

**VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA**

**MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS**

**VAIKŲ DIARĖJOS DIAGNOSTIKOJE TAIKOMŲ TRADICINIŲ IR  
MOLEKULINIŲ METODŲ PALYGINIMAS**

Comparison Of Conventional and Molecular Methods In Pediatric Diarrhea Diagnostics

Magistrantė:  
MONIKA MIŠKINYTĖ \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovė:  
Dr. (HP) AUDRONĖ EIDUKAITĖ \_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja  
prof., hab.dr. Z. A. KUČINSKIENĖ  
leidžiama ginti: \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2016 m., Vilnius

# TURINYS

<b>ĮVADAS</b> .....	<b>4</b>
<b>SANTRUMPOS</b> .....	<b>5</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1. Diarėja – viena aktualiausių vaikų sveikatos problemų pasaulyje</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2. Dažniausi gastroenterito sukėlėjai</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Adenovirusai .....	7
1.2.2 Kampilobakterijos .....	7
1.2.3 Klostridijos .....	8
1.2.4 Kriptosporidijos.....	9
1.2.5 Dizenterinė ameba.....	9
1.2.6 Escherichia coli O:157 .....	9
1.2.7 Enterotoksigeninė <i>E. coli</i> (ETEC).....	10
1.2.8 Giardijos .....	10
1.2.9 Norovirusai .....	10
1.2.10 Rotavirusai.....	11
1.2.11 Salmonelės.....	11
1.2.12 Šiga toksiną produkuojanti <i>E. coli</i> .....	12
1.2.13 Šigelės .....	12
1.2.14 Choleros vibrionas.....	12
1.2.15 Jersinijos .....	12
<b>1.3 Klinikinėje praktikoje naudojami gastroenteritų sukėlėjų identifikavimo metodai</b> .....	<b>13</b>
1.3.1 Mikrobiologinio išmatų pasėlio metodas .....	14
1.3.2 Išmatų mikroskopijos metodas.....	15
1.3.3 Imunochromatografijos metodas .....	15
<b>1.4. Luminex xTAG GPP</b> .....	<b>15</b>
1.4.1 Metodo technologija.....	16
<b>2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1. Tiriamoji medžiaga</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2. Metodika</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3. Kompiuterinės programos ir statistinės duomenų analizės metodai</b> .....	<b>20</b>

<b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Molekuliniu dauginės patogenų detekcijos metodu nustatytų patogenų pasiskirstymas</b>	
<b>22</b>	
<b>3.2. MDPD metodu nustatytų patogenų pasiskirstymas gupėse.....</b>	<b>23</b>
3.2.1 Virusai .....	23
3.2.2 Bakterijos.....	25
3.2.3 Parazitiniai pirmuonys.....	27
<b>3.3. Mišrios infekcijos nustatymo dažnis MDPD .....</b>	<b>28</b>
<b>4. IŠVADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5. SUMMARY .....</b>	<b>31</b>
<b>6. LITERATŪROS SĄRAŠAS .....</b>	<b>33</b>
<b>7. PRIEDAI .....</b>	<b>37</b>
<b>7.1. Luminex xTAG GPP mokymų sertifikatas .....</b>	<b>37</b>

## IVADAS

Nepaisant nuolat gerėjančių higienos ir mikrobiologinės maisto bei vandens taršos kontrolės, infekciniai gastroenteritai išlieka viena aktualiausių asmens sveikatos problemų, kasmet sutrikdanti apytiksliai 1,7 milijardo gyventojų sveikatą [46]. Diarėja, kaip simptomas gali pasireikšti daugelio ligų atveju, tačiau dažniausia diarėjos priežastis – ūminis infekcinis gastroenteritas, kurį gali sukelti platus sukėlėjų spektras, tarp kurių – parazitiniai pirmuonys, virusai ir bakterijos. Klinikiniai ūmaus gastroenterito simptomai gali svyruoti nuo itin lengvų, iki gyvybiškai pavojingų. Vaikai iki 5 metų dėl dar nesusiformavusio imuninio atsako esti ypatinga rizikos grupė sunkios klinikinės eigos gastroenteritams. Būtent dėl šios priežasties diarėjos išlieka viena dažniausių vaikų iki 5 metų mirties priežasčių pasaulyje. Tikslesnė, jautresnė ir greitesnė ūminio infekcinio gastroenterito sukėlėjo laboratorinė diagnostika gali lemti greitesnį tikslingo gydymo paskyrimą.

**Darbo tikslas:** Palyginti tradicinius laboratorinius infekcinių diarėjų tyrimo metodus su nauju, molekulinio dauginės patogenų detekcijos metodu.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Molekulinio dauginės patogenų detekcijos metodu nustatyti klasikiais metodais neidentifikuotų infekcinių diarėjų sukėlėjus.
2. Įvertinti nustatytų infekcinių gastroenterito sukėlėjų dažnį ir pasiskirstymą.
3. Įvertinti Luminex xTAG GPP panelės taikymo rutininėje laboratorinėje diagnostikoje privalumus.

## SANTRUMPOS

DNR – Deoksiribonukleorūgštis

ETEC – Enterotoksigeninė Ešerichija coli

EUCAST - Europos jautrumo antibakteriniams preparatams nustatymo komitetas (*angl. European committee on Antimicrobial Susceptibility testing*)

LDS – laboratorinės diagnostikos skyrius

LT – karščiui labilus toksinas

MDPD – Molekulinė Dauginė Patogenų Detekcija

NVSPL – Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija

PGR – Polimerazės grandininė reakcija

PSO – Pasaulio Sveikatos Organizacija

RNR – Ribonukleorūgštis

SLT – į Šiga panašus toksinas (*angl. Shiga-like toxin*)

ST – karščiui stabilus toksinas

STEC – Šiga toksiną produkuojanti Ešerichija coli (*angl. Shiga toxin producing E. coli*)

ULAC – Užkrečiamų ligų ir AIDS centras

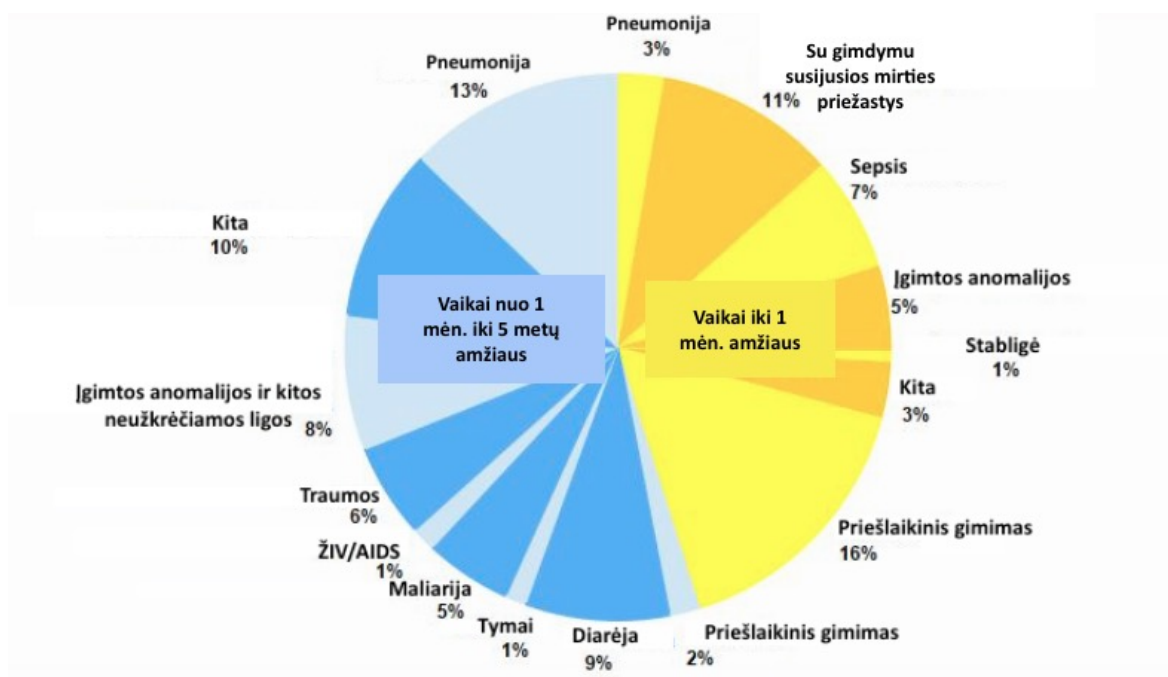
VUSKF – Vilniaus Universiteto Santariškių klinikų filialas

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Diarėja – viena aktualiausių vaikų sveikatos problemų pasaulyje

Diarėja – simptomas, galintis pasireikšti daugelio ligų metu, tačiau dažniausia diarėjos priežastis yra gastroenteritas. Gastroenteritą sukelia platus sukelėjų spektras, tarp kurių - virusinių, bakterinių, parazitinių infekcijų sukelėjai. Nepaisant nuolat gerėjančių higienos sąlygų, bei griežtėjančios maisto užterštumo patogeniniais mikroorganizmais kontrolės, diarėja vis dar išlieka pasaulinio lygio problema, kasmet sutrikdanti apytiksliai 1,7 milijardo gyventojų sveikatą visame pasaulyje [46]. Infekcinės kilmės diarėjos simptomatika – itin įvairi ir tiesiogiai priklauso ne tik nuo ją sukėlusio infekcinio agento, bet ir nuo bendros paciento sveikatos būklės. Dalis pacientų ligos metu jaučia tik silpnus gastroenterito simptomus, tarp kurių be diarėjos gali pasireikšti vėmimas, nemalonūs virškinamojo trakto pojūčiai, subfebrilus ar febrilus karščiavimas. Negydoma arba netinkamai gydoma ūminė diarėja lemia greitą dehidrataciją ir gali sukelti gyvybei pavojingas komplikacijas, ypač naujagimiams ir vaikams iki 5 metų [29,46]. Būtent dėl šios priežasties diarėja iki šių dienų išlieka antra pagal dažnį vaikų iki 5 metų mirties priežastis pasaulyje (1 paveikslas).

1 paveikslas. Vaikų iki 5 metų mirties priežastys 2015 m. [23]



## 1.2. Dažniausi gastroenterito sukėlėjai

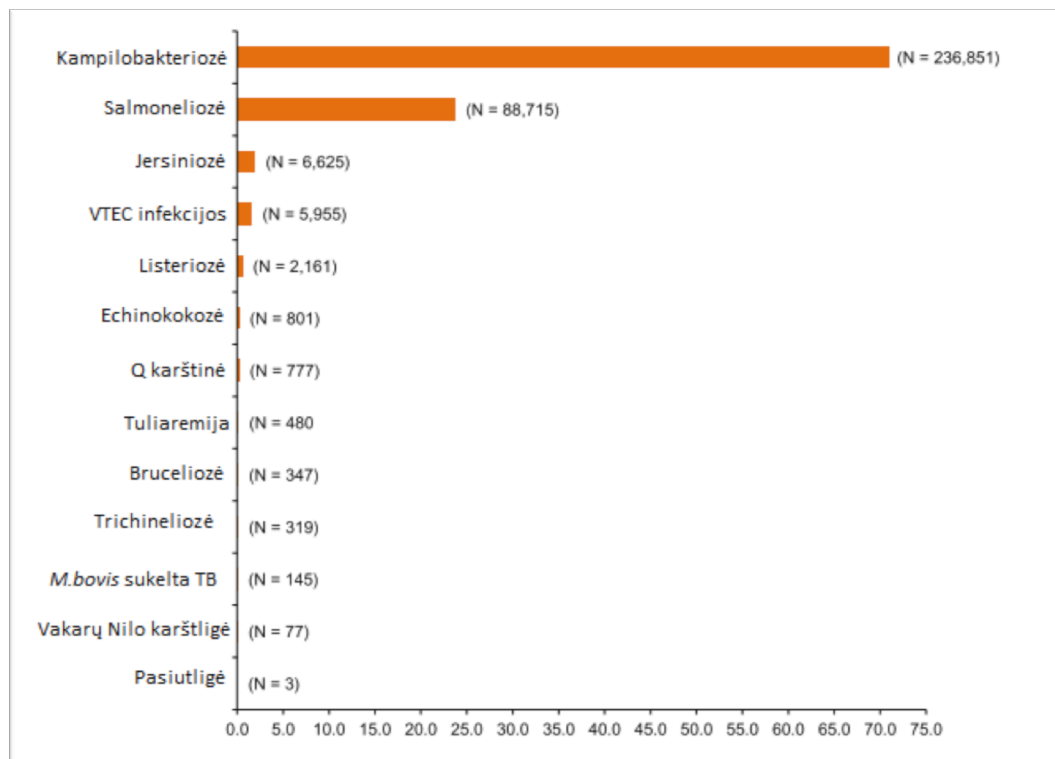
### 1.2.1 Adenovirusai

Ligą sukelia *Adenoviridae* šeimai priklausantys DNR virusai, neturintys išorinio apvalkalo. Žinomi virš 100-to šiai šeimai priklausančių serotipų, iš kurių 57 serotipai gali infekuoti žmones. Šie serotipai skirstomi į grupes nuo A iki G. Gastroenteritą sukelia A ir F grupių atstovai, iš kurių dažniausi gastroenterito sukėlėjai – F grupei priklausantys 40-imto ir 41-o serotipų adenovirusai [36,39]. Jie sukelia nuo 1 iki 8% visų gastroenteritų išsivysčiusiose šalyse, bei nuo 2 iki 31% gastroenteritų besivystančiose šalyse [45]. Adenovirusų sukeltas gastroenteritas dažniausiai pasireiškia vandeningu viduriavimu, galinčiu tęstis nuo vienos iki dviejų savaičių. Kiti galimi simptomai – vėmimas ir subfebrilus karščiavimas.

### 1.2.2 Kampilobakterijos

*Campylobacter* spp. sukelta kampilobakteriozė yra pati dažniausia ūminės bakterinės diarėjos priežastis Jungtinėse Amerikos Valstijose (JAV), Europos sąjungos šalyse (ES) ir Kanadoje [15,30]. Kampilobakteriozės sukėlėjas – Gram-neigiamos, spiralės formos mikroaerofilinės bakterijos [36]. Didžiąją dalį kampilobakteriozių išsivysčiusiose šalyse sukelia genties atstovai *C. jejuni*, *C. coli* ir *C. lari* [12,15]. Pastaraisiais metais stebima sergamumo kampilobakterioze didėjimo tendencija visame pasaulyje, tame tarpe ir Lietuvoje. ES duomenimis 2014-ais metais registruotas 236851-as kampilobakteriozės atvejis (1.2 paveikslas). Lietuvoje 2014-ais metais *Campylobacter* spp. infekcijos taip pat buvo dažniausia bakterinių gastroenteritų priežastis (registruoti 1184 laboratoriškai patvirtinti susirgimo atvejai) [40]. Žmogus *Campylobacter* spp. užsikrėčia valgydamas bakterijomis infekuotus, netinkamai termiškai apdorotus maisto produktus, dažniausiai – netaisyklingai termiškai apdorotą vištieną [15,40]. Būtina paminėti, kad *Campylobacter* spp. būdinga itin nedidelė infekcinė dozė (500-800 kolonijas formuojančių vienetų)[17]. Kampilobakteriozei būdingi simptomai – nuo vienos iki trijų dienų trunkantis febrilus karščiavimas, vėmimas, galvos skausmas ir nuo trijų iki septynių dienų trunkantis vandeningas viduriavimas (galimas viduriavimas su krauju), virškinamojo trakto skausmai.

## 1.2 paveikslas. sergamumas zoonozėmis ES 2014m. [15]



### 1.2.3 Klostridijos

Šis Gram-teigiamas, lazdelės formos anaerobas yra dažniausias bakterinių hospitalinių infekcijų sukėlėjas išsivysčiusiose šalyse. Teigiama, kad *C. difficile* virškinamąjį traktą kolonizuoja pakitus normaliajai žarnyno mikroflorai, dažniausiai po gydymo antibiotikais. Dėl šios priežasties *C. difficile* ir yra vienas iš nuo antibiotikų priklausomo pseudomembrinio kolito sukėlėjų [47]. Šie mikroorganizmai išskiria du toksinus: enterotoksiną A (tcdA geno produktą) ir citotoksiną B (tcdB geno produktą) [36,47], [8]. Pastaraisiais metais pasaulyje stebimas padidėjusio virulentiškumo *C. difficile* padermės (NAP1/BI/O27) plitimas. Tai lėmė padidėjusį šio mikroorganizmo sukeltų infekcijų dažnį. Padidėjusį virulentiškumą lemia toksinų A ir B hiperprodukcija, papildomo toksino produkcija, besivystantis atsparumas antimikrobiniais vaistais, bei sustiprėjusi *C. difficile* savybė sudaryti sporas. *C. difficile* infekcijos simptomai gali svyruoti nuo švelnių (viduriavimas, subfebrilus karščiavimas) iki itin sunkių ir gyvybiškai pavojingų (ūmus viduriavimas, febrilus karščiavimas, toxic megacolon sindromas) [20,35].



#### 1.2.4 Kriptosporidijos

*Cryptosporidium* – mikroskopinis parazitas, sukeliantis ligą kriptosporidiozę. Žmogus parazitais užsikrėčia per sukelėjo cistomis užkrėstą vandenį ir maistą, taip pat tiesioginio kontakto su cistas šalinančių žmonių arba gyvūnų fekalijomis metu [9,31]. Iš visų genties atstovų, dvi rūšys yra patogeniškos žmogui: *Cryptosporidium hominis* ir *Cryptosporidium parvum*. *C. hominis* sukeltos infekcijos labiau paplitusios JAV, Pietų Amerikoje, Australijoje ir Afrikoje, tuo tarpu *C. parvum* yra atsakingas už didžiąją dalį kriptosporidiozių Europoje. Kartu su *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. yra pati dažniausia parazitų sukeltų diarėjų priežastis išsivysčiusiose šalyse [32]. Kriptosporidiozės pasireiškia gausiu, vandeningu viduriavimu besitęsiančiu iki dviejų savaičių, virškinamojo trakto skausmais, silpnumu, vėmimu, febriliu karščiavimu. Imunosupresuotiems asmenims *C. Parvum* gali sukelti itin sunkias infekcijas, kurių metu minėti simptomai pasireiškia itin ūmiai [31].

#### 1.2.5 Dizenterinė ameba

*Entamoeba histolytica* – parazitinis pirmuonis, infekuojantis apytiksliai 500 milijonų gyventojų kiekvienais metais. Nors dauguma (~90%) *E.histolytica* infekcijų – besimptomės, kaikuriems pacientams (~10%) gali išsivystyti invazinės amebiazės, tokios kaip amebiazinis kolitas ar amebiazinis kepenų abscesas [26]. Nors yra nemažai hipotezių apie tai kodėl šis pirmuonis aktyvią ligą sukelia tik mažai infekuotų asmenų daliai, tiksli priežastis iki šiol nėra žinoma [5]. Kasmet pasaulyje patvirtinama 34 – 50 milijonų simptomus sukeliančių amebiazės atvejų ir apie 100 tūkstančių amebiazės sukeltų mirčių [4,30]. Žmogus *E.histolytica* užsikrėčia vartodamas sukelėjo cistomis užterštą maistą arba vandenį. Didžiausias užsikrėtusiųjų skaičius – neišsivysčiusiose ir besivystančiose šalyse, tačiau įvežtiniai ligos atvejai išlieka išsivysčiusių šalių asmens sveikatos priežiūros institucijų problema [26].

#### 1.2.6 Escherichia coli O:157

*Escherichia coli* O:157 yra viena iš patogeninių, enterohemoraginių žarnyninės lazdelės *E. coli* padermių (dar žinoma kaip verocitotoksina arba šiga toksina produkujanti *E. coli* (STEC)). Šios bakterijos sukeltos infekcijos nėra dažnos, tačiau dėl savo savybės sukelti itin sunkios klinikinės eigos gastroenteritus esti vienas svarbiausių virškinamojo trakto patogenų [33]. *E. coli* O:157 yra vienas iš daugelio normaliai žarnyno mikroflorai priklausančios, Gram neigiamos, lazdelės formos bakterijos *E. coli* serotipų. Šis mikroorganizmas dažniausiai sukelia hemoraginį kolitą, tačiau gali sukelti ir nehemoraginę diarėją. Apytiksliai 5% užsikėtusiųjų pasireiškia

hemolizinis ureminis sindromas. Ši komplikacija dažniau pasireiškia vaikams iki 5 metų, pagyvenusiems, bei imunosupresuotiems asmenims [24]. Beveik pusė visų *E. coli* O:157 infekcijų protrūkių siejami su bakterijomis užkrėstais maisto produktais [33].

### 1.2.7 Enterotoksigeninė *E. coli* (ETEC)

Enterotoksigeninė *E. coli* (ETEC) – dar viena gastroenteritą sukelianti žarnyno lazdelės padermė. ETEC laikoma viena dažniausių “keliautojų diarėjos” priežasčių išsivysčiusiose šalyse ir dažniausia naujagimių diarėjos priežastis besivystančiose šalyse [2,38]. ETEC produkuojami toksinai – karščiui labilus toksinas (LT) ir karščiui stabilus toksinas (ST) [30]. Klinikiniai ETEC infekcijos požymiai – karščiavimas, diarėja, virškinamojo trakto skausmai. Galimi simptomai - pykinimas ir vėmimas.

### 1.2.8 Giardijos

*Giardia lamblia* (dar žinoma kaip *G. intestinalis* arba *G. duodenalis*) yra dažniausia parazitinės kilmės gastroenterito sukėlėja JAV [31]. Giardijomis užsikrėčiama į organizmą fekaliniu – oraliniu būdu patekus parazito cistomis. Dažniausiai - suvartojus fekaline tarša pasižyminčių maisto produktų arba vandens. Giardiozių atvejai fiksuojami visame pasaulyje, tačiau išsivysčiusiose šalyse dažniausiai fiksuojami: “keliautojų diarėjos” atvejai, protrūkiškai vaikų priežiūros institucijose [30,31]. Sergamumas *G. lamblia* sukeltu gastroenteritu svyruoja nuo 1 iki 7%. išsivysčiusiose šalyse ir nuo 5 iki 50% besivystančiose šalyse. Svarbiausias giardiazės sukeltas simptomas – ūmi diarėja, tačiau tam tikrais atvejais pasireiškia lėtinė diarėja, lemianti malabsorbciją ir kūno masės kritimą.

### 1.2.9 Norovirusai

Norovirusinės infekcijos sukėlėjas – *Claciviridae* šeimai priklausantys RNR virusai. Norovirusams būdinga didelė sukėlėjo tipų įvairovė. Šiuo metu skiriami 3 svarbiausi norovirusų tipai (GI, GII, GIV), daugiau nei 25 genotipai ir nesuskaičiuojama gausybė subgenotipų. Dažnos taškinės mutacijos viruso genome lemia nuolatinį naujų subgenotipų atsiradimą ir antigeninių viruso determinančių kintamumą [11]. Dažniausias infekcijos sukėlėjas - GII tipo norovirusai. Svarbu paminėti gan didelį šio sukėlėjo atsparumą aplinkos veiksniams. Norovirusai, nuo žmogaus žmogui perduodami fekaliniu – oraliniu keliu, tačiau išlieka gyvybingi vandenyje, ant daiktų paviršių ir nesuyra sąlyginai plačiame temperatūros spektre (nuo minusinės temperatūros iki ~60°C) atverdami kelią netiesioginiam užsikrėtimo mechanizmui. Tai lemia lengvą infekcijos plitimą, ypač uždaroje

patalpose, tokiose kaip vaikų priežiūros/ugdymo įstaigos, ligoninės ir kt. [1,11,36,41]. Sukelėjas atsakingas už 40% visų nebakterinės kilmės gastroenteritų protrūkių JAV [30]. Užkrėčiamųjų ligų ir AIDS centro (ULAC) duomenimis, 2014 m. Lietuvoje registruoti 484 norovirusinės infekcijos atvejai [40]. Norovirusinė infekcija pasireiškia pykinimu, vėmimu, diarėja ir virškinimo trakto skausmais. Klinikinė ligos eiga dažniausiai yra lengva ir tęsiasi vos kelias dienas, tačiau rizikos grupėms (vaikai iki 5 metų, pagyvenę asmenys, imunosupresuoti asmenys) gali sukelti gyvybei pavojingas būkles [11].

### 1.2.10 Rotavirusai

Rotavirusinės infekcijos sukėlėjai – *Rotaviridae* šeimai priklausantys, dvigubos RNR genomą turintys virusai. Išskiriamos septynios rotavirusų serogrupės (A-G). Dažniausi žmogaus rotavirusinės infekcijos sukėlėjai priklauso A, B ir C serogrupėms [10]. Rotavirusai yra vieni dažniausių pavojų gyvybei sukeliančių diarėjų sukėlėjų [21]. Ypatinga sunkios klinikinės eigos rotavirusinės infekcijos rizikos grupė laikomi maži vaikai. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, kasmet vien Europos regione rotavirusinės infekcijos lemia daugiau nei 10 000 vaikų iki 5 metų mirtį [34]. Vyresniems vaikams ir suaugusiesiems rotavirusinė pasireiškia švelnesne klinicine eiga, greičiausiai dėl įgyto specifinio imuniteto po pirmojo susidurimo su sukėlėju [14]. Lietuvoje rotavirusai sukelia didžiausią dalį virusinių gastroenteritų, 2014 m. registruoti 3477 rotavirusinės infekcijos atvejai [40]. Kliniškai rotavirusinės infekcijos dažniausiai pasireiškia vėmimu, vandeninga diarėja ir subfebriliu karščiavimu [14,45].

### 1.2.11 Salmonelės

Salmoneliozės sukėlėjas – *Enterobacteriaceae* šeimai priklausanti Gram neigiama, lazdelės formos bakterija. Šiuo metu skiriamos dvi *Salmonella* spp. rūšys (*S. enterica* ir *S. bongori*) ir virš 2500 serovarų. Reikėtų pabrėžti, kad priešingai nei daugumos bakterijų, *Salmonella* spp. serovariantai žymimi ne pagal jų antigenines determinantes, o analogiškai rūšiai (pvz.: *S. enterica* (O:9,12,Vi; H:d) įprastai vadinama *Salmonella typhi*.) [7,44]. Didžioji dalis patogeninių serovarų priklauso *S. enterica* rūšiai. Salmoneliozė išlieka viena dažniausių zoonozių Europoje. 2014 m. Europos sąjungoje registruoti 88175 salmoneliozės atvejai [15]. Tais pačiais metais Lietuvoje registruoti 962 salmoneliozės atvejai, dažniausiai susiję su kiaušinių ir jų produktų vartojimu, kiek rečiau su vištienos vartojimu [40]. Klinikiniai salmoneliozės požymiai – diarėja, subfebrilus arba febrilus karščiavimas ir virškinamojo trakto skausmai.

### 1.2.12 Šiga toksiną produkuojanti *E. coli*

Šiga toksiną produkuojančios *E. coli* (STEC) padermės nepriklauso anksčiau aptartam *E. coli* O:157 serotipui, tačiau išskiria labai panašius toksinus: šiga toksiną 1 (Stx1) ir/ar šiga toksiną 2 (Stx2), tad yra panašiai paplitusios, bei sukelia panašius klinikinius simptomus [36].

### 1.2.13 Šigelės

*Shigella* spp. – Gram neigiamos, nesporuliuojančios, lazdelės formos bakterijos, priklausančios *Enterobacteriaceae* šeimai. Genčiai priklauso keturios rūšys: *S. dysenteriae* (serogrupė A), *S. flexneri* (serogrupė B), *S. boydii* (serogrupė C) ir *S. sonnei* (serogrupė D). Kiekvienoje iš rūšių, priklausomai nuo bakterijos somatinio O antigeno, skiriami po keletą serotipų [37]. Šigeliozė lemia apytiksliai 20% visų gastroenteritų pasaulyje. Ypatingai *Shigella* spp. sukeltos infekcijos paplitusios besivystančiose šalyse ir regionuose pasižyminčiuose prastomis sanitarinėmis sąlygomis [30,37]. ULAC duomenimis, 2014 m. Lietuvoje registruoti 26 *Shigella* spp. sukeltos infekcijos atvejai [40]. Šigeliozė dažniausiai pasireiškia febriliu karščiavimu, vandeninga diarėja (gali būti kraujinga), virškinamojo trakto skausmais. Sunkios klinikinės eigos šigeliozė dažniausiai pasireiškia vaikams iki 5 metų ir imunosupresuotiems asmenims [37].

### 1.2.14 Choleros vibriomas

Choleros sukėlėjas – Gram neigiamos, lazdelės formos bakterijos, priklausančios *Vibrionaceae* šeimai [3]. Gastroenterito simptomus lemia *V. cholerae* produkuojamas toksinas, tad ligą gali sukelti tik toksiną produkuojantys serotipai (O:1 ir O:139) [3,30]. *V. cholerae* sukeltos infekcijos yra viena dažniausių infekcinės diarėjos priežasčių pasaulyje. Nors infekcijos sukėlėjas labiausiai paplitęs Indijoje, Azijoje, Afrikoje ir Pietų Amerikoje, tačiau sporadiniai infekcijos atvejai registruojami visame pasaulyje [30]. Lietuvoje 2014 m. nebuvo registruotas nė vienas *V. cholerae* sukeltos infekcijos atvejis [40].

### 1.2.15 Jersinijos

Jersiniozės sukėlėjas – *Enterobacteriaceae* šeimai priklausančios Gram neigiamos, koku formos bakterijos. Trys *Yersinia* spp. rūšys sukelia infekcijas žmogui: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* ir *Y. pestis*. Iš šių rūšių dvi (*Y. enterocolitica* ir *Y. pseudotuberculosis*) yra gastroenterito sukėlėjai [13]. Žmogus jersinijoje užsikrėčia vartodamas netinkamai termiškai apdorotus mėsos produktus arba nepasterizuotą pieną [13,15]. Jersiniozė yra viena iš dažniausių zoonozių pasaulyje. 2014 m. Europos sąjungoje jersinijoje buvo trečia zoonozė pagal dažnį

(registruoti 6625 patvirtinti infekcijos atvejai). Lietuvoje tais pačiais metais registruoti 197 patvirtinti jersinijozės atvejai [15,40]. Klinikinė infekcijos eiga yra ganėtinai sudėtinga ir pasižymi subfebriliu arba febriliu karščiavimu, kraujinga diarėja, virškinamojo trakto skausmais. Simptomų pasireiškimo laikotarpis tęsiasi nuo poros savaičių iki mėnesio [13,30,48].

### 1.3 Klinikinėje praktikoje naudojami gastroenteritų sukėlėjų identifikavimo metodai

Klinikinėje praktikoje naudojamų gastroenterito sukėlėjų identifikavimo metodai pateikti 1.3 lentelėje.

1.3 lentelė. Klinikinėje praktikoje naudojamų gastroenterito sukėlėjų identifikavimo metodus apibendrinanti lentelė.

Patogenas	Metodai			
	"Auksinis" standartas	Labiausiai paplitęs (klasikinis) metodas	Molekuliniai diagnostikos metodai	Alternatyvūs metodai
<i>E. coli</i> O:157	Išmatų pasėlis	Išmatų pasėlis	Polimerazės grandininė reakcija (PGR), Dauginė PGR, Tikro laiko PGR, Luminex xTAG GPP	Imunochromatografija, masių spektrometrija, biocheminėmis mikroorganizmų savybėmis paremti greit identifikavimo testai
ETEC				
STEC				
<i>Yersinia</i> spp.				
<i>V. cholerae</i>				
<i>Shigella</i> spp.				
<i>Salmonella</i> spp.				
<i>Campylobacter</i> spp.				
<i>C. difficile</i>		Imunochromatografija		
<i>E. histolytica</i>	Išmatų mikroskopija	Išmatų mikroskopija		Imunochromatografija
<i>Cryptosporidium</i>				
<i>Giardia</i>				
<i>Adenovirus</i>	-	Imunochromatografija	PGR, Atvirkštinės transkripcijos PGR, Luminex xTAG GPP	Elektroninė mikroskopija
<i>Norovirusai</i>		Imunochromatografija		
<i>Rotavirusai</i>		Imunochromatografija		

[1,2,7,8,11,13,17–20,24,28–30,37,44,48]

### 1.3.1 Mikrobiologinio išmatų pasėlio metodas

Mikrobiologinis išmatų pasėlis laikomas “auksiniu standartu” bakterinių gastroenterito sukėlėjų laboratorinėje diagnostikoje. Tiriamoji medžiaga, siekiant užtikrinti mikroorganizmų gyvybingumą, į laboratoriją pristatoma transportinėje terpėje. Virškinamąjo trakto mikroflora yra itin įvairi ir gausi, tad medžiagą pristačius į laboratoriją pastaroji sėjama į selektyvines (skirtas konkrečiam patogeniui ir stabdančias pašalinės mikrofloros augimą), ir elektyvines (skirtas skirtingų rūšių bakterijų kolonijų diferencijacijai) mikrobiologines agarizuotas terpes. Pasėliai inkubuojami atitinkamose sąlygose 18 – 48 h. priklausomai nuo optimalaus temperatūros režimo, deguonies poreikio ir dauginimosi pusperiodžio kiekvienam iš tiriamų patogenų [43].

Išaugusios kolonijos vertinamos atsižvelgiant į jų dydį, spalvą, formą (S ar R), tekstūrą (sausos ar gleivėtos). Tyrėjui atrinkus potencialiai patogeninių bakterijų kolonijas, siekiant nustatyti/patvirtinti rūšį, vertinamos bakterijos biocheminės savybės: gliukozės, laktozės, sacharozės skaldymas, bei H<sub>2</sub>S produkcija trijų cukrų pusiau nuožulniame agare, Simonso citrato skaldymas pusiau nuožulniame simonso citrato agare, Manitolio-D-karboksilazės fermentacija manitolio agare, indolo produkcija trijų cukrų buljone, lizino ir ornitino dekarboksilazės sintezė, atliekami katalazės ir oksidazės testai. Tam tikrų mikroorganizmų rūšies patvirtinimui atliekami papildomi, sukėlėjui specifiniai testai (pvz.: *Campylobacter* spp. rūšis nustatoma atlikus hipurato testą.). Įvertinus visų šių testų rezultatus nustatoma/patvirtinama sukėlėjo rūšis. Esant poreikiui, sukėlėjo serotipas nustatomas atliekant agliutinacijos reakciją su sukėlėjams būdingų antigenų polivalentiniais ir monovalentiniais antiserumais. Esant poreikiui, nustatomas sukėlėjo jautrumas antibakteriniams preparatams, vadovaujantis Europos jautrumo antibakteriniams preparatams nustatymo komiteto (EUCAST) standartu [43].

Nors pasėlio metodas ir yra laikomas “auksiniu standartu” ir pasižymi aukštu jautrumu bei specifiškumu, reikia atkreipti dėmesį į metodo trūkumus. Svarbiausias jų – tiriamojoje medžiagoje privalo būti gyvybingas sukėlėjas. Tai reiškia, kad tyrimo rezultatams įtakos gali turėti pradėtas gydymas antibiotikais, bei laikas nuo tiriamosios medžiagos surinkimo iki pristatymo į laboratoriją ir mikrobiologinio pasėlio atlikimo. Kitas svarbus trūkumas – tyrimo atlikimo laikas. Priklausomai nuo infekcijos sukėlėjo, pilnas patogeno identifikavimas gali užtrukti nuo poros dienų iki savaitės. Tai lemia vėlyvo tikslingo gydymo pradėjimą [16,18,28].

### **1.3.2 Išmatų mikroskopijos metodas**

Išmatų mikroskopija – “auksinis standartas” parazitinių pirmuonių diagnostikoje. Šviežios išmatos surenkamos į sterilų indą be priedų. Siekiant užtikrinti sukelėjų gyvybingumą tiriamojoje medžiagoje, surinktos išmatos kuo skubiau (ne vėliau nei per 20 minučių nuo surinkimo) pristatomos į laboratoriją ir mikroskopuojamos. Mikroskopijos metu tiriamojoje medžiagoje ieškoma sukelėjo arba jo cistų. Sukelėjo rūšis nustatoma pagal mikroskopijos metu aptikto mikroorganizmo morfologines savybes [19].

Nors išmatų mikroskopijos metodas ir yra laikomas “auksiniu standartu” parazitinių pirmuonių diagnostikoje, šis metodas turi daug trūkumų.

- Net ir mėginį į laboratoriją pristačius ir ištyrus laiku, itin sunku jame rasti gyvybingą sukelėją. Rekomenduotina tirti po kelis to paties paciento mėginius dešimties dienų laikotarpyje, taip išvengiant klaidingai neigiamų rezultatų, tačiau toks tyrimo protokolas labai prailgina tyrimo laiką [19].
- Mikroskopija yra vienas subjektyviausių tyrimo metodų laboratorinėje medicinoje. Tikslus sukelėjo identifikavimas reikalauja daug tyrėjo žinių ir patirties [19].

### **1.3.3 Imunochromatografijos metodas**

Imunochromatografijos metodas pagrįstas antikūno geba sąveikauti su jam specifiniu antigenu. Tai – kokybinis metodas, kurio metu kietas paviršius, padengtas chemine medžiaga žymėtais, sukelėjui specifiniais antikūnais pamerkiamas į tiriamosios medžiagos suspensija. Tiriamojoje medžiagoje esant specifiniam antigenui, pastarasis migruoja antikūno link ir sudaro su juo sąveiką, atskeliant cheminę medžiagą ir išryškėjant spalvotai juostelei [22].

Imunochromatografiniai metodai dažniausiai pasižymi aukštu specifiškumu. Tačiau mikroorganizmų savybė mutuoti (taip kintant ir mikroorganizmo paviršiuje esančioms antigeninėms determinantėms) lemia žemą metodo jautrumą [1].

## **1.4. Luminex xTAG GPP**

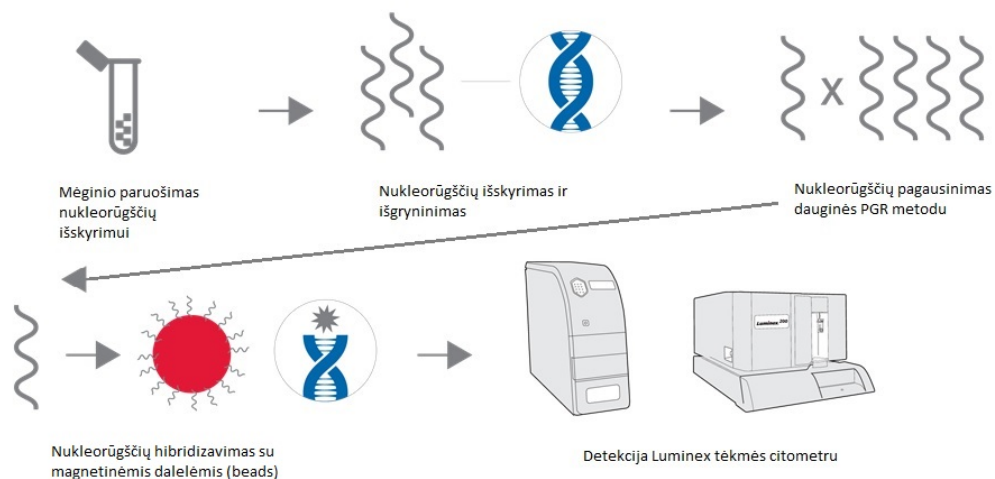
Luminex xTAG® Gastrointestinalinių Patogenų Panelė (GPP) yra kokybinis tyrimas skirtas tiksliam ir greitam daugelio gastroenteritą sukeliančių patogenų nukleorūgščių (DNR ir RNR) identifikacijai, tarp kurių – virusų, parazitų ir bakterijų (bei bakterijų produkuojamų toksinų) genai.

Tiriamoji medžiaga – šviežios, užšaldytos arba transportinėje terpėje esančios pacientų, kuriems pasireiškia infekcinio kolito arba gastroenterito simptomai, išmatos. Panelės dėka, vienos reakcijos metu tiriamojoje medžiagoje galima identifikuoti šiuos patogenus: Adenovirusus 40/41, *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* toksinus A/B, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*, *E.coli* O:157, enterotoksiną produkuojančias *E.coli* (ETEC), *Giardia*, Norovirusus GI/GII, Rotavirusą A, *Salmonella* spp., SLT (ang. Shiga-like toxin) citotoksinus produkuojančias *E.coli* (STEC) stx 1/stx 2, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* ir *Yersinia enterocolitica*. Dėl unikalios galimybės identifikuoti tokį platų sukelėjų spektrą, xTAG GPP yra greita diagnostinė ūmaus bei lėtinio infekcinio gastroenterito priemonė. Šis molekulinės diagnostinis rinkinys gali tapti neatsiejamu epidemiologinės priežiūros įrankiu visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijose [25].

### 1.4.1 Metodo technologija

Luminex xTAG GPP metodo technologija paremta penkiais pagrindiniais etapais (1.4.1 paveikslas)

1.4.1 paveikslas Luminex xTAG GPP metodo etapai [25].



1. **Mėginio paruošimas nukleorūgščių išskyrimui.** Ruošiant tiriamąją medžiagą nukleorūgščių išskyrimui, lizės buferyje suspenduojama ~1 – 1,5 g/ml tiriamų išmatų. Per mažas tiriamosios medžiagos kiekis gali lemti klaidingai neigiamus tyrimo rezultatus, per



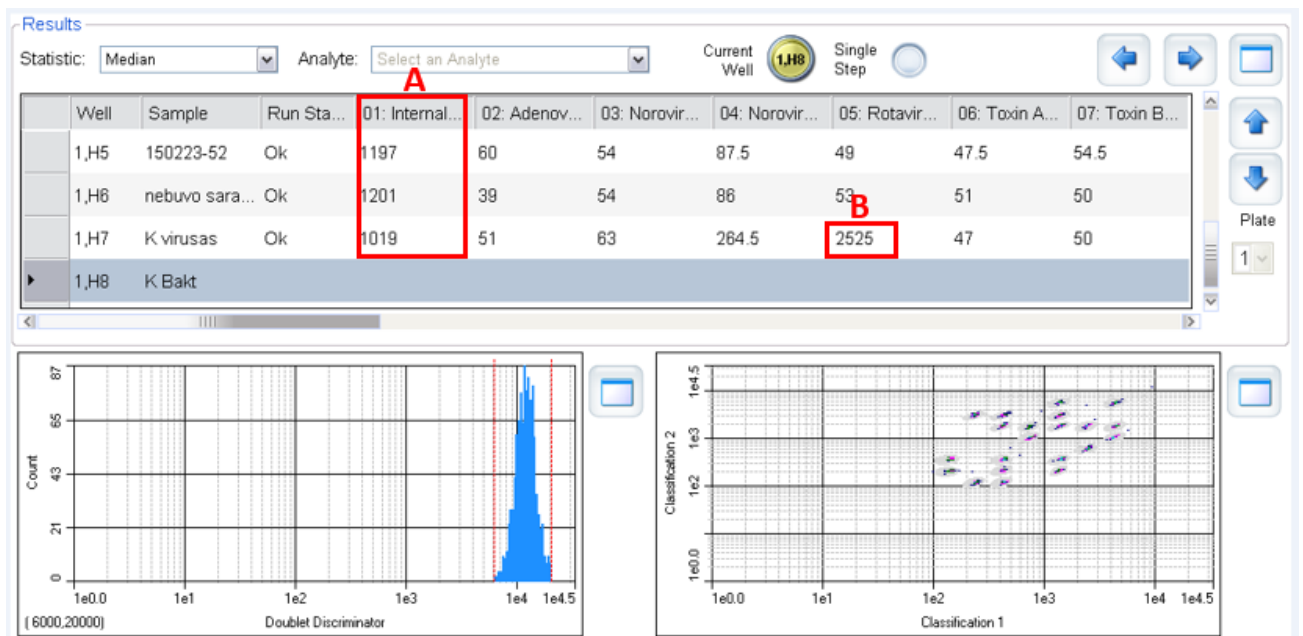
didelis – tolimesnių tyrimo etapų inhibiciją. Atsižvelgiant į tai, kad tyrimo metu nustatomi ir parazitiniai pirmuonys, kurie tiriamojame medžiagoje esti cistų pavidale, suspensija veikiama mechaniškai. Mechaninis poveikis turi būti pakankamas, kad suirtų parazitų cistos, tačiau ne per didelis, siekiant išsaugoti bakterijų ir virusų nukleorūgščių vientisumą. Šiame etape mėginys papildomas vidine tyrimo kontrole – bakteriofago MS2 RNR [25].

2. **Nukleorūgščių išskyrimas ir išgryninimas.** Šiame etape, rankiniu arba automatizuotu būdu, naudojant kitų tiekėjų rinkinius, išskiriamos visų grupių sukelėjų nukleorūgštys. Atsižvelgiant į tai, kad panelės nustatomų virusinių gastroenterito sukelėjų tarpe yra ir RNR virusų, tyrėjui itin svarbu pasirinkti tinkamą nukleorūgščių išskyrimo rinkinį. Pastarojo sudėtyje esančiuose reagentuose negali būti nei DNA'zių (įprastai esančių RNR skyrimo rinkiniuose), nei RNA'zių (įprastai esančių DNR skyrimo rinkiniuose). Taipogi, rinkinyje esančios kolonėlės turi išgryninti tiek trumpas virusų nukleorūgštis, tiek ir ilgas, genomines bakterijų ir parazitinių pirmuonių nukleorūgštis [25].
3. **Nukleorūgščių pagausinimas dauginės PGR metodu.** Metodas naudoja 21 porą sukelėjams specifinių pradmenų porų, žymėtų biotino žyme ir fermentų mišinį, kuriame esti tiek atvirkštinę transkripciją (virusų nukleorūgštims), tiek karštos pradžios PGR vykdytys fermentai. Siekiant išvengti nespecifinio pradmenų prilipimo, būtinos sąlygos laboratorijos darbuotojams bei įrangai: reakcijos mišinio pilstymas kaip įmanoma šaltesnėse sąlygose (pvz.: ledo vonelėje, šaldančiame bloke), bei termocikleris, pasižymintis greitu bloko temperatūrinio režimo keitimu [25].
4. **Nukleorūgščių hibridizavimas su magnetinėmis dalelėmis.** Luminex xTAG GPP metodas leidžia vienu metu ištirti tiriamąją medžiagą dėl plataus spektro dažniausių žarnyno patogenų sukeltos infekcijos. Dauginės patogenų detekcijos tikslui pasiekti xTAG GPP rinkinyje naudojama ne tik vieno žingsnio nukleorūgščių pagausinimo technologija, bet ir unikali magnetinių dalelių technologija. Rinkinyje esančiame magnetinių dalelių mišinyje esti po grupę magnetinių dalelių kiekvienam iš patogenų. Kiekvienos iš šių grupių dalelių paviršius padengtas patogeniui specifiniais oligonukleotidiniais zondais. Hibridizacijos metu pagausinta patogeno nukleorūgštis seka komplemetarumo principu prijungiama prie jai specifinės magnetinių dalelių gupės, bei pažymima fluorescuojančia žyme [25].
5. **Detekcija Luminex tēkmės citometru.** Atlikus nukleorūgščių hibridizaciją su magnetinėmis dalelėmis, pastarosios yra “nudažomos” fluorescuojančiu dažu. Kiekviena, patogeniui specifinių dalelių grupė sugeria skirtingą šio dažo kiekį. Tai tēkmės citometrui leidžia atskirti kuriam patogeniui konkreti dalelė yra specifiška. Rezultatai analizuojami

mėginius ištyrus Luminex® 100/200™ tėkmės citometru, naudojant Luminex® TDAS GPP programą. Magnetinių dalelių specifiškumą patogeni tėkmės citometras detektuoja pagal magnetinės dalelės gebą sugerti raudonus/infraraudonus spindulius. Analizės metu tėkmės citometras skaičiuoja fluorescencijos signalo intensyvumą šimte kiekvienam patogeni specifinių magnetinių dalelių. Iš fluorescencijos signalų intensyvumo šimte patogeni specifinių magnetinių dalelių Luminex® TDAS GPP programa paskaičiuoja signalo intensyvumo medianą [25].

Mėginys vertinamas kaip teigiamas jei programa detektuoja teigiamą vidinės kontrolės (žr. skyrelį „Mėginio paruošimas nukleorūgščių išskyrimui“) signalą ir bent vienoje iš patogeni specifinių magnetinių dalelių grupių detektuojamo fluorescencijos signalo mediana viršija gamintojų nurodytą ribinį tašką (angl. „cut-off point“)[25].

1.4.2 paveikslas. Mėginių analizė Luminex® TDAS GPP programa. A. raide pažymėtas vidinės kontrolės signalo detekcijos stulpelis. B raide pažymėta mėginyje detektuojama aukštesnė už ribinį tašką fluorescencijos signalo intensyvumo mediana.



Pabaigus analizę Luminex® TDAS GPP programa rezultatus apibendrina pateikdama supaprastintą lentelę, kurioje atsispindi mėginio identifikacinis numeris, mėginyje identifikuoti patogenai, bei vidinė kontrolė. (1.4.3 paveikslas)

### 1.4.3 paveikslas. Apibendrinta tyrimo rezultatų lentelė.

Location	Sample	Detected Targets	Internal Control
1(1,A1)	140226-146		PRES
2(1,B1)	140306-106	Norovirus GI/GII	PRES
3(1,C1)	140226-26		PRES
4(1,D1)	130719-54	C. difficile toxin A/B	PRES
5(1,E1)	130721-27		PRES
6(1,F1)	130724-24	ETEC LT/ST, Salmonella 1, Salmonella 2	PRES
7(1,G1)	140215-56		PRES
8(1,H1)	140218-192	C. difficile toxin A/B, Entamoeba histolytica	PRES
9(1,A2)	140219-41	Salmonella 1, Salmonella 2	PRES
10(1,B2)	140219-47	C. difficile toxin A/B, Entamoeba histolytica	PRES

## 2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

### 2.1. Tiriamoji medžiaga

Tyrimo metu tirti žmogaus išmatų mėginiai (n=150) surinkti Vilniaus Universiteto Santariškių klinikų vaikų ligoninės filialo laboratorinės diagnostikos skyriaus mikrobiologijos laboratorijoje 2015-2016 metų laikotarpyje. Tiriamąja grupe (n=138) pasirinkti vaikų iki 5 metų išmatų mėginiai, kurie imunochromatografijos metodu buvo ištirti dėl rotavirusinės, norovirusinės ir adenovirusinės infekcijų. Imunochromatografiniu metodu visi tiriamosios grupės mėginiai buvo identifikuoti kaip neigiami visiems iš minėtųjų virusų. Siekiant įsitikinti, kad naujai išbandomas molekulinės diagnostikos rinkinys veikia teisingai, surinkta kontrolinė mėginių grupė, kurią sudarė po tris teigiamus mėginius kiekvienam iš minėtųjų virusų, bei po vieną teigiamą *C. jejuni*, *Salmonella spp.*, bei *Y. enterocolitica* mėginį. Atlikus klasikinius mikrobiologinius tyrimus, likutinė tiriamoji medžiaga be priedų buvo saugoma -30°C iki tyrimo pradžios.

**Tyrimo apribojimai:** Maža tyrimo imtis, bei pasirinktas tiriamosios grupės atrankos kriterijus neleidžia pilnavertiškai įvertinti Luminex xTAG GPP metodo jautrumo ir specifiškumo.

## **2.2. Metodika**

Mėginio paruošimo nukleorūgščių išskyrimui etape naudotas easyMAG lizės buferinis tirpalas (bioMerieux, Prancūzija). Mechaniniam parazitinių pirmuonių cistų apvalkalų suardymui naudoti Soil Kit Bead Tubes mėgintuvėliai (Bertin, JAV), kaip nurodyta gamintojų metodikose. Nukleorūgštys išskirtos “GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit” (Thermo Scientific, JAV), pagal gamintojo nurodytą metodiką.

Nukleorūgščių švarumas ir koncentracija pamatuota Eppendorf BioSpectrometer® kinetic spektrofotometru, A260/280 sugerčių santykio režime. Įvertinta nukleorūgščių koncentracija (ng/μl) bei mėginio užteršimas priemaišomis, galinčiomis turėti įtakos dauginei PGR reakcijai.

Dauginė PGR reakcija, nukleorūgščių hibridizacija su magnetinėmis dalelėmis ir rezultatų vizualizacija bei interpretacija atlikta naudojant molekulinės mikrobiologinės diagnostikos rinkinį xTAG® GPP (Luminex Molecular Diagnostics, Inc., Kanada), pagal gamintojo nurodytą metodiką.

## **2.3. Kompiuterinės programos ir statistinės duomenų analizės metodai**

Duomenų įvestis ir statistinė analizė atlikta naudojant statistinį paketą „IBM SPSS statistics” (22 ver.) ir programą Microsoft Exel for Mac (14 ver.). Skirtumo tarp kategorinių duomenų statistiniam reikšmingumui įvertinti naudotas chi- kvadrato ( $\chi^2$ ) testas. Tais atvejais, kai buvo mažiau nei penki tikėtini dažniai vienam langeliui, statistinis reikšmingumas vertintas naudojantis Fišerio tiksluoju testu. Tyrimo metu pasirinktas reikšmingumo lygmuo – 95%, skirtumas tarp tikrinamų požymių laikytas statistiškai reikšmingu, kai  $p \leq 0,05$ . Kai  $p > 0,05$  laikyta, kad skirtumas tarp tiriamų požymių – nereikšmingas.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Tiriamajai imčiai bei kontrolinei grupei priklausančius mėginius surinko, klasikiniiais metodais ištyrė ir apibūdino Vaikų ligoninės LDS Mikrobiologijos laboratorijos darbuotojai, kaip aprašyta šio darbo 2.1 skyriuje. Darbo metu 2.1 skyriuje aprašyta mėginių imtis (n=138) ir kontrolinė mėginių grupė ištirta molekulinio, dauginės patogenų detekcijos metodu. Tyrimo rezultatai pateikiami 3.1 lentelėje.

Analizuojant duomenis pastebėta, kad visi iš kontrolinei grupei priklausančių teigiamų mėginių (n=12) molekulinio dauginės patogenų detekcijos (MDPD) metodu buvo identifikuoti kaip teigiami tam pačiam patogeniui, kaip ir tradiciniais metodais. Tiriamajoje grupėje (n=138) net 54,3% mėginių (n=76) buvo identifikuoti kaip teigiami bent vienam iš panelėje esančių patogenų. 45,6% mėginių (n=63) molekulinio metodu buvo identifikuoti kaip neigiami visiems panelėje esantiems patogenams.

3.1 lentelė. Gastroenterito sukėlėjai, identifikuoti klasikiniiais metodais ir molekulinio, dauginės patogenų detekcijos metodu (n=150).		
	<b>Klasikiniais metodais (mikrobiologinio pasėlio, imunochromatografijos, išmatų mikroskopijos)</b>	<b>Molekulinio, dauginės patogenų detekcijos metodu</b>
	<i>Abs. sk.</i>	<i>Abs. sk.</i>
<b>Bakterijos</b>		
<i>E. coli</i> (ETEC)	0	2
<i>E. coli</i> (STEC)	0	2
<i>E. coli</i> O:157	0	2
<i>Salmonella</i> spp.	3* <sup>a</sup>	19* <sup>a</sup>
<i>Shigella</i> spp.	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	1*	4*
<i>Vibrio cholerae</i>	0	0

<i>Campylobacter</i> spp.	1*	14*
<i>C. difficile</i>	0	10
	<b>Klasikiniais metodais (mikrobiologinio pasėlio, imunochromatografijos, išmatų mikroskopijos)</b>	<b>Molekuliniu, dauginės patogenų detekcijos metodu</b>
	<i>Parazitai</i>	
<i>Giardija lamblia</i>	0	2
<i>Cryptosporidium</i>	0	0
<i>E. histolytica</i>	0	2 <sup>b</sup>
	<i>Virusai</i>	
<b>Adenovirus</b>	3*	6*
<b>Rotavirus</b>	3*	4*
<b>Norovirus GI</b>	3*	6*
<b>Norovirus GII</b>		39

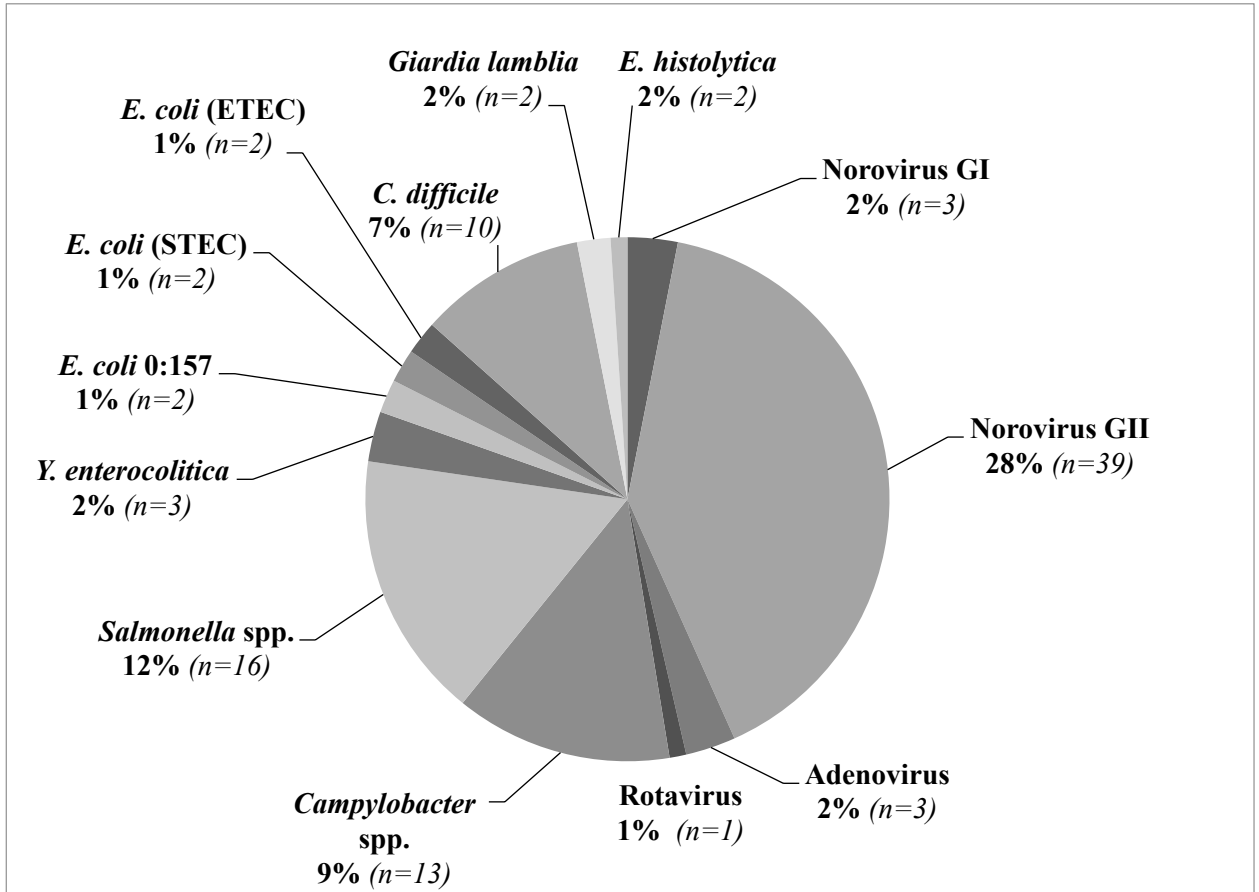
\* - Į identifikuotų patogenų skaičių įtraukta kontrolinė grupė (žr. 2.1 skyrių); <sup>a</sup> – įtrauktas mėginys atitiko tiriamajai grupei keltą kriterijų, tačiau šis mėginys buvo ištirtas ir klasikiniu, išmatų pasėlio tyrimu, kurio metu buvo identifikuotas sukėlėjas. <sup>b</sup> – į imtį įtrauktas pakartotas to paties paciento tyrimas

Pabrėžtina, kad Vaikų ligoninės LDS Mikrobiologijos laboratorijoje naudojamas imunochromatografijos metodas nediferencijuoja Norovirusų į GI ir GII tipus, tad lentelėje pateiktas klasikiniai metodais nustatyti norovirusų skaičius reprezentuoja abu tipus.

### **3.1. Molekuliniu dauginės patogenų detekcijos metodu nustatytų patogenų pasiskirstymas**

Tiriamajoje mėginių grupėje (n=138) MDPD nustatytų patogenų pasiskirstymas pavaizduotas 3.1 paveiksle.

3.1 paveikslas. MDPD nustatytų patogenų pasiskirstymas.



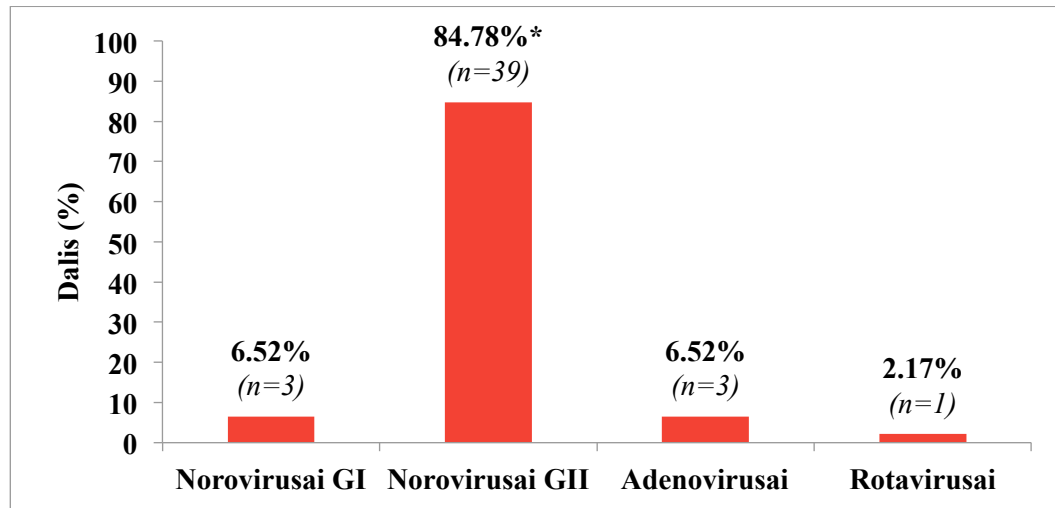
### 3.2. MDPD metodu nustatytų patogenų pasiskirstymas gupėse

#### 3.2.1 Virusai

MDPD metodu analizuojamoje imtyje (n=138) identifikuoti 46 virusinių gastroenteritų sukelėjai, tai sudarė 33,3% visos analizuojamos imties. Svarbiausi tiriamosios imties sudarymo kriterijai buvo šie: mėginiai ištirti dėl rotavirusams, adenovirusams ir norovirusams specifinių antigeninių determinančių imunochromatografijos metodu. Imunochromatografinio tyrimo rezultatas buvo neigiamas visiems anksčiau išvardintiems sukelėjams. Atsižvelgiant į tokią didelę molekulinio metodu nustatytų virusinių gastroenterito sukelėjų dalį nuspręsta šios sukelėjų grupės

rezultatus išnagrinėti išsamiau. Molekuliniu metodu nustatytų virusinės kilmės gastroenteritų sukėlėjų pasiskirstymas pavaizduotas 3.2.1 paveiksle.

3.2.1 paveikslas. MDPD metodu nustatytų virusinių gastroenterito sukėlėjų pasiskirstymas.



\*  $p < 0,01$

Tarp molekulinio metodu nustatytų virusinių gastroenterito sukėlėjų ( $n=46$ ) dominavo Noroviruso GII genotipas. Nustatytas statistiškai reikšmingas skirumas ( $p < 0,01$ ) tarp nustatytų pastarojo patogeno ir kitų panelėje esančių virusinių gastroenterito sukėlėjų pasiskirstymo. Panašūs, Luminex xTAG GPP ir klasikinius metodus lyginantys tyrimai taipogi parodė reikšmingai dažnesnį norovirusų nustatymą šiame magistriniame darbe taikytu metodu [18,42]. Tokie rezultatai galėtų būti aiškinami:

1. Mažu imunochromatografija paremtų testų jautrumu. Nors daugumos greitų norovirusų nustatymo testų gamintojų nurodomas tyrimo jautrumas dažniausiai viršija 90%, atliktų mokslinių tyrimų rezultatai teigia, kad imunochromatografinio metodo jautrumas nustatant norovirusus išmatose tesiekia 35 – 52% [1]. Toks žemas, gamintojų duomenų neatitinkantis, greitų testų jautrumas gali būti sietinas su norovirusų genotipų, o ypač – genotipų variantų, lemiančių pakitusias antigenines determinantes įvairove. Dėl šios priežasties molekulinio metodo, kurie paremti konservatyvios norovirusų RNR sekos identifikavimu taikymas yra pranašesnis siekiant išvengti klaidingai neigiamų tyrimo rezultatų [41].
2. Per dideliu molekulinio metodo jautrumu. Molekuliniiais tyrimų metodais identifikuojamas ne patogenas, o jam specifinė nukleorūgštis seka. Dėl šios priežasties molekuliniais



metodais galima aptikti ir infekcijos nesukeliantį patogenų “likučius”, taip padidinant klaidingai teigiamų rezultatų dalį [18,41].

Šiame darbe aprašytas skirtumas tarp imunochromatografiniu ir molekuliniais metodais gautų rezultatų skirtumo leidžia daryti išvadą apie per mažą imunochromatografinio metodo jautrumą nustatant norovirusines infekcijas.

### 3.2.2 Bakterijos

MDPD metodu analizuojamoje imtyje (n=138) identifikuoti 48 bakterinės kilmės gastroenteritų sukėlėjai, tai sudarė 34,8% visos analizuojamos imties. Pabrėžtina, kad dalyje mėginių rasta po daugiau nei vieną bakterinės kilmės patogeną, bei tik nedideliai daliai imtį sudarančių mėginių, gydytojų užsakymu buvo atliktas auksiniu standartu laikomas mikrobiologinio pasėlio tyrimas. Duomenys apie molekulinį sukėlėjų identifikavimą pasėlio metodu ištirtuose ir neištirtuose mėginiuose pateikiami 3.2.2 lentelėje.

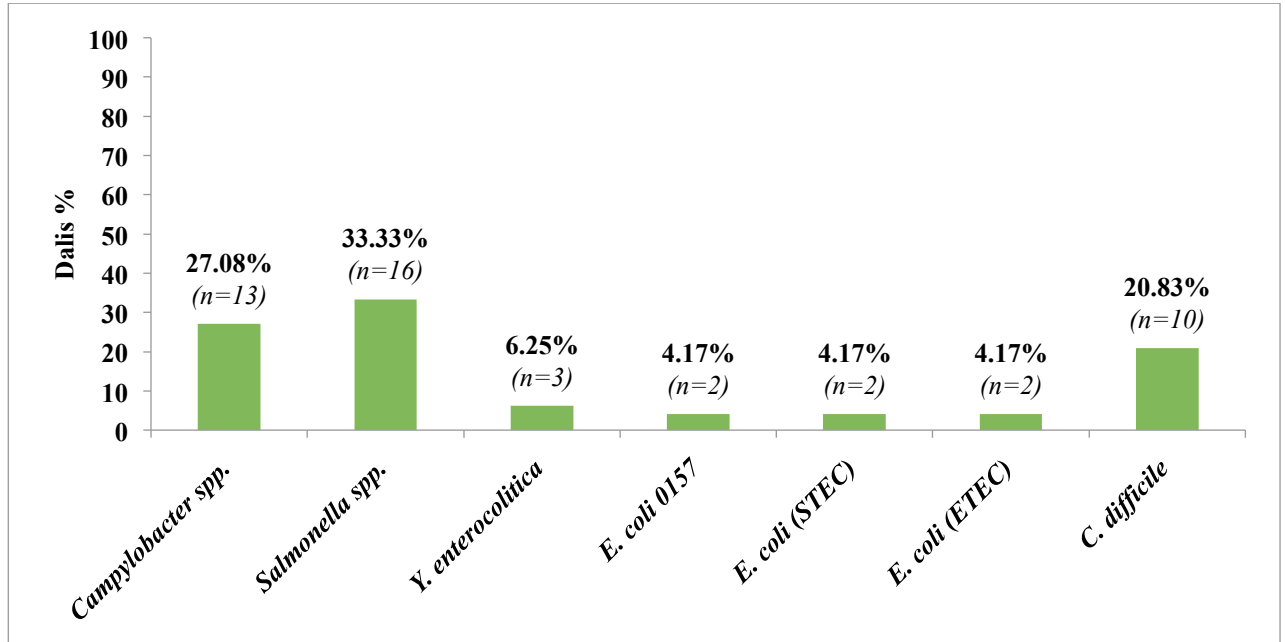
3.2.2 lentelė. Sukelėjų nustatymas pasėlio metodu tirtuose ir netirtuose mėginiuose.

Mikrobiologinio pasėlio metodu			
Molekulinis metodas	Teigiama	Neigiama	Netirta
Teigiama	2	5	35
Neigiama	0	36	60

Tyrimo rezultatai rodo, kad net 36,8% mėginių (n=35), kuriems nebuvo užsakytas mikrobiologinio išmatų pasėlio tyrimas (n=95), molekulinis dauginės patogenų detekcijos metodu rastas bakterinės kilmės sukėlėjas. Literatūros duomenimis, dėl gydytojų sprendimo užsakyti laboratorinius tyrimus ne pilnam infekcinių gastroenteritų sukėlėjų spektrui nedideliu kiekiu (iki 48% infekcinių sukėlėjų) [42].

Molekulinis metodas nustatytų bakterinės kilmės gastroenterito sukėlėjų pasiskirstymas pavaizduotas 3.2.3 paveiksle.

3.2.3 paveikslas. MDPD metodu nustatytų bakterinių gastroenterito sukėlėjų pasiskirstymas.



\* p=0,08

Didžiąją dalį (33,3%) molekulinio metodu nustatytų bakterinės kilmės gastroenterito sukėlėjų sudarė *Salmonella* spp. genties mikroorganizmai (n=16), tačiau tai nesudarė statistiškai reikšmingai didesnės dalies lyginant su kitais molekulinio metodu nustatytais bakterinės kilmės sukėlėjais. Kiek mažesnę dalį sudarė *Campylobacter* spp. ir *C. difficile* mikroorganizmai (atitinkamai 27% (n=13) ir 20,8% (n=10)).

Įdomus radinys buvo molekulinio metodu aptikta *E. coli* O:157 specifinė nukleorūgšties seka. Lietuvoje registruojami tik pavieniai *E. coli* O:157 atvejai. ULAC duomenimis, 2014 m. registruotas vos vienas verotoksiną produkuojančios Ešerichijos infekcijos atvejis [40]. Atlikus molekulinį tyrimą ir identifikavus pastarąjį sukėlėją net dvejuose mėginiuose, Vaikų ligoninės LDS darbuotojų buvo paprašyta ištirti šiuos mėginius mikrobiologinio išmatų pasėlio metodu. “Auksiniu standartu” laikomo mikrobiologinio pasėlio tyrimo metu *E. coli* O:157 neišaugo. Tai sukėlė abejonių dėl molekulinio metodo metu gautų rezultatų patikimumo. Abejonėms išsklaidyti šie mėginiai molekulinio metodu buvo ištirti pakartotinai. Pakartotinio tyrimo rezultatai patvirtino pirmojo tyrimo metu gautus rezultatus. Mėginiai papildomai buvo išsiųsti į referentinę laboratoriją

(Nacionalinė Visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija), kur PGR tyrimo metu paneigta *E. coli* O:157 infekcija. Apie klaidingai teigiamą molekulinio tyrimo rezultatą pranešta, bei dėl galimų priežasčių pasikonsultuota su tyrime naudotos panelės gamintojais (Luminex Molecular Diagnostics, Inc., Canada). Šis atvejis patvirtina literatūroje aptariamus ir darbe naudoto MDPD metodo trūkumus:

- Molekuliniai metodai nustato sukėlėjo nukleorūgštis, o ne paties sukėlėjo buvimą tiriamojoje medžiagoje. Su maistu patekęs nebegyvybingas infekcijos sukėlėjas gali lemti klaidingai teigiamus molekulinio tyrimo rezultatus.
- Molekulinių tyrimų jautrumas yra per didelis klinikinei laboratorinei diagnostikai. Net ir vienos sukėlėjui specifinės nukleorūgštis buvimas tiriamojoje medžiagoje gali lemti teigiamą tyrimo rezultatą, tačiau nebūtinai byloja apie esamą infekciją.
- Darbe naudoto dauginės patogenų detekcijos molekulinio tyrimo metu, vieno mėginio ištyrimui į mėginį dedama 21 pora patogenams specifinių pradmenų. Toks didelis pradmenų kiekis gali lemti nespecifinį pastarųjų prilipimą prie tiriamosios matricos ir klaidingai teigiamus tyrimo rezultatus. Panelės gamintojai ir tiekėjai įspėja, kad šio metodo rezultatai, nors ir yra nepamainoma pagalba laboratorijos darbuotojui ir gydytojui, privalo būti vertinami tik kompleksiskai, atsižvelgiant į paciento kliniką.

### 3.2.3 Parazitiniai pirmuonys

Molekulinio tyrimo metu, dvejuose iš mėginių nustatyta *G. lamblia* pirmuoniui specifinė DNR seka, tuo tarpu dar viename – *E. histolytica* specifinė nukleorūgštis seka.

*E. histolytica* sukeltų amebiazijų Lietuvoje kasmet registruojami tik pavieniai, įvežtiniai atvejai. Užkrėčiamųjų ligų ir AIDS centro duomenimis, 2014 m. Lietuvoje registruoti tik 9 amebiazės atvejai [40]. Vieno iš mėginių atliktame išmatų mikroskopiiniame tyrime, kuris laikomas “auksiniu standartu” parazitų identifikavime, aptiktos nepatogeninio pirmuonies *Endolimax nana* cistos. Molekuliniu metodu šiame mėginyje aptikta *E. histolytica* sukėlėjui specifinė nukleorūgštis seka. Atsižvelgiant į mažą *E. histolytica* sukeltų infekcijų paplitimą Lietuvoje buvo nuspręsta šį atvejį išnagrinėti detaliau. Pakartojus išmatų mikroskopijos tyrimą iš šaldytų išmatų, mėginyje buvo rastos tik *E. nana* cistos. Naujas to paties paciento išmatų mėginys buvo pristatytas į Vaikų ligoninės LDS pakartotiniam tyrimui dėl virusinių gastroenterito sukėlėjų. Naujasis mėginys, kryptingai ištirtas ir molekuliniu metodu (rasta *E. histolytica* sukėlėjui specifinė

nukleorūgšties seka). Sukelėjo patvirtinimui mėginys nusiųstas į referentinę laboratoriją (Nacionalinė Visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija), kur imunochromatografijos metodu nustatytas dizenterinės amebos antigenas. Šį atvejį galima paaiškinti keliais būdais:

1. Išmatose buvo ir *E. nana* ir *E. histolytica*. Literatūros duomenimis, didžiąją dalį išmatų mikroskopijos tyrimo sėkmės lemia tinkamas ėminio surinkimas ir laikymas. Tarp plačiai prižajstamų, tyrimo rezultatams įtaką darančių veiksnių – paciento vartojami medikamentai, ėmimo paėmimo laikas ir pristatymo į laboratoriją laikas [6,27]. Specifiniam dizenterinės amebos judesių stebėjimui būtinas kuo skubesnis (ne ilgesnis nei 20 min. po mėginio surinkimo) ištyrimo laikas, tačiau net ir laikantis šio reikalavimo, parazitinių pirmuonių identifikavimas teigiamuose mėginiuose tesiekia 58 – 72%. Tyrimo jautrumui padidinti rekomenduotina tirti bent tris to paties paciento mėginius, surinktus dešimties dienų laikotarpyje. Hiatt ir kolegų duomenimis, toks tyrimo protokolai leidžia sumažinti klaidingai neigiamų tyrimų kiekį ~22,7% [19].
2. Šiuo metu pasaulyje vyrauja nuomonė, kad mažas teigiamų mėginių kiekis išsivysčiusiose šalyse gali nulemti ir klaidingai neigiamais identifikuotų mėginių kiekio padidėjimą. Nepatogeninių parazitinių pirmuonių ir *E.histolytica* cistų diferenciacija yra subjektyvi ir priklauso nuo tyrėjo žinių, bei praktinės patirties. Gera diagnostika reikalauja nuolatinio praktinių įgūdžių tobulinimo. Pasaulyje kasmet fiksuojant vis mažiau amebiazės atvejų, ima trūkti patyrusių laboratorinės diagnostikos specialistų, o patyrusiems specialistams – nuolatinio praktinių įgūdžių taikymo diferencijuojant sukėlėjo ir nepatogeninių pirmuonių cistas [27].

### **3.3. Mišrios infekcijos nustatymo dažnis MDPD**

Mišri infekcija (dviejų ir daugiau patogenų) molekulinio metodu nustatyta 19-iolikoje mėginių. Tai sudarė 25,33% visų mėginių, kurie molekulinio metodu buvo identifikuoti kaip teigiami bent vienam iš panelėje esančių patogenų. Nustatytų mišrių infekcijų patogenų deriniai pavaizduoti 3.3 lentelėje.

3.3 lentelė. MDPD metodu nustatytų mišrių infekcijų deriniai	
Infekcijas sukėlusiu patogenų derinys	Nustatyta (abs. sk.)
<i>C. difficile</i> + <i>E. histolytica</i>	2
<i>E. coli</i> (ETEC) + <i>Salmonella</i> spp.	1
Adenovirus + Norovirus GII	1
<i>Campylobacter</i> spp. + <i>E. coli</i> (STEC)	1
Norovirus GII + <i>Salmonella</i> spp.	4
Norovirus GII + <i>Giardija lamblia</i>	1
Norovirus GII + <i>C. difficile</i>	3
Norovirus GII + <i>Campylobacter</i> spp. + <i>E. coli</i> O157	1
Adenovirus + <i>Salmonella</i> spp.	1
Norovirus GII + <i>E. coli</i> (STEC)	1
Adenovirus + <i>Campylobacter</i> spp.	1
<i>Salmonella</i> spp. + <i>C. difficile</i>	1
Rotavirus + <i>Salmonella</i> spp.	1

Ilgą laiką asmens sveikatos priežiūros specialistų tarpe vyravo nuomonė, kad žarnyno infekcijų atveju svarbu identifikuoti tik vieną “tikrąjį” patogeną. Pastaruoju metu atsiranda duomenų apie mišrių infekcijų svarbą patogenezės procese ir visų mėginyje esančių patogenų nustatymą optimaliausiam gydymo varianto parinkimui. Darbe naudojamas Luminex xTAG GPP rinkinys yra vienas iš nedaugelio įrankių, įgalinčiu laboratorinės medicinos profesionalą suteikti gydytojui visą informaciją apie paciento mėginyje esančius patogenus vieno tyrimo metu. Visų patogenų nustatymas šiuo metu laboratorinėje praktikoje paplitusiais metodais šią informaciją leistų suteikti per ~7 dienas, tuo tarpu darbe taikyta panelė leidžia šį laiką sutrumpinti iki ~6 valandų. Šis metodas leidžia suteikti gydytojui skubią ir visapusišką informaciją, suteikiant jam galimybę iš karto parinkti optimaliausią gydymo variantą [18,28,42].

## 4. IŠVADOS

1. Atlikus tyrimą Luminex xTAG GPP metodu, 54,3% mėginių (n=76) buvo identifikuoti kaip teigiami bent vienam iš panelėje esančių patogenų.
2. Tarp nustatytų sukėlėjų vyravo Noroviruso GII tipas (28%), *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ir *C. difficile* (atitinkamai 12%, 9% ir 7%).
3. Gauti rezultatai rodo mažą greitų imunochromatografinių testų norovirusinių infekcijų diagnostikoje jautrumą lyginant su MDPD.
4. Daugiau kaip trečdalis mėginių (36,8%), ištirtų MDPD metodu buvo teigiami infekcinio gastroenterito sukėlėjui, kurio diagnostikai nebuvo užsakytas klasikinis tyrimas.
5. Luminex xTAG GPP metodas yra tikslus, jautrus, greitas ir efektyvus nustatant platų infekcinių gastroenteritų sukėlėjų spektrą, diagnozuojant mišrios infekcijos atvejus ir gerinant vaikų ūminių gastroenterito diagnostiką.

## 5. SUMMARY

Scientific research for masters thesis “Comparison Of Conventional and Molecular Methods In Pediatric Diarrhea Diagnostics” was performed by Monika Miškinytė at Vilnius University Santariškių klinikos childrens hospital, with advisory supervision by scientific supervisor dr. (HP) Audronė Eidukaitė.

**The aim of this study:** To compare conventional methods used in routine infectious diarrhea diagnostics with a new, molecular multiplex pathogen detection panel. In order to carry out the aim of the study, the following tasks were set:

1. To identify infectious agents causing gastroenteritis that were previously unidentified by conventional methods using a molecular multiplex pathogen detection panel.
2. To evaluate the frequency and distribution of pathogens, detected by molecular multiplex pathogen detection panel.
3. To evaluate the advantages of Luminex xTAG GPP in routine laboratory diagnostics of infectious gastroenteritis.

**Objects and materials used:** Faecal samples, that were identified as negative to rotavirus, norovirus and adenovirus infections via conventional methods (n=138) of children under 5 years old were tested using the Luminex xTAG GPP (Luminex Molecular diagnostics Inc., Canada).

### Results:

1. 54,3% (n=76) of the tested samples were identified as positive to at least one of the Luminex xTAG GPP pathogens.
2. Norovirus GII was the leading pathogen identified (28%), followed by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *C. difficile* (12%, 9% and 7% respectively).
3. The results of this study clearly show a low sensitivity of immunochromatography based quick Norovirus tests, when compared to the Luminex xTAG GPP.
4. More than 1/3 of the tested samples (36,8%) were identified as positive to pathogens that were not tested via conventional laboratory methods due to it not being requested by a physician.

5. Luminex xTAG GPP is sensitive, fast and effective in determining wide range of pathogens causing infectious gastroenteritis, diagnosing co-infections and improving laboratory diagnostics of acute infectious gastroenteritis in children.

**Keywords:** infection, gastroenteritis, children, Luminex, xTAG



## 6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol. Elsevier B.V.*; 2013;56(3).
2. Antikainen J, Tarkka E, Haukka K, Siitonen A, Vaara M, Kirveskari J. New 16-plex PCR method for rapid detection of diarrheagenic *Escherichia coli* directly from stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(8).
3. Austin B. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4).
4. Baxt LA, Singh U. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(5).
5. Begum S, Quach J, Chadee K. Immune evasion mechanisms of *Entamoeba histolytica*: Progression to disease. *Front Microbiol.* 2015;6.
6. Branda JA, Lin TD, Rosenberg ES, Halpern EF, Ferraro MJ. A Rational Approach to the Stool Ova and Parasite Examination. 2006;02114.
7. Bula-Rudas FJ, Rathore MH, Maraga NF. *Salmonella* Infections in Childhood. *Adv Pediatr. Elsevier Inc;* 2015;62(1).
8. Carter GP, Rood JI, Lyras D. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease. *Nature.* 2010;1(1).
9. Chako CZ, Tyler JW, Schultz LG, Chiguma L, Beerntsen BT. Cryptosporidiosis in People: It's Not Just A bout the Cows. *J Vet Intern Med.* 2010;
10. Clark B, Mckendrick M. A review of viral gastroenteritis. 2004;
11. Cremon C, De Giorgio R, Barbara G, Glass RI, Parashar UD, Estes MK. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2010;362(6).
12. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Gro?? U. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol. Elsevier;* 2010;300(4).

13. Dekker JP, Frank KM. Salmonella, Shigella, and Yersinia. Clin Lab Med. Elsevier Inc; 2015;35(2).
14. Dennehy PH. Rotavirus Infection: A Disease of the Past? Infect Dis Clin North Am. Elsevier Inc; 2015;29(4).
15. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J. 2015;13(12).
16. Ferreira S, J?lio C, Queiroz JA, Domingues FC, Oleastro M. Molecular diagnosis of Arcobacter and Campylobacter in diarrhoeal samples among Portuguese patients. Diagn Microbiol Infect Dis. Elsevier Inc.; 2014;78(3).
17. Ghosh R, Uppal B, Aggarwal P, Chakravarti A, Jha AK, Dubey AP. A comparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of Campylobacter gastroenteritis in children. Ann Clin Lab Sci. 2014;44(1).
18. Halligan E, Edgeworth J, Bisnauthsing K, Bible J, Cliff P, Aarons E, et al. Multiplex molecular testing for management of infectious gastroenteritis in a hospital setting: A comparative diagnostic and clinical utility study. Clin Microbiol Infect. European Society of Clinical Infectious Diseases; 2014;20(8).
19. Hiatt RA, Markell EK, Ng E. How Many Stool Examinations are Necessary to Detect Pathogenic Intestinal Protozoa? Am J Trop Med Hyg. 1995;53(1).
20. Hookman P, Barkin JS. Clostridium difficile associated infection , diarrhea and colitis. 2009;15(Cdc).
21. Hyser JM, Estes MK. NIH Public Access. 2010;25(1).
22. Inc. BL. Lateral Flow Tests. Inf lapelis. 2008;
23. Leung DT, Chisti MJ, Pavia AT. Prevention and Control of Childhood Pneumonia and Diarrhea. Pediatr Clin North Am. 2016;63(1).
24. Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. Vol. 20, Journal of microbiology and biotechnology. 2010.
25. Luminex Molecular diagnostics Inc. Mokymų medžiaga. 2015;1–5.
26. Marie C, Petri Jr W a. Regulation of Virulence of Entamoeba histolytica. Annu Rev

- Microbiol. 2014;
27. Mchardy IH, Wu M, Shimizu-cohen R, Couturier R, Humphries M. Detection of Intestinal Protozoa in the Clinical Laboratory. 2014;52(3).
  28. Mengelle C, Mansuy JM, Prere MF, Grouteau E, Claudet I, Kamar N, et al. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *Clin Microbiol Infect. European Society of Clinical Infectious Diseases*; 2013;19(10).
  29. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Diarrhoea and vomiting caused by gastroenteritis: diagnosis, assessment and management in children younger than 5 years. In: Diarrhoea and vomiting caused by gastroenteritis: diagnosis, assessment and management in children younger than 5 years. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Press; 2009.
  30. Navaneethan U, Giannella R a. Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2008;5(11).
  31. Painter JE, Hlavsa MC, Collier SA, Xiao L, Yoder JS. Cryptosporidiosis surveillance - United States, 2011-2012. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2015;64(3).
  32. Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhoea. *Gastroenterology*. 2010;136(6).
  33. Pennington H. Escherichia coli O157. *Lancet. Elsevier Ltd*; 2010;376(9750).
  34. PSO. Rotavirus. World Health Organization; 2016.
  35. Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. Clostridium difficile infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group*; 2009;7(7).
  36. Schlenker C, Surawicz CM. Emerging infections of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol. Elsevier Ltd*; 2009;23(1).
  37. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(1).
  38. Shah N, Ldupont H, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(4).

39. Tebruegge M, Curtis N. Adenovirus: An Overview for Pediatric infectious Diseases Specialists. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(6).
40. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Sergamumo užkrečiamosiomis ligomis Lietuvoje 2014 m. apžvalga. 2014.
41. Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *J Clin Microbiol.* 2014;53.
42. Vocale C, Rimoldi SG, Pagani C, Grande R, Pedna F, Arghittu M, et al. Comparative evaluation of the new xTAG® GPP multiplex assay in the laboratory diagnosis of acute gastroenteritis. Clinical assessment and potential application from a multicentric Italian study. *Int J Infect Dis. International Society for Infectious Diseases;* 2015;34.
43. VULSKF Vaikų Ligoninė LDS. Mikrobiologinio išmatų pasėlio metodika. 2015;4–7.
44. WHO. ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS. 2007;
45. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(4).
46. World Health Organization. Diarrhoeal disease. Fact sheet No 330. [Internet]. 2013 [cited 2016 May 6]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>
47. Yoo J, Lightner AL. Clostridium difficile Infections: What Every Clinician Should Know. *Perm J.* 2010;14(2).
48. Zheng H, Sun Y, Lin S, Mao Z, Jiang B. Yersinia enterocolitica infection in diarrheal patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008;27(8).

## 7. PRIEDAI

### 7.1. Luminex xTAG GPP mokymų sertifikatas

