 %) bija zēni un 64 (41,8 %) meitenes.

Aizdomas par apendicītu, kas prasīja steidzamu diagnostisko laparoskopiju, bija 85 (87,6 %) pacientiem, un laparotomiju – 12 (12,4 %) gadījumos (četri AnA pacienti un astoņi AkA pacienti). Intraoperatīvi tika ņemtas brīvā peritoneālā šķidruma uztriepes. Pacienti ar pozitīvu kultūru no vēdera dobuma paraugiem tika klasificēti akūta komplicēta apendicīta (AkA) grupā – 52 pacienti (53,6 %), bet pacienti ar negatīvu kultūru tika klasificēti akūta nekomplicēta apendicīta (AnA) grupā – 45 pacienti (46,4 %).

Deviņiem AnA (22,5 %) un 31 AkA (77,5 %) pacientam bija nepieciešama drenāžas ievietošana. Vairāk nekā pusei pacientu (60,8 %), kuriem tika ievietota drenāža, diagnosticēja AkA ($p < 0,001$). Vienkāršs salīdzinājums liecina, ka AkA pacientiem bija nedaudz ilgāka vidējā pēcoperācijas uzturēšanās slimnīcā – sešas dienas salīdzinājumā ar piecām dienām AnA.

2.1.2. Pirmsoperācijas un pēcoperācijas biomarķieru līmeņi

IL-6, *NGAL* un *LRG1* pamatvērtības pirms operācijas ir sniegtas 2.1. tabulā, kā arī vērtības otrajā un piektajā pēcoperācijas dienā. Viszemākais visu novēroto parametru sākotnējais līmenis uzsākot pētījumu jeb 0. dienā tika konstatēts kontroles grupā bez infekcijas slimības, savukārt visaugstākais bija

novērots AkA grupā. Biomarkieru *S-IL-6* un *S-NGAL* līmeņa krasu samazināšanos varēja novērot no 0. dienas līdz 5. dienai, jo iekaisums pēcoperācijas laikā nostabilizējās; dati ir sniegti 2.1. tabulā.

2.1. tabula

Pirmsoperācijas un pēcoperācijas biomarkieru līmeņi

Biomarkieri		AnA, ng vai pg vai µg/ml (IQR)	AkA, ng vai pg vai µg/ml (IQR)	Ktr, ng vai pg vai µg/ml (IQR)	p vērtība
0. diena					
Serums	IL-6	22,57 (11,15–42,21)	70,59 (25,06–300,92)	6,44 (2,49–12,49)	< 0,001
	NGAL	128,20 (81,44–184,50)	169,90 (104,95–258,15)	90,37 (73,46–137,38)	< 0,001
	LRG1	70,56 (62,64–83,43)	88,12 (71,12–106,13)	34,08 (27,50–42,37)	< 0,001
Urīns	IL-6	2,37 (0,55–27,93)	11,22 (2,82–29,10)	6,84 (1,37–38,98)	0,227
	NGAL	2,93 (1,41–8,57)	3,34 (1,10–10,45)	3,25 (1,41–10,73)	0,889
	LRG1	0,10 (0,03–0,73)	0,35 (0,05–1,38)	0,04 (0,02–0,10)	< 0,001
2. diena					
Serums	IL-6	7,48 (2,81–23,44)	13,55 (6,84–33,73)	–	0,131
	NGAL	73,67 (58,04–92,41)	107,10 (71,04–167,20)	–	0,001
	LRG1	74,99 (61,00–96,03)	87,90 (70,32–104,10)	–	0,048
Urīns	IL-6	4,42 (1,15–16,97)	6,89 (2,04–21,71)	–	0,439
	NGAL	2,66 (1,34–12,18)	2,65 (0,81–9,87)	–	0,633
	LRG1	0,08 (0,03–0,28)	0,21 (0,06–0,98)	–	0,017

2.1. tabulas turpinājums

Biomarķieri		AnA, ng vai pg vai µg/ml (IQR)	AkA, ng vai pg vai µg/ml (IQR)	Ktr, ng vai pg vai µg/ml (IQR)	p vērtība
5. diena					
Serums	IL-6	4,45 (2,40–10,70)	5,07 (1,72–12,48)	–	0,838
	NGAL	69,80 (60,20–89,99)	85,25 (64,20–105,50)	–	0,220
	LRG1	66,73 (56,98–85,28)	80,97 (62,14–99,03)	–	0,110
Urīns	IL-6	2,44 (0,65–8,56)	2,18 (0,00–10,82)	–	0,900
	NGAL	4,89 (1,26–13,50)	2,39 (1,17–5,46)	–	0,281
	LRG1	0,04 (0,02–0,27)	0,10 (0,03–0,25)	–	0,102

Biomarķieru līmeņi izteikti kā mediānas, IQR (25 %, 75 %), *IL-6* mērīts pg/ml, *NGAL* – ng/ml un *LRG1* – µg/ml, AkA – akūts komplikēts apendicīts, AnA – akūts nekomplicēts apendicīts, Ktr – kontrole, *IL-6* – interleikīns-6, *NGAL* – ar neitrofilu želatīnāzi saistītais lipokalīns, *LRG1* – leicīnu saturošs alfa-2 glikoproteīns 1. #Grupā neveica vēdera operāciju; tādējādi šajā pētījumā iekļauti tikai 0. dienas biomarķieri.

2.1.3. IL-6 līmenis serumā

Mediāna *S-IL-6* 0. dienas serumā AnA, AkA un kontroles grupā bija attiecīgi 22,57 pg/ml, 70,59 pg/ml un 6,44 pg/ml. *S-IL-6* sadalījums 0. dienā bija statistiski lielāks (Kruskala–Volisa tests, T stat = 63,32, $p < 0,001$) AkA salīdzinājumā ar kontroles grupu (pāru salīdzinājums, $p < 0,001$), kā arī *S-IL-6* sadalījums bija statistiski lielāks AkA salīdzinājumā ar AnA (pāru salīdzinājums, $p = 0,007$) un AnA salīdzinājumā ar kontroles grupu (pāru salīdzinājums, $p < 0,001$). Iekaisumam pēcoperācijas periodā stabilizējoties, no 0. līdz 5. dienai varēja novērot biomarķieru līmeņa samazināšanos.

2.1.4. IL-6 līmenis urīnā

U-IL-6 paraugi bija nepārliecinoši, tāpēc tie nebija pietiekami specifiski, lai nošķirtu AkA no AnA vai AA no kontroles grupas.

2.1.5. *NGAL* līmenis serumā

Mediāna *S-NGAL* 0. dienas serumā AnA, AkA un Ktr bija attiecīgi 128,20 ng/ml, 169,90 ng/ml un 90,37 ng/ml. *S-NGAL* sadalījums 0. dienā ievērojami atšķīrās (Kruskala–Volisa testi, T stat = 19,04, $p < 0,001$) AkA grupā salīdzinājumā ar Ktr (pāru salīdzinājums, $p < 0,001$). AnA *S-NGAL* vērtības bija augstākas nekā Ktr (pāru salīdzinājums, $p = 0,087$). Tādējādi *S-NGAL* vērtības AkA bija visaugstākās. *S-NGAL* līmenis otrajā pēcooperācijas dienā samazinājās līdz 107,1 ng/ml AkA un 73,67 ng/ml AnA ($p = 0,001$). *S-NGAL* līmenis piektajā pēcooperācijas dienā samazinājās līdz 85,25 ng/ml AkA un 69,8 ng/ml AnA ($p = 0,220$).

2.1.6. *NGAL* līmenis urīnā

U-NGAL paraugi bija nepārliciecināmi un tādēļ nebija pietiekami specifiski, lai nošķirtu AkA no AnA vai AA no kontroles grupas.

2.1.7. *LRGI* līmenis serumā

S-LRGI vidējais līmenis serumā 0. dienā AnA, AkA un Ktr bija attiecīgi 70,56 µg/ml, 88,12 µg/ml un 34,08 µg/ml. Seruma *LRGI* sadalījums 0. dienā ievērojami atšķīrās (Kruskala–Volisa testi, T stat = 88,30, $p < 0,001$) AkA salīdzinājumā ar Ktr (pāru salīdzinājums, $p < 0,001$); tāpat *S-LRGI* sadalījums ievērojami atšķīrās AnA salīdzinājumā ar Ktr (pāru salīdzinājums, $p < 0,001$). AkA *LRGI* vērtības bija augstākas nekā AnA (pāru salīdzinājums, $p = 0,074$). *S-LRGI* līmenis piektajā pēcooperācijas dienā samazinājās līdz 80,97 µg/ml un 66,73 µg/ml, attiecīgi AkA un AnA ($p = 0,110$), kas arī bija ievērojami zemāks nekā līmenis, uzņemot neatliekamās medicīniskās palīdzības nodaļā ($p < 0,001$).

Papildus novērtējot *S-LRGI* koncentrācijas un slimības pakāpes atkarību AA pacientiem, atklājās, ka apendicīta gļotādas iekaisums būtiski korelē ar palielinātu *S-LRGI*. Tika konstatēta nozīmīga atšķirība starp kontroli un AkA un/vai AnA ($p < 0,001$, $p < 0,001$), kā arī slimības smaguma pakāpe ($p = 0,001$), salīdzinot tikai AkA pret AnA.

2.1.8. *LRGI* līmenis urīnā

LRGI 0. dienas līmeņa biomarķiera urīna paraugs bija pārliecinošs, tādējādi norādot uz būtisku atšķirību starp AkA un Ktr, kā arī starp AnA un Ktr. 0. dienas vērtības ir 0,35 $\mu\text{g/ml}$ (AkA), 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (AnA) un 0,04 $\mu\text{g/ml}$ (Ktr). Tika konstatēta būtiska atšķirība starp Ktr un visu AA grupu ($p < 0,001$, $p = 0,005$).

U-LRGI līmenis urīnā piektajā pēcoperācijas dienā samazinājās līdz 0,10 $\mu\text{g/ml}$ AkA un 0,04 $\mu\text{g/ml}$ AnA ($p = 0,102$). *LRGI* līmenis urīnā bija ievērojami augstāks, kad pacients tika uzņemts neatliekamās medicīniskās palīdzības nodaļā, nekā piektajā pēcoperācijas dienā ($p < 0,001$).

Turpmāk izvērtējot, vai *U-LRGI* līmenis ir saistīts ar slimības aktivitāti pacientiem ar AA, atklājās, ka apendiksa gļotādas iekaisums būtiski korelē ar paaugstinātu *U-LRGI* līmeni ($p = 0,001$). Tika konstatēta nozīmīga atšķirība starp kontroli salīdzinājumā ar AkA un AnA ($p < 0,001$, $p = 0,005$), tomēr slimības smaguma pakāpi (AkA salīdzinājumā ar AnA) nebija iespējams diferencēt ($p = 0,089$).

U-LRGI līmenis piektajā pēcoperācijas dienā samazinājās līdz 0,10 $\mu\text{g/ml}$ AkA un 0,04 $\mu\text{g/ml}$ AnA ($p = 0,102$). *U-LRGI* līmenis bija ievērojami augstāks, kad pacients tika uzņemts neatliekamās medicīniskās palīdzības nodaļā, nekā piektajā pēcoperācijas dienā ($p < 0,001$).

2.1.9. Biomarkieru līmeņu salīdzinājums serumā un urīnā

Visu trīs biomarkieru urīna paraugi kopā bija nepārliciecināmi, un tādējādi tie nebija pietiekami specifiski, lai nošķirtu AkA un AnA. Salīdzinot AkA un AnA, varēja novērot būtisku atšķirību starp bāzes (0. diena) *S-IL-6*, *S-NGAL* un *S-LRGI* individuāli ($p < 0,001$, $p = 0,033$ un $p = 0,001$).

2.1.10. Biomarkieru robežjutīgums un specifiskums

S-IL-6 robežvērtība pacientiem ar AA bija 20,25 pg/ml; *S-NGAL* robežvērtība bija 103,75 ng/ml, un *S-LRGI* robežvērtība bija 51,69 µg/ml ($p < 0,001$).

ROC līknes uzrādīja attiecīgi AUC 0,856 (95 % CI 0,798–0,915), AUC 0,689 (95 % CI 0,604–0,773) un AUC 0,945 (95 % CI 0,905–0,985). ROC līkne *U-LRGI* uzrādīja AUC 0,703 (95 % CI 0,619–0,787) un CRP AUC 0,851 (95 % CI 0,790–0,931). *IL-6* jutīgums attiecībā uz apendicītu bija 71,9 % un specifiskums 91,1 %, savukārt *S-LRGI* uzrādīja lielāku jutīgumu un specifiskumu, attiecīgi 93,8 % un 91,1 %.

Bināra statistiskā regresija liecina, ka no uzņemšanas brīdī noteiktajiem biomarkieriem *IL-6* un *LRGI* bija nozīmīgi saistīti ar apendicīta diagnostiku. Binārās loģistikās regresijas modelis tika novērtēts, izmantojot maksimālās ticamības novērtēšanas (MTN) procedūru. Kopējais 1. modelis bija statistiski nozīmīgs: modelis $X^2(3, 153) = 126,446$ ar p vērtību $< 0,001$. Lai novērtētu modeļa piemērotību, tika izmantots Hosmera–Lemešova tests. Iegūtā testa statistika nebija statistiski nozīmīga ($X^2 = 5,518$, $p = 0,701$), tāpēc nulles hipotēze (H_0 : starp novērotajām un modeļa prognozētajām apendicīta vērtībām nav atšķirības) tika noraidīta. Tas nozīmēja, ka modelis labi atbilst datiem statistiski pieņemamā līmenī. Līdz ar to modelis spēja pareizi paredzēt 92,8 % to, kurā gadījumā ir apendicīts (1), un 89,3 % to, kurā nav apendicīta (0). Kopumā 91,5 % no visiem gadījumiem (0,1) diagnoze tika pareizi prognozēta.

Lai novērtētu modeļa lietderību, tika izmantota cita testa statistika – Nagelkerkes R^2 , kas norāda, cik lietderīgi skaidrojošie mainīgie bija atbildes mainīgā prognozēšanā. Nagelkerkes R^2 , kas svārstās no 0 līdz 1, bija 0,769, norādot, ka modelis bija noderīgs apendicīta prognozēšanā. Lai pārbaudītu katra koeficienta (B) statistisko nozīmīgumu modelī, p vērtību aprēķina pēc *Wald* testa.

Kopumā arī 2. modelis bija statistiski nozīmīgs: 2. modelis $(3,97) = 17,070$ ar p vērtību 0,001. Hosmera–Lemešova testa statistika nebija statistiski nozīmīga ($X^2 = 14,696$, $p = 0,065$), kas nozīmēja, ka modelis labi atbilst datiem statistiski pieņemamā līmenī. Līdz ar to modelis spēja pareizi prognozēt 65,4 %, kurā gadījumā ir komplikēts apendicīts (1), un 77,8 %, kurā ir nekomplēts apendicīts (0). Kopumā 71,1 % no visiem gadījumiem (0,1) tika pareizi prognozēti. Nagelkerkes R^2 bija 0,216, kas norāda, ka modelis bija noderīgs komplikēta apendicīta prognozēšanai.

IL-6, *LRG1*, *NGAL* serumā kombinētais diagnostikas modelis tika izveidots ar binārās loģistikās regresijas analīzi. ROC līkne parādīja, ka 1. kombinētais diagnostikas modelis (AA vs Ktr) sasniedza 92,8 % jutīgumu, 89,3 % specifiskumu un laukumu zem līknes 0,96 (95 % CI 0,93–0,99, $p < 0,001$). ROC līkne parādīja, ka kombinētais 2. diagnostikas modelis (AkA pret AnA) sasniedza 67,3 % jutīgumu, 77,8 % specifiskumu un laukumu zem līknes 0,74 (95 % CI 0,63–0,84, $p < 0,001$).

2.2. Rezultāti – mikrobiota un antibakteriālā jutība

Escherichia coli bija dominējošais apendicīta intraluminālās mikrobiotas pārstāvis gan komplikētos, gan nekomplētos gadījumos, kopumā 79 pacientiem (81,4 %). *Pseudomonas aeruginosa* bija dominējošais mikroorganisms ārpuslumena apendiksa mikrobiotā (AkA/AnA: 15/5). Starp pacientiem ar akūtu komplētu un akūtu nekomplētu apendicītu bija zināmas atšķirības apendiksa

proksimālās un distālās daļās mikrobiotā. AkA grupā 35 gadījumos (55 %) mikrobiots bija identisks, bet pārējos 17 gadījumos (35 %) mikrobiota atšķīrās distālajā un proksimālajā daļā. AnA grupā 24 (53 %) gadījumos mikrobiota bija identiska, bet 21 gadījumā (47 %) tā atšķīrās.

Pirms operācijas noteiktās antivielas pret *Yersinia enterocolitica* visos gadījumos bija negatīvas.

Baktēriju kultivēšanas rezultāti bija pozitīvi apendiksu intraluminālajos paraugos ar viena vai vairāku baktēriju izolātu augšanu. Visbiežāk sastopamo izolātu gadījumu skaits pēc AkA un AnA iedalījuma norādīts 2.2. tabulā. Nereti kultūrā tika konstatēti jauktie celmi. No apendiksa visbiežāk izolētās baktērijas bija *E. coli* 79 paraugos, kam sekoja *P. aeruginosa* 20 paraugos, *Klebsiella pneumoniae* 6 paraugos, *Bacterioides fragilis* 5 paraugos un *Citrobacter braakii* 5 paraugos.

2.2. tabula

Izolēto baktēriju veidi, biežums un procentuālais īpatsvars akūtā komplikētā un akūta nekomplīcētā apendicīta gadījumā

Indikators	AkA		AnA		Izolātu kopskaits, Nr.	p vērtība
	Nē	%	Nē	%		
<i>Escherichia coli</i>	43	54,4	36	45,6	79	0,424 [#]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	75	5	25	20	0,024 [#]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	33,3	4	66,7	6	0,417 [#]
<i>Citrobacter braakii</i>	0	0	3	100	3	0,102 [*]
<i>Bacterioides fragilis</i>	2	40	3	60	5	0,665 [*]
<i>Kocuria kristinea</i>	1	50	1	50	2	> 0,999 [*]
Citi gadījumi	40	64,5	22	35,5	62	0,001 [#]
Kopā	103	–	74	–	177	–

AkA – akūts komplīcēts apendicīts; AnA – akūts nekomplīcēts apendicīts; citi gadījumi – citi vai/un jaukti no citiem; # – Pīrsona hī kvadrāta tests; * – Fišera eksaktais tests.

79 paraugiem, kuros tika izolēta *E. coli*, bija dažāda antibakteriālā uzņēmība, piemēram, pieci celmi (8,5 %) bija rezistenti pret ceftazidīmu; 32 (54,2 %) pret ampilīnu; seši (10,2 %) pret cefotaksīmu; seši (10,2 %) pret

imipenēmu; astoņi (13,6 %) pret ciprofloksacīnu; seši (10,2 %) pret hloramfenikolu; divi (3,4 %) pret ertapenēmu; 18 (30,5 %) pret amoksicilīnu/klavulānskābi; viens (1,7 %) pret piperacilīnu-tazobaktāmu un viens (1,7 %) pret gentamicīnu. Visi celmi bija jutīgi pret meropenēmu un amikacīnu. Turklāt tika izolēti arī pieci paplašināta spektra β-laktamāzes (ESBL) producējoši *E. coli* celmi.

P. aeruginosa, otrais visbiežāk sastopamais ierosinātājs, uzrādīja augstu izplatību akūta complicēta apendicīta gadījumos. Veicot uzņēmības testus pret ceftazidīmu, tika konstatēta laba reakcija – tikai 26,3 % izolātu bija rezistenti. Rezistence pret ampicilīnu tika konstatēta 78,9 % izolātu, pret cefotaksīmu – 63,2 %, pret imipenēmu – 36,8 %, pret hloramfenikolu – 52,6 %, pret ciprofloksacīnu un piperacilīnu/tazobaktāmu – 10,5 %, pret ertapenēmu – 63,2 % un pret amoksicilīnu/klavulānskābi – 84,2 %. Visi testētie celmi bija jutīgi pret meropenēmu, amikacīnu un gentamicīnu. Citu šajā pētījumā izolēto baktēriju antibakteriālā uzņēmība ir parādīta 2.3. tabulā. *Citrobacter* spp. bija rezistentas pret visām antibiotikām, izņemot amoksicilīnu/klavulānskābi, savukārt *Klebsiella* spp. bija rezistentas pret cefotaksīmu, amikacīnu, gentamicīnu, kā arī pret hloramfenikolu.

2.3. tabula

Izolēto patogēnu antibakteriālā rezistence un jutība

Indikators	<i>E. coli</i> n, %		<i>P. aeruginosa</i> n, %		<i>Klebsiella</i> n, %		<i>Citrobacter</i> n, %	
	R	S	R	S	R	S	R	S
CAZ	5	54	5	14	1	8	–	5
	8,5	91,5	26,3	73,7	11,1	88,9	–	100
AMP	32	27	15	4	7	2	–	5
	54,2	45,8	78,9	21,1	77,8	22,2	–	100
CTX	6	53	12	7	–	9	–	5
	10,2	89,8	63,2	36,8	–	100	–	100
MRP	–	59	–	19	1	8	–	5
	–	100	–	100	11,1	88,9	–	100

2.3. tabulas turpinājums

Indikators	<i>E. coli</i> n, %		<i>P. aeruginosa</i> n, %		<i>Klebsiella</i> n, %		<i>Citrobacter</i> n, %	
	R	S	R	S	R	S	R	S
IMI	6	53	7	12	1	8	–	5
	10,2	89,8	36,8	63,2	11,1	88,9	–	100
AK	–	59	–	19	–	9	–	5
	–	100	–	100	–	100	–	100
CN	1	58	–	19	–	9	–	5
	1,7	98,3	–	100	–	100	–	100
CIP	8	51	2	17	1	8	–	5
	13,6	86,4	10,5	89,5	11,1	88,9	–	100
C	6	53	10	9	–	9	–	5
	10,2	89,8	52,6	47,4	–	100	–	100
ETP	2	57	12	7	1	8	–	5
	3,4	96,6	63,2	36,8	11,1	88,9	–	100
AUG	18	41	16	3	2	7	5	–
	30,5	69,5	84,2	15,8	22,2	77,8	100	–
TZP	1	58	2	17	1	8	–	5
	1,7	98,3	10,5	89,5	11,1	88,9	–	100

Saīsinājumi: CAZ – ceftazidīms, AMP – ampicilīns, CTX – cefotaksīms, MRP – meropenēms, IMI – imipenēms, AK – amikacīns, CN – gentamicīns, CIP – ciprofloksacīns, C – hloramfenikols, ETP – ertapenēms, AUG – amoksicilīns/klavulānskābe, TZP – piperacilīns/tazobaktāms.

Secinājumi

1. Biomarkieris LRG1 urīnā ir precīzs marķieris AA diagnozes apstiprināšanai. Jaunums ir tā noteikšana urīna paraugā, jo tas ir neinvazīvs un ātrs izmeklējums. LRG1 koncentrācija serumā un urīnā ir noderīga AA smaguma pakāpes noteikšanai attiecībā pret AkA un AnA.
2. Biomarkieris NGAL serumā ievērojami palielinās pie stacionēšanas neatliekamās palīdzības nodaļā (0. dienā), un tas jāizmanto akūtu vēdera sāpju diferenciāldiagnostikā.
3. CRP un IL-6 serumā ir nespecifiski biomarkieri, un tos var izmantot AA diagnosticēšanai un AkA un AnA diferencēšanai.
4. *P. aeruginosa* biežāk tiek konstatēta akūta komplikēta apendicīta gadījumā, un tā ir jutīga pret cefalosporīnu grupas līdzekļiem, piemēram, ceftazidīmu; *P. aeruginosa* ir fenotipiski rezistenta pret cefotaksīmu, tādēļ cefotaksīms jāizslēdz no akūta komplikēta apendicīta empīriskās ārstēšanas algoritma.
5. Pētījumā iekļautajos akūtā apendicīta gadījumos ESBL producējošo mikroorganismu sastopamība bija zema.
6. Antivielas pret *Yersinia enterocolitica* AA pacientu serumā netika konstatētas, tādēļ tās nevar izmantot kā AA prognostisku kritēriju.

Priekšlikumi

Ņemot vērā iegūtos rezultātus, būtu ieteicams izmantot *LRGI* (*S-LRGI* un *U-LRGI*) un *NGAL* (*S-NGAL*) seruma un urīna biomarķierus ikdienas klīniskajā praksē akūta apendicīta diagnostikā un komplikētu un nekomplcētu gadījumu diferenciacijā.

Atbilstoši iegūtajiem antibakteriālās jutības rezultātiem, kas tika noteikti izolētajiem mikroorganismiem, būtu vēlams pilnveidot antibakteriālās terapijas vadlīnijas pediatrijas pacientiem akūta apendicīta ārstēšanā, tai skaitā Bērnu klīniskajā universitātes slimnīcā Latvijā.

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas:

1. Kakar, M., Delorme, M., Broks, R., Asare, L., Butnere, M., Reinis, A., Engelis, A., Kroica, J., Saxena, A. & Petersons, A. 2020. Determining acute complicated and uncomplicated appendicitis using serum and urine biomarkers: interleukin-6 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Pediatric surgery international*, 36(5), 629–636. <https://doi.org/10.1007/s00383-020-04650-y>
2. Kakar, M., Berezovska, M. M., Broks, R., Asare, L., Delorme, M., Crouzen, E., Zviedre, A., Reinis, A., Engelis, A., Kroica, J., Saxena, A., Petersons, A. 2021. Serum and Urine Biomarker Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein 1 Differentiates Pediatric Acute Complicated and Uncomplicated Appendicitis. *Diagnostics* 2021, 11, 860. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050860>
3. Kakar, M., Reinis, A., Kroiča, J., Engēlis, A., Broks, R., Asare, L., Vermeulen, M., Senica, S. O., Saxena, A. & Pētersons, A. 2022. Microbiota Assessment of Pediatric Simple and Complex Acute Appendicitis. *Medicina* (Kaunas, Lithuania), 58(9), 1144. [1144]. <https://doi.org/10.3390/medicina58091144>
4. Kroiča, J., Reinis, A., Kakar, M., Delorme, M., Broks, R., Asare, L., Berezovska, M., Janšins, V., Zviedre, A., Engēlis, A., Saxena, A. & Pētersons, A. 2020. Culture Based Evaluation of Microbiota in Children with Acute Appendicitis. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 74(2), 100–105. <https://doi.org/10.2478/prolas-2020-0016>

Patenti, kas reģistrēti Latvijas Patentu valdē:

1. Kakar, M., Reinis, A., Broks, R., Engēlis, A., Kroiča, J., Pētersons, A., Asare, L. 2022. Gangrenoza apendicīta attīstības riska noteikšanas paņēmieni bērniem (Patents Nr. 15613). Latvijas Republikas Patentu valde. <http://databases.lrpv.gov.lv/databases/lv/patent/details/lvp2021000038/>

Ziņojumi starptautiskos kongresos un konferencēs:

1. Complex clinical, biological and microbiological analysis of acute complicated and acute uncomplicated appendicitis in children. 2018. The 15th conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons. Riga, Latvia, May 10–12, 2018, 59.
2. Determining Acute Complicated and Uncomplicated Appendicitis Using Serum and Urine Biomarkers: Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL), Leucine-rich Alpha-2 Glycoprotein 1 (LRG-1) and Interleukin6 (IL-6). 2019. The 6th World Congress of the World Federation of Associations of Pediatric Surgery (WOFAPS 2019). Abstracts. – Doha, Qatar, November, 1–3, 2019.

3. Determining acute complicated and uncomplicated appendicitis using serum and urine biomarkers: interleukin-6 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin. 2020. 33rd International Symposium on Pediatric Surgical Research. Abstracts.-Frankfurt (Main), Germany, November, 27–29, 2020.
4. Evaluation of appendical microbiota in children with acute complicated and un complicated appendicitis. 31. 2020. Abstract from IX Latvian Gastroenterology Congress, Riga, Latvia. https://www.gastroenterologs.lv/content_graphics/user_file/pdf/Gastroenterologu_kongress_Abstacts_ENG_WEB.pdf
5. Biomarkers Leucine Rich Alpha-2 Glycoprotein 1, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocal and Interleukin-6 Diagnose Pediatric Acute Appendicitis. 2021. Poster session presented at 22nd Annual Congress of the European Paediatric Surgeons' Association (EUPSA), Athens, Greece.
6. Diagnostic Accuracy Of Multiple Biomarkers In Predicting The Severity Of Acute Pediatric Appendicitis In The Emergency Department. 2022. 23rd European Paediatric Surgeons' Association (EUPSA 2022) Congress. Abstract. Tel Aviv, Israel, June, July, 29–2.
7. Role of multiple biomarkers in predicting the diagnosis and severity of acute appendicitis in children. 214. 2022. Abstract from 7th World Congress of the World Federation of Associations of Pediatric Surgeons (WOFAPS), Prague, Czech Republic. <https://guarant.eu/wofaps2022/login/files/wofaps-2022-book-of-abstracts.pdf>
8. Microbiota diversity affects acute appendicitis severity in children. 2023. 16th Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons. Abstract. Kaunas, Vilnius, September 14–16.
9. Predictive diagnostic biomarkers determine the severity of acute pediatric appendicitis: single center cohort study. 2023. 16th Conference of the Baltic Association of Paediatric Surgeons. Abstract. Kaunas, Vilnius, September 14–16.
10. Diagnostic precision of multiple biomarkers in predicting the outcome of acute appendicitis in pediatric patients. 2023. 36th International symposium on pediatric surgical research. Abstract. Milan, Italy, October 6-8.
11. Relationship of identified microbiota in severity of acute appendicitis in children. 2023. 36th International symposium on pediatric surgical research. Abstract. Milan, Italy, October 6-8.