

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

**MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS**

**DIARĖJOS SUKĖLĖJŲ ANALIZĖ MOLEKULINĖS DIAGNOSTIKOS  
METODU**

Detection of Different Microorganisms Causing Diarrhoea by Real-Time PCR

**Magistrantė**

DONATA KINČIŪTĖ \_\_\_\_\_  
(parašas)

**Darbo vadovas**

DR. S.KIVERYTĖ \_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė

leidžiama ginti \_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

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

2017 m., Vilnius

## TURINYS

ĮVADAS .....	4
SUTRUMPINIMAI.....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	6
1.1. Infekcinio viduriavimo apibrėžimas .....	6
1.2. Infekcinės diarėjos epidemiologija.....	6
1.3. Infekcinės diarėjos klinikinės formos.....	9
1.4. Diarėjos etiologiniai veiksniai .....	11
1.5. Diarėjos sukėlėjai ir jų sukeltos infekcijos.....	11
1.5.1. Ūmios diarėjos bakteriniai sukėlėjai .....	12
1.5.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.5.1.2. <i>Shigella</i> spp.....	14
1.5.1.3. <i>Salmonella</i> spp.....	14
1.5.1.4. <i>Campylobacter</i> spp.....	16
1.5.1.5. <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	17
1.5.1.6. <i>Vibrio</i> spp.....	18
1.5.1.7. <i>Clostridium difficile</i> .....	19
1.5.1.8. <i>Aeromonas</i> spp.....	19
1.5.2. Ūmios diarėjos virusiniai sukėlėjai.....	20
1.5.2.1. Rotavirusas.....	20
1.5.2.2. Norovirusas .....	22
1.5.2.3. Adenovirusas .....	24
1.5.2.4. Astrovirusas .....	24
1.5.2.5. Sapovirusas .....	25
1.5.3. Ūmios diarėjos parazitiniai sukėlėjai .....	25
1.5.3.1. <i>Giardia lamblia</i> .....	25
1.5.3.2. <i>Entamoeba histolytica</i> .....	26
1.5.3.3. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	26
1.5.3.4. <i>Blastocystis hominis</i> .....	27
1.5.3.5. <i>Dientamoeba fragilis</i> .....	28
1.5.3.6. <i>Cyclospora cayetanensis</i> .....	28
1.6. Sukėlėjų laboratoriniai tyrimo metodai.....	28
1.6.1. Tradiciniai laboratoriniai metodai.....	29
1.6.2. Molekuliniai metodai. RL-PGR. ....	30

2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI.....	33
2.1. Tyrime naudoti rinkiniai.....	33
2.2. DNR, RNR išskyrimas iš pirminės medžiagos .....	34
2.3. Realaus laiko polimerazės grandininė reakcija.....	36
2.4. Duomenų apdorojimas ir analizė .....	38
3. TYRIMO REZULTATAI.....	38
3.1. Infekcinių sukėlėjų nustatymas .....	38
3.2. Diarėjos sukėlėjų pasiskirstymas taikant RL-PGR.....	41
3.2.1. Bakterijų pasiskirstymas .....	41
3.2.2. Virusų pasiskirstymas.....	42
3.2.3. Pirmuonių pasiskirstymas.....	44
3.2.4. Mišrios sukėlėjų grupės .....	44
3.3. Laboratorinių tyrimų rezultatų palyginimas .....	45
4. Rezultatų aptarimas.....	47
IŠVADOS.....	51
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	52
SANTRAUKA.....	58
SUMMARY.....	59
PADĖKA.....	60
PRIEDAI .....	61

## ĮVADAS

Infekcinio viduriavimo problema šiomis dienomis vis dar išlieka aktuali visame pasaulyje, užimdama antrą vietą pagal vaikų sergamumo ir mirties atvejų skaičių besivystančiose šalyse [1]. Kasmet skaičiuojama daugiau nei 1.5 bilijonų ūmios diarėjos atvejų, iš kurių daugiausia – sergantys vaikai iki penkerių metų amžiaus [2]. Infekcinis viduriavimas arba diarėja – pasireiškia tuštinimusi skystos konsistencijos išmatomis, kuris kaip papildomas simptomas būdingas daugeliui ligų. Tačiau dažniausia diarėjos priežastis – virškinamojo trakto infekcija virusais, bakterijomis, pirmuonimis [3]. Pediatrijoje, dėl vaikams nesusiformavusio imuninio atsparumo įvairiems mikroorganizmams, diarėjų atvejai yra labai pavojingi, kadangi laiku neatkreipus dėmesio į nenormalaus viduriavimo atsiradimą, sutrikimas gali pereiti į sudėtingą gastroenterito atvejį. Todėl, labai svarbu yra tiksliai ir greitai diagnozuoti infekcinio viduriavimo atsiradimo priežastį, nes tai pagerina klinikinę ir visuomeninę sveikatos priežiūrą [4]. Tačiau daugeliui infekcinės diarėjos sukėlėjų nustatymui yra taikomi skirtingi laboratoriniai metodai. Gydytojui yra sunku nuspręsti ar vieną, ar kelis tyrimus atlikti sukėlėjo radimui. Todėl yra kuriami įvairūs laboratoriniai rinkiniai, kuriais vienu metu galima aptikti platų gastroenterito sukėlėjų spektrą [3].

### **Darbo tikslas:**

Realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu ištirti ir išanalizuoti virškinamojo trakto infekcinius sukėlėjus VUL Santaros klinikų filialo Vaikų ligoninės pacientų išmatų mėginiuose.

### **Darbo uždaviniai:**

- 1) Nustatyti vaikų (0-17 m.) diarėjos sukėlėjus išmatų mėginiuose realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu;
- 2) Įvertinti nustatytų diarėjos sukėlėjų pasiskirstymo dažnį;
- 3) Atlikti laboratorinių metodų rezultatų palyginamąją analizę: palyginti molekulinio ir klasikiniais laboratoriniais metodais gautų diarėjos sukėlėjų tyrimų rezultatus.

## SUTRUMPINIMAI

AIDS (angl. *acquired immune deficiency syndrome*) – įgytas imuniteto nepakankamumo sindromas

CNS – centrinė nervų sistema

C<sub>T</sub> (angl. – *threshold cycle*) – slenkstinis ciklas

DNR – deoksiribonukleino rūgštis

EHEC – enterohemoraginė *E.coli*

EIEC – enteroinvazinė *E.coli*

EPEC – enteropatogeninė *E.coli*

ETEC – enterotoksinė *E. coli*

HUS – hemolizinis ureminis sindromas

N/A (angl. *Not Available*) - neaptikta

NoV – norovirusas

NOV – norovirusinė infekcija

NR – nukleorūgštys

NVI – norovirusinė infekcija

PGR – polimerazės grandininė reakcija

PSO – Pasaulio sveikatos organizacija

RBC (angl. *red blood cell*) – eritrocitai

RL-PGR – realaus lauko polimerazės grandininė reakcija

RoV – rotavirusas

RVI – rotavirusinė infekcija

ssRNA (angl. *single stranded RNA*) – vienvijė ribonukleino rūgštis

ULPKC (ULAC) – Užkrečiamųjų ligų profilaktikos ir kontrolės centras (Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras)

VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos

WBC (angl. *white blood cell*) – leukocitų skaičius

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Infekcinio viduriavimo apibrėžimas

Visi vaikai per pirmuosius trejus gyvenimo metus yra bent kartą viduriavę [5]. Viduriavimas yra vienas pagrindinių virškinimo trakto ligų sutrikimų. Nors tai yra švelni virškinamojo kanalo infekcijos liga, tačiau susijusi su jauno ir vyresnio amžiaus žmonių dideliu hospitalizacijų bei mirčių skaičiumi pasaulyje, ypač besivystančiose šalyse.

Viduriavimas – yra nemalonius pojūčius sukianti, natūrali organizmo reakcija į kenksmingas, nuodingas, organizmui neįprastas medžiagas. Jam būdingas – pasikeitęs tuštinimosi pobūdis, kai išmatos tampa nenormaliai skystos ir (ar) gausios, didėjant tuštinimosi skaičiui [6]. Dažniausiai pasitaikantį ūminį viduriavimą sukelia įvairios infekcijos: bakterijos, virusai, grybai, pirmuonys [3]. Infekciniai sukėlėjai vystosi skirtingose virškinamojo trakto – skrandžio, žarnyno vietose, todėl tai sukelia skirtingas simptomines klinikas [7]. Patogenų, kurie sukelia infekcijas, iš klinikinių požymių atpažinti beveik neįmanoma, tačiau pastebėtas tam tikras ryšys, jog *E.coli* ir rotavirusai infekuoja mažajame žarnyne ir sukelia didelės apimties vandeningą viduriavimą, pilvo skausmus, dujų kaupimąsi, svorio kritimą [8]. Tuo tarpu *Shigella* ir adenovirusai lokalizuojasi gaubtinėje žarnoje ir sukelia neintensyvų viduriavimą su silpnai išreikštais pilvo skausmais [7]. Kai kurios bakterijos gali netiesiogiai dirginti virškinamąjį traktą išskirtais toksiniais. Tokiu atveju diarėja pasireiškia suvalgius toksiniais užkrėsto maisto, net jei pačių mikroorganizmų į organizmą nepatenka. Šie toksinai vos per porą valandų nuo maisto suvartojimo paveikia žarnyno gleivinę, skirtingai nei įprastos bakterinės infekcijos metu.

## 1.2. Infekcinės diarėjos epidemiologija

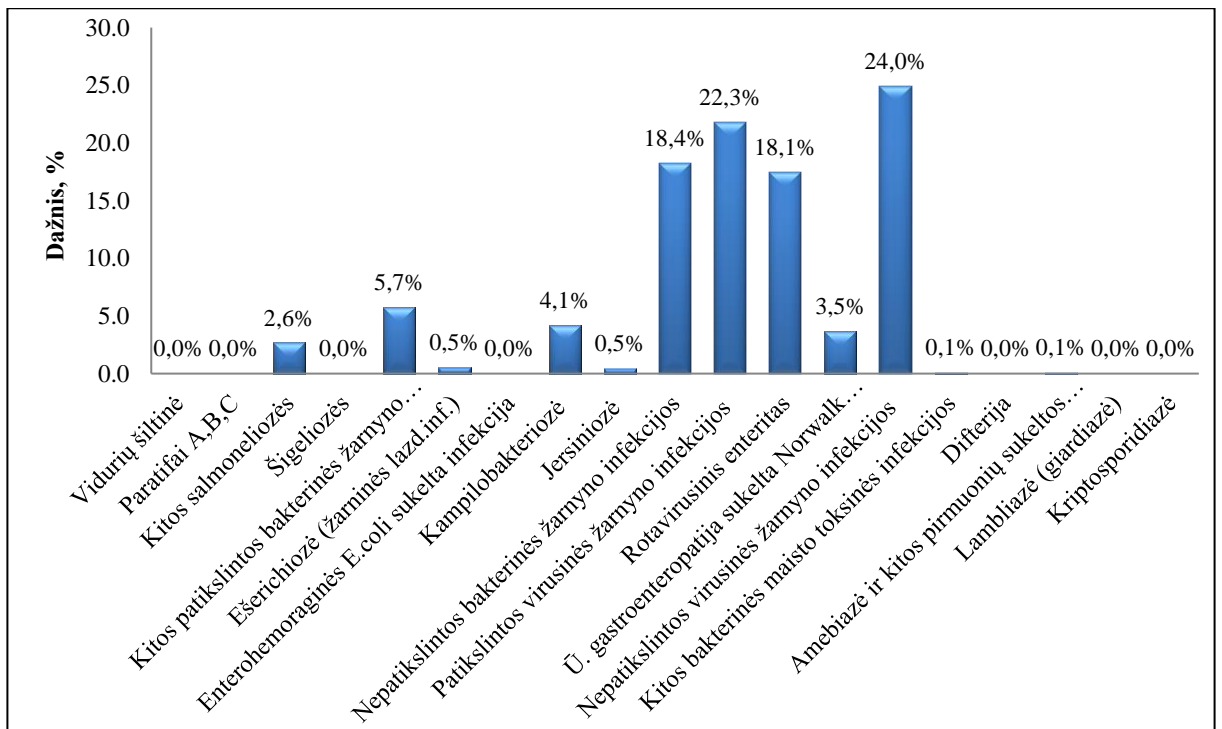
Virškinamojo trakto infekcijų pasekme esantis ūmus viduriavimas – yra antra svarbi medicinos problema po kvėpavimo takų infekcijų, bei viena dažniausiai pasireiškiančių ligų vaikų tarpe visame pasaulyje [1]. Ši būklė kelia didelį susirūpinimą, kadangi tai viena iš pirmaujančių vaikų, jaunesnių nei 5–erių metų, sergamumo ir mirties priežastis [9, 10]. Normos atveju viduriavimo dažnis vaikams, jaunesniems nei 3 metų amžiaus, pasitaiko 0,5-2 epizodų per metus [10]. Esant virškinamojo žarnyno infekcijai, epizodų skaičius ir trukmė prailgėja. Susidūrus su infekcine diarėja, organizmas bando pašalinti patogeniškus mikroorganizmus. To pasekoje atsiranda vandeningas, ilgai trunkantis, daug epizodų turintis viduriavimas, netenkama daug skysčių ir elektrolitų, todėl organizmo sistema patiria dehidrataciją, elektrolitų disbalansą [11].

Kasmet užregistruojama daugiau nei 1.5 bilijonus atvejų, susijusių su infekcine diarėja visame pasaulyje; iš jų įregistruojama apie 123 mln. klinikinių vizitų, 1.5-2 mln. mirčių, jaunesniems nei 5-erių metų amžiaus vaikams [1, 2, 3, 7, 10, 12]. Vaikų jaunesnių nei 5-erių metų amžiaus mirtingumas siekia beveik 18% [7]. Iš jų apie 80% - yra jaunesni nei 2-jų metų [1]. Vien Jungtinėse Amerikos Valstijose kasmet užfiksuojama daugiau nei 200 mln. viduriavimo atvejų, daugiausia vaikų tarpe [13]. Ikimokyklinio amžiaus ir pradinių klasių vaikų ūminis viduriavimas siejamas su ankstesniais viduriavimo atvejais, lėtiniais skrandžio ir žarnyno funkcijos sutrikimais [13].

Dauguma viduriavimą sukeliančių mikroorganizmų, pagal pasireiškimo dažnumą Europoje iki 5-erių metų amžiaus vaikams, pateikiami 1 lentelėje. Tačiau tai yra tik dalis atvejų, kurių metu infekcijos sukėlėjas iširtas. Vis tik, apie 60% viduriavimo atvejų, infekciją sukėlusio mikroorganizmo nėra randama (1 pav., 1 lentelė).

**1 lentelė.** Sukėlėjų dažnumas, sukeliantis Europos vaikų (0–5 m.) viduriavimą [14].

<b>PATOGENAS</b>	<b>DAŽNUMAS, %</b>
Rotavirusas	10–35
<i>Norovirusas</i>	2–20
<i>Campylobacter</i> spp.	4–13
<i>Adenovirusas</i>	2–10
<i>Salmonella</i> spp.	5–8
<i>EPEC</i>	1–4,5
<i>Yersinia</i> spp.	0,4–3
<i>Giardia</i> spp.	0,9–3
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0–3
<i>EAggEC</i>	0–2
<i>Shigella</i> spp.	0,3–1,4
<i>STEC</i>	0–3
<i>ETEC</i>	0–0,5
<i>Entamoeba</i> spp.	0–4
Nerastas sukėlėjas	45–60



**1 pav.** Vaikų (0-17 m.) infekcijų, kurioms būdingas diarėja, dažnumas Lietuvoje 2016 01 – 2017 04 laikotarpiu (n=26496) (pagal 2017m. ULAC pateiktus duomenis; iš ULAC pateikiamo užkrečiamų ligų sąrašo, parinktos tik tos infekcijos, analogiškos tyrime analizuojamiems mikroorganizmams) [15].

Viduriavimo atvejai, epideminiai diarėjos protrūkiai pasireiškia vartojamais mikroorganizmais, rečiau parazitais užterštą maistą, užsikrečiant tiesiogiai nuo sergančiojo ar sveiko parazitus nešiojančio individo. Daugiau negu 20 patogeninių mikroorganizmų – bakterijos ir jų išskiriami toksinai, virusai, pirmuonys – susiję su virškinamojo trakto sutrikimais [1, 16]. Pasitaiko sudėtingesnių – sudėtinių atvejų, kuomet identifikuojant diarėjos sukėlėją randami keli skirtingi mikroorganizmai, sukeltys ūmų viduriavimą. Nors kiekvieno mikroorganizmo veikimo mechanizmas virškinimo trakte, inkubacinis periodas, sukiamas ligos sunkumas skirtingas, tačiau viduriavimas sukiamas, kai mikroorganizmai sudirgina žarnyno gleivinę. Žarnynas tampa aktyvus, nereguliariai susitraukinėjantis, pradedęs normalią mikroflorinę pusiausvyrą, kartais pažeidžiamas iki opų susidarymo – kraujo atsiradimo išmatose. Kadangi viduriavimo atsiradimas gali būti daugelio ligų požymis, ar sukiamas skirtingų patogenų – klinikoje svarbu nustatyti viduriavimo priežastį, identifikuoti sukėlėją ir imtis tikslingo gydymo plano [17].

Bakterinę diarėją sukeliančios bakterijos yra svarbios besivystančiose šalyse, tačiau infekcijos paplitimas įvairiose šalyse skiriasi [7]. Bakterinės kilmės žarnyno infekcijos paplitusios tarp įvairaus amžiaus vaikų. Bakterijos lengvai plinta per užterštą maistą, vandenį, nesilaikant higienos rekomendacijų. Jos, kaip sukėlėjai, ypatingos, jog į organizmo vidų patekus tik jų išskiriamiems toksinams, gali būti sudirginta virškinimo trakto gleivinė ir



sukeliamas viduriavimo epizodas. Užsikrėtus bakterine infekcija ligos požymiai priklauso nuo ligos sunkumo ir ligonio amžiaus, dažniausiai išryškėja stiprūs apsinuodijimo požymiai – besikartojantis vėmimas, pilvo skausmai, karščiavimas arba šaltkrėtis, nuoseklus dehidratavimas [16]. Sergantysis tuština gleivėmis, pūlingomis išmatomis su kraujo priemaiša [10].

Virusiniai sukėlėjai yra pagrindinė nuolatinio ir sunkaus viduriavimo atvejų priežastis vaikų tarpe Europoje, kuri siekia 31-87% visų atvejų [11]. Virusinės kilmės gastroenteritas paplitęs visame pasaulyje, ypač tarp kūdikių ir mažų vaikų (iki 3 metų amžiaus). Dažniausiai virusinių viduriavimų priežastimi yra rotavirusas [10, 18, 19]. Pagrindinis infekcijos šaltinis yra žmogus – sergantysis arba viruso nešiotas. Esant virusiniam viduriavimui apsinuodijimo požymiai silpni. Viduriuojama 2-7 dienas, ligonis pirmomis dienomis karščiuoja, skauda raumenis ir galvą, pusei sergančiųjų prisideda ir peršalimo ligos požymiai (sloga, nestiprus kosulys). Galimas vėmimo ir kvėpavimo sutrikimo atsiradimas [10]. Ligonis ilgai tuština skystomis vandeningomis išmatomis, todėl tai turi įtakos sutrikti vaikų mitybai ir augimui [8].

Pirmuonių inicijuotos ligos taip pat prisideda prie infekcinių ligų paplitimo visame pasaulyje, labiausiai infekcijos paplitusios tropikų, subtropikų klimato juostose. Parazitiniai sukėlėjai, dažniausiai aptinkami vyresnio amžiaus vaikų tarpe besivystančiose šalyse [10, 20]. Išsivysčiusiose šalyse parazitų sukeltų viduriavimo epizodų dažniausiai pasitaiko vaikų globos centruose, vaikų lopšeliuose, vietose, kuriose nesilaikoma sanitarijos ir higienos taisyklių, „keliautojų diarėjos“ atvejais [14]. Liga prasideda tiesiogiai arba netiesiogiai, įvairioms parazitų stadijoms patekus į žmogaus organizmą [8]. Pirmuonys esantys išmatose į organizmą patenka per užkrėtus pirmuonimis maisto produktus, vandenį. Klinikiniai infekcijos požymiai gali būti lengvi, dėl sukkelto uždegimo gali prasidėti ūminis arba lėtinis viduriavimas. Vis tik gyvybei pavojingiausia, kai dėl uždelsto gydymo pirmuonys išplinta į kitus vidaus organus [8]. Parazitai patekę į virškinimo sistemą sukelia ne tik viduriavimą, bet ir skirtingus specifinius klinikinius požymius, kurie gali padėti tiksliau diagnozuoti sukėlėją.

### **1.3. Infekcinės diarėjos klinikinės formos**

Pagal tuštinimosi dažnį, išmatų konsistenciją bei kiekį per parą išskiriami dviejų tipų diarėjos pobūdžiai, pateikiami apibendrintoje 2 lentelėje.

## 2 lentelė. Viduriavimo pobūdis.

Požymis	Enteritinis	Kolitinis
Išmatų kiekis	Didelis	Nedidelis, kartais vien gleivės ir kraujas
Spalva	Šviesi	Tamsi
Konsistencija	Vandeningos, putotos, riebios	Drebučių pavidalo
Kvapas	Dvokia	Retai dvokia
Kraujas išmatose	Matomo nėra	Dažnai
Gleivės išmatose	Nėra	Dažnai
Nesuvirškinto maisto likučiai	Mėsos skaidulos, riebalų lašeliai	Nebūdingi
Tuštėjimas dažnis	Nedidelis	Didelis
Tenezmai	Nebūdingi	Būdingi
Skausmo lokacija	Apie bambą ar dešiniojoje apatinėje pilvo dalyje	Kairiojoje apatinėje pilvo dalyje ar virš gaktinės sąvaržos
Skausmo pobūdis	Protartinis ar intermisinis	Spazminis, bukas, palengvėjantis pasituštinus

**Gastroenteritas** – skrandžio-žarnyno sutrikimas lydimas skirtingų infekcinių priežasčių, vienas iš dažniausių sergamumo ir mirtingumo priežasčių visame pasaulyje [12, 21]. Dažniausiai ir sunkiausiai gastroenteritu serga vaikai iki 3 metų amžiaus [14]. Ūminiam gastroenteritui būdinga staigi simptomų pradžia, pakitusi išmatų konsistencija (laisvos ar skystos), viduriavimas su išreikšta žarnų peristaltika (viršijantis 3 kartus paros laikotarpyje), su vėmimu, esant karščiavimui ar be jo (ūminė dehidratacija) [5, 10]. Paprastai viduriavimas tęsiasi iki 7 dienų ir netrunka ilgiau 14 dienų [5, 10, 22]. Sergantiesiems ūmiu gastroenteritu apie 16,8–33% pacientų identifikuojamas bakterinis sukėlėjas, taip pat aptinkami virusiniai (apie 75% visų atvejų), parazitiniai sukėlėjai [12, 16, 20, 21]. Ūmaus gastroenterito atveju dažniausiai aptinkami norovirusas (sudarantis daugiau nei pusę visų klinikinių atvejų), rotavirusas, adenovirusas, astrovirusas ir kiti virusai [21]. Patogenams aptikti taikytini klasikiniai ir molekuliniai laboratoriniai tyrimai [23]. Tačiau, net ir panaudojus visus galimus laboratorinius infekcijų diagnostikos metodus, 20-40% atvejų diarėjos priežastis vis tiek lieka nenustatyta [6].

**Enterokolitas** – uždegiminė storosios ir plonosios žarnos liga. Galimos dvi enterokolito formos: ūmaus enterokolito atvejais pažeidžiama pažeidžiama žarnyno gleivinė, lėtinio enterokolito formoje, uždegimas lėtai skverbiasi į žarnyno sienelės ir gali sukelti rimtų virškinimo sistemos problemų. Enterokolito atsiradimo priežasčių yra ne viena – dėl imuninės sistemos nusilpimo, intensyvaus antibiotikų vartojimo, sutrikusios hormoninės organizmo pusiausvyros, streso. Tačiau vaikams dažniausiai enterokolitas išsivysto dėl bakterinės kilmės žarnyno infekcijų, pirmuonių patekimo į žarnyną, disbiozės atvejais. Pagrindiniai ligos simptomai – aštrus pilvo skausmas, suintensyvėjantis po valgio, aktyvaus fizinio krūvio;

viduriavimo simptomai, kurie gali pasireikšti pakaitomis su vidurių užkietėjimu; bendras organizmo nuovargis; dehidratacija; organizmo intoksikacija.

#### **1.4. Diarėjos etiologiniai veiksniai**

Nepaisant mikroorganizmų, sukeliančių ūminį viduriavimą, didelę reikšmę turi įvairūs predisponuojantys faktoriai, virškinamojo trakto sutrikimui ir letaliai būklei išsivystyti.

Viduriavimą gali sukelti: dažnas vaikų maitinimas iš užterštų buteliukų, kuriuos labai sunku gerai išplauti; nevalytos upės, šaltinio ar tvenkinio vandens gėrimas; rankų priežiūros higienos nepaisymas (kai jos neplaunamos prieš valgi); lėkščių, puodelių, šakučių, šaukštelių ir šaukštų plovimas tik vandeniu arba iš viso jų neplovimas; tuštinimasis ne išvietėje (ekskrementų mėtymas kur papuola) [10]. Taip pat, kiti veiksniai, kaip maitinimo krūtimi trukmė, individo amžius, svoris, gyvenamoji geografinė zona, sanitarinės sąlygos, netinkamas gydymo planas turi įtakos žarnyno infekcijoms atsirasti [1, 7, 12, 13, 24]. Didelės įtakos turi pašalinis vartojamų antibiotikų poveikis, kuris sunaikina normalią žarnyno mikroflorą ir sudaro palankesnes sąlygas enteropatogenams pažeisti žarnų gleivinę. Atsiradę viduriavimo epizodai dažnai yra įvairių ligų, tokių kaip: virškinamojo trakto intoksikacija maistu, cukrinio diabeto, kasos ligų, hipertirozės, alergijos maistui (laktozės netoleravimo), metabolinio sutrikimo, uždegiminės žarnų ligos, malabsorbcijos sutrikimo – klinikinis simptomas.

Platus kiekis patogenų, galinčių sukelti diarėją, ir aplinkos sąlygų inicijuotas virškinamo trakto sutrikimas, drauge sudaro sudėtingą diagnostikos procesą. Todėl vyksta įvairūs mikrobiologiniai tyrimai, susiję su infekcinių sukėlėjų tyrimais. Identifikuoti tikslų enteropatogeninį sukėlėją svarbu norint paskirti tinkamą gydymo kryptį, vakciną ir kontroliuoti epideminius ir endeminius diarėjos atvejus. Viduriavimas nėra lengvas negalavimas, netinkamai gydomas jis gali komplikuotis gyvybei pavojinga organizmo dehidratacija, elektrolitų deficito ir balanso sutrikimu, inkstų veiklos sutrikimais, bakteremija, sepsiu, šoku ar net mirtimi [25].

#### **1.5. Diarėjos sukėlėjai ir jų sukeltos infekcijos**

Vos pasirodžius pirmiems gastroenterito/enterokolito ligos požymiams svarbu kuo tiksliau diferencijuoti sukėlėją. Didelis karščiavimas ( $>40^{\circ}\text{C}$ ), kraujas išmatose, pilvo skausmas, CNS įtraukimas – leidžia įtarti bakterinį sukėlėją. Vėmimas, kvėpavimo sutrikimai (respiratoriniai simptomai) labiau susiję su virusinės ligos etiologija [14]. Bendri klinikiniai

simptomai tik leidžia įtarti tariamai galimą virškinimo trakto pažeidimą, tačiau net ir esant panašioms klinikiniam simptomams neparinkus tinkamo gydymo, mikroorganizmai gali sukelti netikėtas komplikacijas.

Patogenų, sukeliančių diarėją, įvairovė, gali skirtis priklausomai nuo geografinės padėties ar metų sezoniškumo. Nors dauguma mikroorganizmų paplitę visame pasaulyje, tačiau tam tikri sukėlėjai (pvz.: *Vibrio cholerae*, pirmuonys) paplitę specifinėse geografinėse zonose. Vaikų ūmios diarėjos atveju, vasaros ir lietingu laikotarpiu 10-20% klinikų identifikuojama diarėja sukelta bakterinio sukėlėjo, o virusinio pobūdžio diarėja 80% atvejų – pasireiškia žiemos periodu (įtraukiant sezonines ir regionines patogenų variacijas, dažniausiai pasitaikantys yra rotavirusas, norovirusas, adenovirusas, astrovirusas) [7, 11, 24]. Parazitiniai sukėlėjai Europoje dažniausiai sutinkami pavieniais atvejais, kurie susiję su asmenimis grįžusiais iš tolimų kelionių.

### **1.5.1. Ūmios diarėjos bakteriniai sukėlėjai**

#### **1.5.1.1. *Escherichia coli***

*E.coli* – gramneigiama, lazdelės formos bakterija. Saprofitinės *E.coli* padermės randamos šiltakraujų organizmų apatinėje žarnyno dalyje (endotermai). Didžioji dalis *E.coli* padermių nėra kenksmingi, tačiau kai kurie serotipai yra patogeniški ir gali sukelti sunkias virškinimo, šlapimo takų infekcijas [8].

Diarėjų patologijoje didelę reikšmę turi keturios pagrindinės patogeninės *E.coli* padermės: enterohemoraginė *E.coli* (EHEC), enterotoksigeninė *E.coli* (ETEC), enteroinvazinė *E.coli* (EIEC) ir enteropatogeninė *E.coli* (EPEC), kurios pasižymi skirtingais patogeniškumo veiksniais, virulentiškumo savybėmis [26, 27].

Enterohemoraginė *E.coli* (EHEC) kelia didelį PSO susirūpinimą dėl sukeliama didelio vaikų sergamumo ir mirtingumo atvejų skaičiaus, ypatingai ekonomiškai besivystančiose šalyse [26]. EHEC grupei priklauso virš 100 enterotoksinus gaminančių *E.coli* serologinių tipų. Vienas pavojingiausių toksinų, sukeliančių gastroenterito protrūkius, yra Shiga toksinas (*stx*), kurį išskiria EHEC ir *Shigella* spp. Taip pat EHEC priklauso *E.coli* O157 serologinis tipas, sukeliantis sunkius ūminės diarėjos klinikinius atvejus [28]. EHEC sukelia hemoraginę kolitą (diarėja su krauju), mažiems vaikams gali sukelti intravaskulinę hemolizę, hemolizinį ureminį sindromą (HUS; sunkiausia klinikinė EHEC infekcijos forma), ūminį inkstų funkcijos nepakankamumą [4, 25]. Išmatos gali būti su kraujo priemaišomis (nuo pavienių eritrocitų iki viduriavimo krauju), leukocitų neaptinkama, EHEC išmatų mėginyje gali būti labai mažai [11]. EHEC daugiausia užsikrečiama vartojant užterštą galvijų maistą,

nevirintą pieną. Infekcija plinta užterštu geriamu ir atviru vandens telkinių vandeniu, galimas užsikrėtimas per žmogus žmogui sąlytį. Sukėlėjas atsparus rūgščiai, todėl gali išgyventi fermentiniais būdais apdorotame maiste, marinuotose daržovėse [26].

Enterotoksigeninė *E.coli* (ETEC) labiausiai paplitusi tarp keliautojų į silpno ekonominio lygio šalis („keliautojų diarėjos“ ir choleros atvejai). ETEC sukėlėjai sukelia profuzinę vandeningą diarėją be kraujo ir gleivių [26]. ETEC prisitvirtinusi prie žarnyno ląstelių receptorių gamina karščiui atsparų (TS) ir karščiui neatsparų (TL) arba abu enterotoksinius, kurie sukelia viduriavimo atvejus [8]. Šios grupės *E.coli* sukeliama infekcija plinta per maistą, užterštą vandenį. Pagrindinis infekcijos šaltinis žmogus, todėl galimas infekcijos perdavimas per žmogus žmogui sąlytį.

Enteroinvazinės *E.coli* (EIEC) sukeliamai infekcijai būdingi stiprūs pilvo skausmai, vandeningas viduriavimas su krauju, karščiavimas, bendras silpnumas. Klinikiniai požymiai panašūs į šigeliozės [26]. Kai kurių ligonių išmatose gali būti randami eritrocitai, gleivės. EIEC infekcija gali būti įtariama radus išmatose daug leukocitų (diagnozė patvirtinama bakteriologiniais, serologiniais bei imunologiniais tyrimais.) [26]. Daugiausia užsikrečiama per maistą nesilaikant higienos reikalavimų, vienas iš „keliautojų diarėjų“ sukeliančių mikroorganizmų [8].

EPEC (enteropatogeninė *E.coli*) vienas dažniausių patogenų sukeliančių diarėją vaikams iki 10-ties metų amžiaus, tačiau dažniausiai serga 0–3 metų amžiaus vaikai [1, 12, 16]. Liga pasireiškia vandeninga diarėja su gleivėmis, karščiavimu, dehidracija [26]. Dažniausiai sukėlėjas identifikuojamas ekonomiškai besivystančiose šalyse, nors paplitimas varijuoja priklausomai nuo populiacijų, amžiaus grupių, diagnostikos kriterijų [1]. Infekcija plinta per kūdikių maistą, namų reikmenis, esant netinkamai higienai.

### **Ešerichiozė**

Ešerichiozė – ūminė infekcinė žarnyno liga, sukeliamą patogeninės *E.coli* ir pasireiškianti gastroenteritu, enterokolitu, retai – bakteriemija ar įvairių organų pažeidimu [25]. Priklausomai nuo sukėlėjo, liga gali komplikuotis hemolizinės uremijos sindromu (HUS) arba trombozine trombocitopenine purpura (TTP) [26]. Lietuvoje 2015 m. užregistruota 6% visų patikslintų bakterinių žarnyno infekcinių ligų. Inkubacinis patogeninės *E.coli* laikotarpis trunka 1–6 dienas [25]. Liga prasideda staiga, gali pakilti temperatūra, sutrikti miegas. Viduriavimas gausus geltonos, kartais šviesiais žalsvos ar oranžinės spalvos išmatomis. Išmatose gali pasirodyti gleivių, kraujo.

### 1.5.1.2. *Shigella* spp.

Kai kurie mokslininkai nurodo, jog tai vienas pagrindinių patogenų sukeliančių kraujingą viduriavimą [12]. Šigelės – tai gramneigiamos, lazdelės formos, sporų neformuojančios, fakultatyvinės anaerobinės, artimos *E.coli* bakterijos. Atsižvelgiant į šigelių rūšį, kuri sukelia infekciją ir žmogaus sveikatos būklę – šios bakterijos gali sukelti sunkią arba lengvą viduriavimo ligą [8]. Šigelių rūšys pasižymi skirtingu virulentiškumu: *Shigella sonnei* – dažniausiai aptinkamas serotipas išsivysčiusiose šalyse (taip pat ir Lietuvoje), sukelia lengvos formos infekciją; *Shigella flexeneri* ir *S.boydii* – sukelia sunkią ligos formą; *S.dysenteriae* – pavojingiausia šigelių rūšis dėl išskiriančio egzotoksino [1, 8, 12].

#### **Šigeliozė**

Ūminė infekcinė žarnyno liga, dažniausiai aptinkama 4-6 metų amžiaus sergančiųjų grupėje. Šigeliozė dažnesnė besivystančiose šalyse, kur labai didelis gyventojų tankis ir prastos higieninės sąlygos. Ligai būdingas pilvo skausmas, viduriavimas su kraujo ir gleivių (pūlių) priemaiša, karščiavimas, spazminiai pilvo skausmai (tenezmai). Infekcijos šaltinis yra sergantis žmogus, kuris sukėlėjęs išskiria į aplinką su išmatomis. Bakterijos plinta per užterštą maistą, vandenį, oraliniu-fekaliniu būdu. Šigelės yra pakankamai atsparios išorinės aplinkos poveikiui, o infekcijai atsirasti užtenka mažo bakterijų kiekio, todėl šie mikroorganizmai yra prisitaikę lengvai plisti nesilaikant asmens higienos ir sanitarijos reikalavimų.

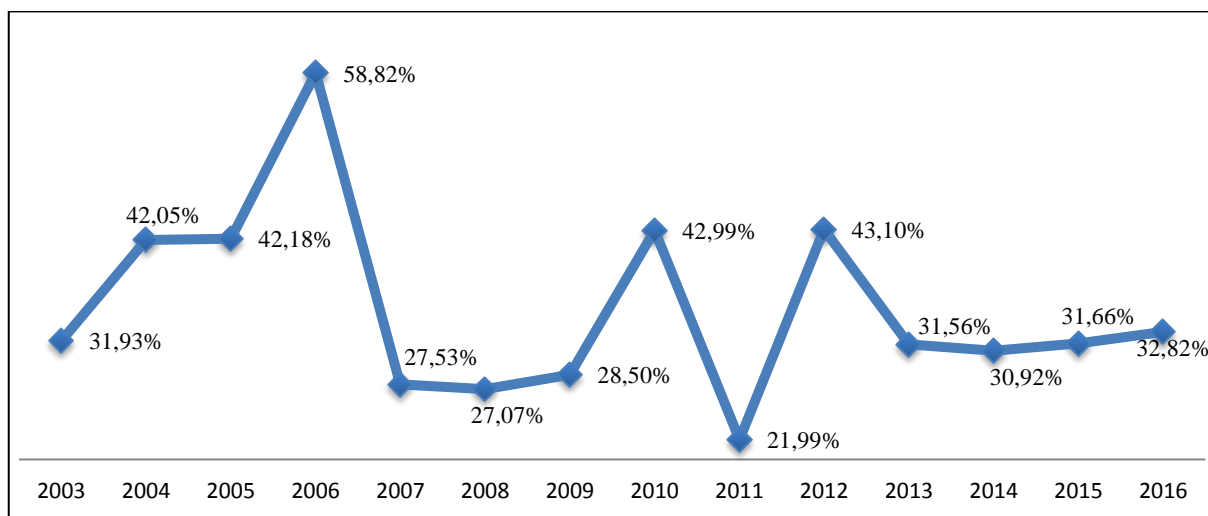
### 1.5.1.3. *Salmonella* spp.

*Enterobacteriaceae* šeimai, *Salmonella* genčiai priklausančios bakterijos yra gramneigiamos, žiūželių pagalba judančios lazdelės, fakultatyvūs intraląsteliniai mikroorganizmai nesudarantys sporų ir kapsulių. Bakterijos patekusios į organizmą sukelia įvairaus sunkumo ligos požymius, kurie priklauso nuo salmonelių rūšies serotipo ir žmogaus sveikatos būklės [29]. Iš daugiau nei 2500 žinomų salmonelių serotipų – *S.typhi* ir *S.paratyphi* yra patogeniškos tiek žmogui, tiek gyvūnams [29].

#### **Salmoneliozė**

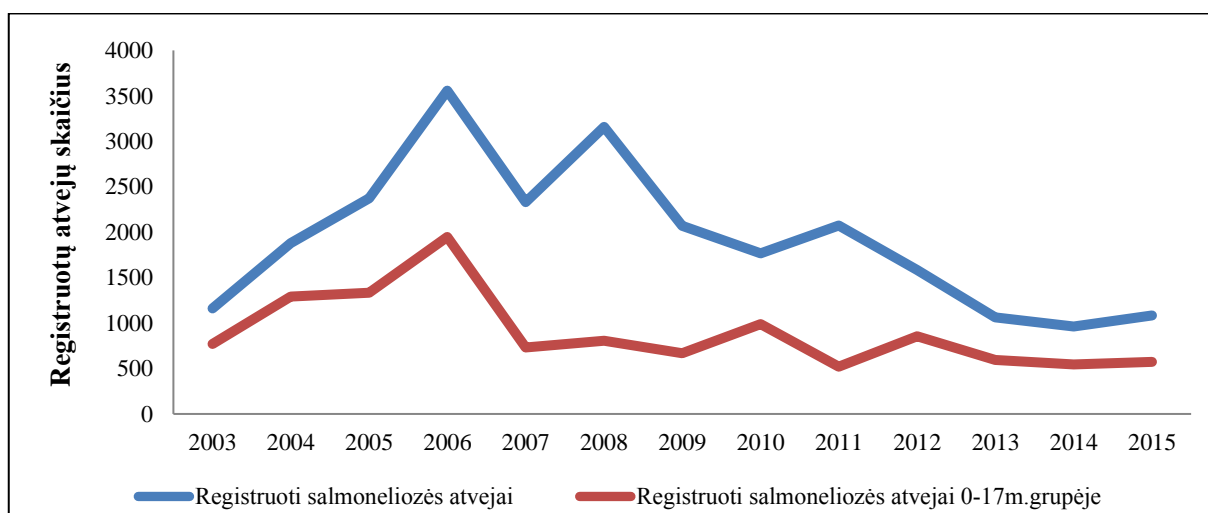
*Salmonelių* genties sukeliama infekcija dažniausiai serga vaikai iki 5 metų. Tai išsivysčiusiose šalyse dažnai pasitaikanti infekcija, kuria susergama patekus salmonelės bakterijai į organizmą su maistu. Pagal ULAC duomenis, 2006 metais didžiausias sergamumas Lietuvoje iš visų patikslintų vaikų bakterinių žarnyno infekcinių ligų sudarė

salmoneliozės infekcijos atvejai – 58%, tuo tarpu 2015 metais salmoneliozė vaikų tarpe (0-17 m.) sudarė 31,66% (2 pav.).



**2 pav.** 2003-2016 metų laikotarpyje Lietuvoje identifikuoti salmoneliozės atvejai (%) vaikų 0-17m. amžiaus tarpe, iš visų patikslintų žarnyno bakterinių atvejų (pagal 2003-2016 m. ULAC pateiktus duomenis).

Nors nuo 2006 metų sergamumas salmonelioze Lietuvoje turėjo nežymią tendenciją mažėti (3 pav.), tačiau salmoneliozė vis dar yra dažniausia per maistą plintanti zoonozė Lietuvoje.



**3 pav.** 2003-2015 metais Lietuvoje registruoti visi salmoneliozės atvejai ir salmoneliozė vaikų tarpe. pagal 2003-2015m. ULAC pateiktus duomenis).

*Salmonella* genties bakterijos yra pagrindinė per maistą plintančių (zoonozė) ligų priežastis, perduodamos žmogui dažniausiai per užterštus gyvulinės kilmės, mėsos, kiaušinių, pieno produktus, rečiau geriant užterštą vandenį. Sveikiems žmonėms ligą gali sukelti daugiau nei 1 mln. bakterijų [29]. Po bakterijos patekimo į organizmą 12-72 valandų

laikotarpyje pasireiškia infekcijai būdingi pirmieji simptomai: karščiavimas (rodo, kad infekcija yra išplitusi), pilvo skausmas, viduriavimas, pykinimas, dėl kurių ligonis netenka daug skysčių. Jei vyrauja gastroenteritas, būdinga palaiptinė pradžia, pilvo skausmai, pykinimas, vėmimas viduriuojama 5-10 kartų per parą gausiomis vandeningomis su nesuvirškintais maisto gabaliukais, aštraus kvapo išmatomis [25]. Liga tęsiasi 2-7 paras. Gastroenterokolitas (kolitas) būdingas vaikams iki 1 metų. Gastroenterokolito inkubacinis laikotarpis – 2-5 dienos. Prasideda staiga, daugiausia simptomų atsiranda po 2-4 dienų [19]. Išmatos būna su gleivių, kraujo priemaišomis, tamsiai žalios spalvos, putotos. Galimas karščiavimas, užsitęsiantis iki 3-7 dienų. Be gydymo dauguma žmonių pasveiksta 4-7 dienų laikotarpyje. Jauno ir vyresnio amžiaus žmonėms, bei patekus bakterijoms į kraujotaką (ligoniams turintiems imuninės sistemos sutrikimų) ligos simptomai tampa sunkūs ir pavojingi gyvybei.

#### 1.5.1.4. *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* spp. – dažna žarnyno infekcinių ligų priežastis [22]. Kampilobakterijos yra mikroaerofilinės, gramneigiamos lazdelės, sudarančios S raidės formos kolonijas [8]. Kampilobakterijų žinoma 17 rūšių, tačiau 6 iš jų: *C.jejuni*, *C.coli*, *C.lari*, *C.upsaliensis*, *C. concisus*, deguonį toleruojančios kampilobakterijos (*Arcobacter*) laikomos pagrindinėmis bakterinio enterokolito sukėlėjomis tiek išsivysčiusiose, tiek pramoninėse šalyse [22]. Dažniausiai užsikrėtimas šiuo patogenų siejamas esant pažeistai imuninei organizmo sistemai.

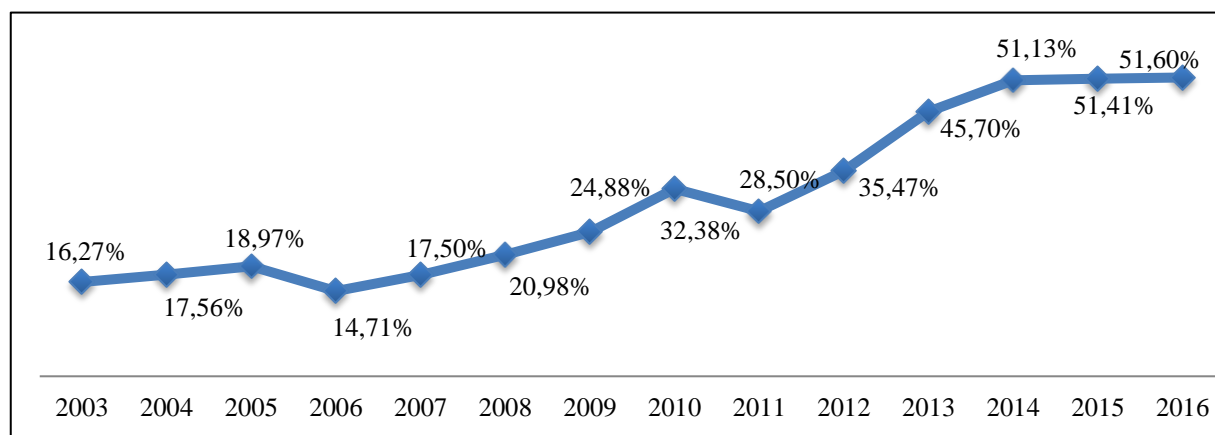
#### **Kampilobakteriozė**

Kampilobakteriozė – per maistą plintanti infekcinė liga (zoonozinė infekcija), susijusi su žaliavalgyste, nepakankamai apdorotais paukštienos, gyvulinės mėsos, pieno produktais, jūros gėrybėmis [16]. Užterštas vanduo *Campilobacter* spp. bakterijomis, taip pat gali būti infekcijos šaltiniu. Nors sergančiojo išmatose randama infekcijos sukėlėjų, tačiau infekcijos plitimas nuo žmogaus žmogui nėra būdingas [30].

*Campylobacter* spp. sukėlėjas dažniausiai aptinkamas 1-6 metų amžiaus vaikų grupėje [16]. Šio patogeno sukelta infekcija egzistuoja lengvos formos, tačiau užsitęsusi infekcijai padidėja tikimybė susidurti su bakteriemija ir enteritu [16]. Slaptas ligos laikotarpis gali trukti iki dešimties dienų, dažniausiai pasireiškia praėjus 2–5 dienoms po užsikrėtimo. Liga prasideda viduriavimu, būdingas pykinimas, vėmimas, priepuoliniai pilvo skausmai. Šie simptomai gali trukti iki 6 dienų. Gali pasireikšti mialgija (stiprus skausmas raumenyse), galvos skausmas [25]. Ekstraintestinei ligos formai būdingas karščiavimas, šaltkrėtis,



prakaitavimas naktį, kūno svorio mažėjimas [25]. Kartais pasireiškia gelta, hepatomegalija, viduriavimas, sutrinka sąmonė [25]. Bakterijos kartu su išmatomis išskiriamos visą viduriavimo laiką. Jei ligonis negydomas antibakteriniais vaistais, bakterijos gali būti išskiriamos iki 7-ių savaičių. Kampilobakteriozė gali komplikuotis sepsiu, kepenų, kasos uždegimu, todėl infekcija labai pavojinga mažiems vaikams, senyvo amžiaus asmenims, bei suaugusiems sergantiems papildomomis ligomis (kaip AIDS) [30, 31].



**4 pav.** 2003-2016 metų laikotarpyje Lietuvoje identifikuota kampilobakterija (%) vaikų 0-17m. amžiaus grupėje, iš visų patikslintų žarnyno bakterinių atvejų (pagal 2003-2016m. ULAC pateiktus duomenis).

Remiantis ULAC duomenimis, 2016 metais Lietuvoje vaikų (0-17 m.) grupėje *Campilobacter* spp. sukelta infekcija registruota 51% visų patikslintų vaikų tarpe bakterinių žarnyno infekcinių ligų (4 pav.)

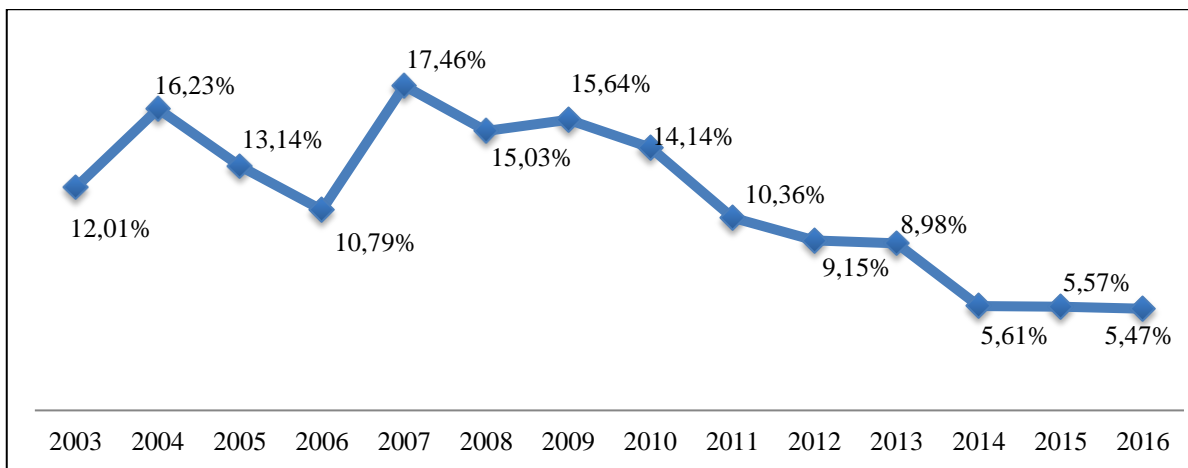
#### 1.5.1.5. *Yersinia enterocolitica*

*Yersinia enterocolitica* – gramneigiamos bakterijos, priklausančios enterobakterijų grupei. *Yersinia* genties bakterijos išsiskiria iš kitų bakterijų ne tik gebėjimu parazituoti ir daugintis, bet ir išlikti ilgą laikotarpį gyvybingomis. Tai bakterijos, kurios dauginasi net 2–4 °C temperatūroje, esant drėgnom ir šaltom aplinkos sąlygom jos ilgai išlieka gyvybingomis neprarasdamos patogeniškumo, dėl šio fakto sergamumo dažnis intensyvesnis žiemos periodu.

#### **Žarnyno jersiniozė**

Tai ūminė žarnyno infekcinė liga aptinkama dažniausiai 1–6 metų amžiaus grupėje, kuriai būdinga intoksikacija, virškinimo sistemos, kepenų, sąnarių ir kitų organų pažeidimas [16, 25]. Infekcijos šaltinis – graužikai, raguočiai, kiaulės, šunys, katės (visi gali būti sveiki nešiotojai), žmogus (sergantis nešiotojas) [25]. Užsikrečiama alimentiniu,

kontaktiniu būdu, per maistą. Jersinioze didžiausią riziką užsikrėsti turi maži vaikai, vyresni asmenys ir asmenys, kurių sumažėjęs organizmo atsparumas. Mažų vaikų (0–3 metų) jersiniozei būdinga gastrointestinė ligos forma: liga prasideda staiga, pakyla aukšta temperatūra, pasireiškia intoksikacijos simptomai, viduriuojama 3-15 kartų per parą (gali būti kraujo priemaišų). Šie simptomai gali tęstis 4-7 dienas. Sunkiai ligos formai užsitęsus, galima žarnos perforacija, invaginacija, nepraeinamumas.



**5 pav.** 2003-2016 metų laikotarpyje Lietuvoje identifikuota jersinijos bakterijos sukelta infekcija(%) vaikų 0-17m. amžiaus tarpe, iš visų patikslintų žarnyno bakterinių atvejų (pagal 2003-2016m. ULAC pateiktus duomenis).

#### 1.5.1.6. *Vibrio spp.*

*Vibrio spp.* – gramneigiamos, kablelio formos bakterijos, gyvenančios natūraliuose sūraus vandens ir jūrinio vandens telkiniuose. Aptinkamos trys patogeninės bakterijos rūšys: *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus* – sukeliančios vandeningo pobūdžio viduriavimą, lydimą pilvo skausmų, pykinimo, vėmimo ir karščiavimo.

#### **Cholera**

Ūminė virškinamojo kanalo infekcija sukelta *Vibrio cholerae*, labai pavojinga gyvybei, kuri kasmet sukelia keletą milijonų diarėjos atvejų, kai kurie jų baigiasi mirtimi. Dažniausia infekcijos patekimo priežastis į organizmą susijusi su telkinio vandens ar jūros gėrybių, nešvaraus geriamojo vandens vartojimu. Cholera susergama ir išsivysčiusiose šalyse, tačiau dėl griežtų higienos reikalavimų infekcija neišplinta [8]. Klinikiniams infekcijos požymiams būdingas gausus viduriavimas skystomis nekraujingomis išmatomis („ryžių nuoviro išmatos“), vėmimas. Infekcijos metu netenkami dideli kiekiai skysčių, tai sutrikdo skysčių ir elektrolitų pusiausvyrą – sukeliama dehidracija, metabolinė acidozė,

hipokalemija, hipovoleminis šokas [11]. Negydant choleros, miršta apie 50% pacientų, atkūrus skysčių – elektrolitų pusiausvyrą, mirtingumas nesiekia net 1% [8].

#### 1.5.1.7. *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* – gramteigiama, sporas gaminanti anaerobinė bakterija, sukianti virškinamojo trakto infekciją su viduriavimu ir kolitu [14]. *C.difficile* sveiko suaugusio žmogaus normalioje žarnyno mikrofloroje sudaro 0,01% – 0,001%, tačiau antibiotikus vartojantiems, bakterijų kiekis padidėja iki 40% [32]. Nors padidėjus bakterijos kolonizacijai žarnyne nėra sukeliama infekcijos požymiai, tačiau tai dažnas hospitalinių infekcijų (diarėjų) sukėlėjas [14]. *C. difficile* dauginantis storajame žarnyne yra gaminami toksinai, kurie antibiotikų fone sutrikdo žarnyno bakterijų pusiausvyrą, sukelia įvairaus sunkumo viduriavimo epizodus [32]. Bakterijai palanki terpė storajame žarnyne dauginantis atsiranda, kuomet vartojami antibiotikai sunaikina normalią žarnyno florą. Taip pat, prie dauginimosi skatinančių aplinkybių prisideda metaboliniai sutrikimai, žarnyno išemija, imunosupresija, gydymasis intensyvios terapijos skyriuje [32]. Išsivysčius sunkaus pobūdžio diarėjai su kolitu, pacientams gresia letali būklė.

Pastaruoju laikotarpiu (dešimtmečiu) šios infekcijos sergamumo dažnis ir ligos būklės sunkumas padidėjo, kas kartu ir prailgina hospitalizacijos laiką [14]. Pagrindiniai infekcijos šaltiniai yra tik infekuoti ar kolonizuoti pacientai, užteršta aplinka ir paviršiai gydymosi įstaigose. Esant palankioms aplinkos sąlygoms, bakterijos išskiriamos sporos fekaliniu-oraliniu, tiesioginio ar netiesioginio kontakto metu patenka į organizmą [32]. Nors *C.difficile* randama daugelio sveikų vaikų (<1 metų) ir suaugusiųjų išmatose, labiausiai ūmių ligų atvejais bakterijos kolonizuoti yra vaikai iki 1-erių metų amžiaus [32].

Atsiradus ūmiai *C. difficile* sukeltai infekcijai, ligos požymiai varijuoja nuo lengvos viduriavimo formos be karščiavimo, iki pseudomembraninio kolito (sunkaus žarnų uždegimo), kuriam būdingas gausus vandeningas viduriavimas, išmatose su gleivių ir kraujo priemaišomis, pilvo skausmais, intoksikacija, elektrolitų pusiausvyros sutrikimu, anemija, dehidratacija [22].

#### 1.5.1.8. *Aeromonas spp.*

*Aeromonas spp.* yra gramneigiamas, fakultatyvinis anaerobas, *Aeromonadaceae* šeimai priklausanti lazdelinės formos bakterija [33]. Apie 85% iš aeromono sukeltamų gastroenterito atvejų vaikams identifikuojamos kelios pagrindinės mezofilinės aeromono rūšys: *A. caviae*, *A. hydrophila* and *A. veronii* [34, 35].

Dažniausiai *Aeromonas* spp. yra išskiriamas asmenims sergantiems „keliautojų diarėja“. Aplinkoje *Aeromonas* spp. yra gėluose ir sūriuose vandenyse, maiste plačiai paplitusi bakterija [34]. Pagrindinis infekcijos šaltinis – sergantis žmogus, kiaulė, nors dažnai infekcijos šaltinis nėra nustatomas. Įprastai šia bakterija užsikrečiama tiesioginiu būdu, vartojant bakterijomis apkrėstą vandens gėrybes, geriant užterštą vandenį arba bakterijai patenkant pro pažeistą odą. Bakterijai patekus į organizmą pagrindiniai klinikiniai požymiai – pykinimas, vėmimas, pilvo skausmai, karščiavimas, viduriavimas vandeningomis, kartais su kraujo priemaiša išmatomis. Nors bakterija stipriai susijusi su gastroenteritu, tačiau bakterijos vaidmuo ligos atsiradimo priežastyje lieka neaiški [35]. Taip pat, *Aeromonas* susijęs sukeliant negyjamų žaizdų (nektrozinis fascitas), regos, kvėpavimo takų ir kitus sisteminės infekcijos atvejus [22, 34, 35].

## **1.5.2. Ūmios diarėjos virusiniai sukėlėjai**

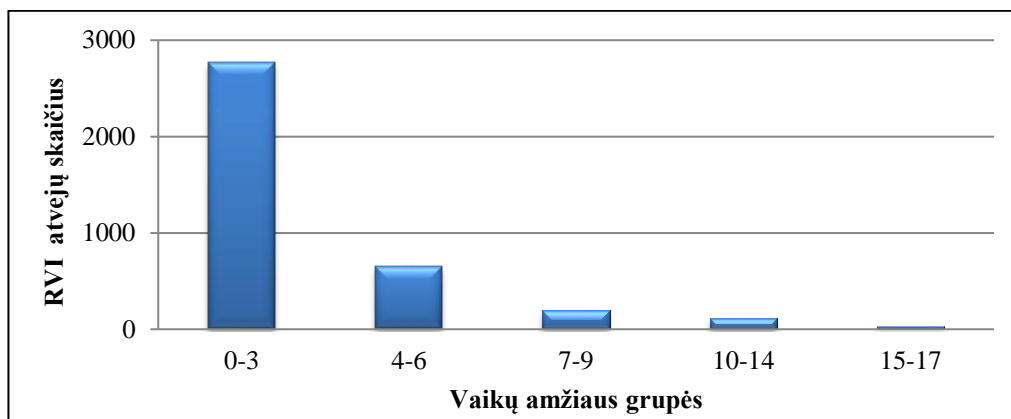
### **1.5.2.1. Rotavirusas**

Rotavirusas (RoV) yra virusų grupė, priklausanti *Reoviridae* šeimai, *Rotavirus* genties atstovams. 70 nm skersmens virusas, turintis genomą, susidedantį iš 11-a skirtingų dvispiralės RNR segmentų, kurią supa trisluoksnė baltyminė kapsidė [36]. Žinomos 7 rotavirusų A-G grupės, iš kurių patogeniškos žmogui tik A, B, C grupės. Serogrupės A sukėlėjai pasitaiko dažniausiai [20]. Išorinis viruso kapsidės sluoksnis sudarytas iš dviejų viršutinių VP4 ir VP7 baltymų, pagal kurių serotipų antigeninę struktūrą klasifikuojami rotavirusai [36]. Iš viso yra 15G ir 14P serotipų, tačiau apie 80% žmogaus susirgimų sukelia 4 dažniausiai pasitaikantys viruso serotipai: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] [18]. Serotipų identifikavimas svarbus epidemiologiniams tikslams, tiriant ligos infekcijos šaltinį, plitimo būdus, būtinas kuriant vakcinas [18].

#### **Rotavirusinė infekcija (RVI). Rotavirusinis enteritas**

Rotavirusas yra labiausiai paplitęs virusinis žarnyno patogenas, sukeliantis visame pasaulyje sunkaus viduriavimo vaikams iki penkerių metų amžiaus atvejus [7, 20, 21, 37]. Rotavirusine infekcija gali sirgti įvairaus amžiaus vaikai, tačiau sunkesne infekcijos forma (sunkus viduriavimas ir skysčių netekimas) dažniau serga naujagimiai, 6 mėn.- 2 metų vaikai [9, 20, 25, 38]. Lietuvoje, daugelyje pasaulio šalių RVI yra didelė medicininė, socialinė ir ekonominė problema. RVI išsivysčiusiose šalyse sudaro 20-60% ūmaus viduriavimo atvejų, didesnis sergamumas ir mirštamumas registruojamas besivystančiose šalyse, pasaulyje užregistruojama daugiau nei 100 mln. rotaviruso sukeltų viduriavimo epizodų [7, 20]. ULAC

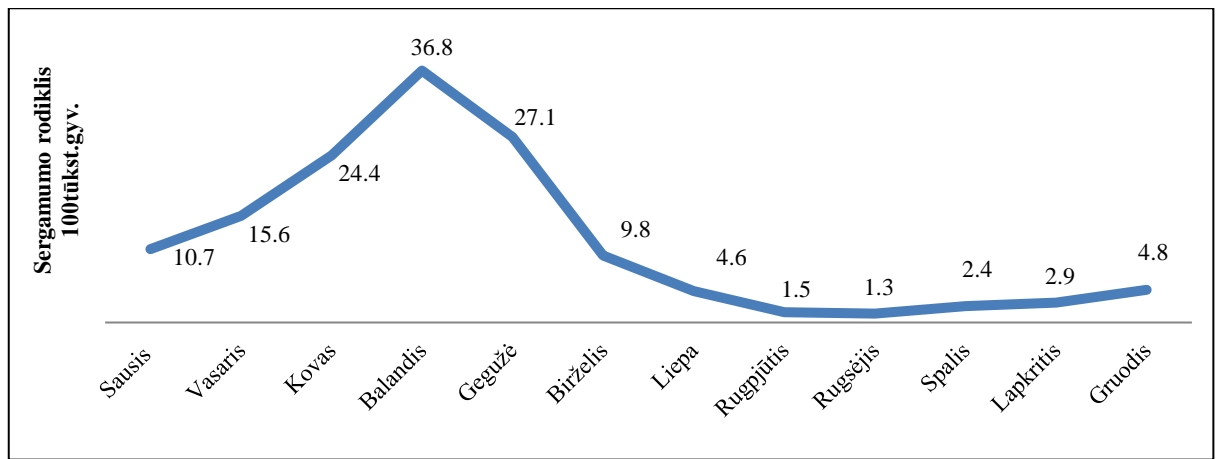
duomenimis, 2016 metais Lietuvoje vaikų (0-17 m.) rotavirusinė infekcija sudarė 81,5% (3764 atvejų) visų patikslintų virusinės kilmės žarnyno infekcinių ligų vaikų tarpe. Lietuvoje didžiausi RVI sergamumo rodikliai yra 0-3 metų amžiaus grupėje, kuris su amžiumi kelis kart mažėja (6 pav.).



**6 pav.** Sergamumas rotavirusiniu gastroenteritu vaikų amžiaus grupėse 2016 m. (pagal 2017 m. ULAC pateiktus duomenis) (n=3764).

Rotavirusas yra fekaliniu–oraliniu būdu perduodamas virusas, hospitaliniu infekcijos atveju – buitiniu kontaktiniu būdu, kurio šaltinis yra sergantieji ir virusus išskiriantieji žmonės [18]. Nuo gyvūnų rotavirusine infekcija neužsikrečiama, kadangi tarp gyvūnų cirkuliuojančios virusų padermės (serogrupės) žmogui nepavojingos [36]. Kadangi, virusai yra atsparūs išorinėje aplinkoje, todėl per užterštus aplinkos objektus – daiktus, žaislus, patalines, šiais virusais gali užsikrėsti kiti imlūs asmenys [18, 20, 38]. Maža RoV infekuojanti dozė ir atsparumas išorinėje aplinkoje sudaro prielaidas plačiam paplitimui visuomenėje. Pirmasis vaiko kontaktas su RoV pasireiškia kliniškai sunkiausiai, susirgus pakartotinai – klinikiniai simptomai yra lengvesnės formos. Po kelių ligos epizodų susiformuoja pakankamai patikimi organizmo imuniniai mechanizmai, dėl kurių vyresni vaikai serga rečiau [18].

RVI būdingas sezoniškumas, pasireiškiantis sergamumo pakilimu šaltuoju metų laiku, tropinėse šalyse virusas aktyvus ištisus metus, tačiau daugiausia vasarą [18, 20, 38]. Lietuvoje RVI susirgimai registruojami ištisus metus, sergamumo padidėjimas šalyje stebimas gruodžio-balandžio mėnesiais. Lietuvoje 2016 metais aktyviausias sezoninis infekcijos paplitimas buvo stebimas sausio-birželio mėnesiais (7 pav.).



**7 pav.** Sergamumas rotavirusiniu gastroenteritu pagal metų mėnesius Lietuvoje 2016 m. (pagal 2017 m. ULAC pateiktus duomenis).

Klinikiniai ligos simptomai gana platūs: gali pasireikšti besimptomis infekcinis viduriavimas (naujagimiams), vėmimas, dehidracija, o ne gydant gali padidėti mirties rizika. Dažniausiai visi ligos simptomai atsiranda pirmą ligos parą – karščiavimas (trunkantis iki 3-4 parų), pilvo skausmai, žarnyno veiklos sutrikimai. Tipinis ligos simptomas – prodrominis gastroenteritinio pobūdžio viduriavimas, prasidedantis po kelių valandų nuo ligos pradžios [25]. RoV sukeltam gastroenteritui būdingas 3–8 dienas trunkantis viduriavimas, nekraujingomis (gelsvomis, gelsvai žalsvos spalvos) be priemaišų, vandeningomis, putotomis, kartais su nedideliu gleivių kiekiu, rūgštaus kvapo išmatomis [21, 25, 38]. Viduriuojant ir vemiant netenkama daug vandens ir druskų, t.y. sutrinka elektrolitų balansas. Sunki dehidracija gali būti labai pavojinga kūdikiams ir mažiems vaikams. RVI sergančiųjų vaikų išmatose virusą galima aptikti kelių savaičių laikotarpyje nuo susirgimo pradžios, tačiau didžiausias RoV kiekis būna 4-7 ligos dieną [18, 25]. 1 grame išmatų gali būti 10-100 mlrd. virusų, o tam kad liga išsivystytų pakanka tik 10-ties viruso dalelių, todėl RoV plitimas yra labai aktyvus [36].

#### 1.5.2.2. Norovirusas

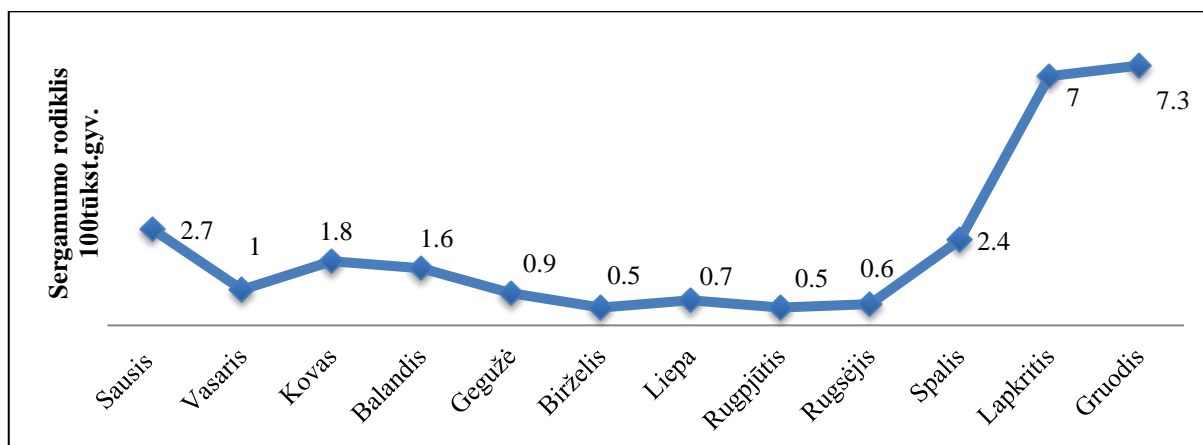
Norovirusas (NoV) įvardijamas taip pat vienu iš labiausiai paplitusių virusinių gastroenterito sukėlėjų tiek suaugusių, tiek vaikų tarpe [21]. NoV (Norwalko virusai) – smulkūs (27-35 nm skersmens), apvalios struktūros, neturintys kapsidės, vienvijės RNR (ss-RNA) virusų grupė, priklausančių *Norovirus* genčiai, *Caliciviridae* šeimai [21]. NoV skirstomas į 6 genų grupes (G-I – G-VI) iš kurių GI, GII, GIV grupės infekuoja žmones, o daugiausia reikšmės turi GI/GII (NVG1/NVG2) [14]. GI – vandeniu, GII – per maistą, ir kontaktą plintančios grupės [21].

NoV atsparūs išorinės aplinkos veiksnių poveikiui – sugeba išlikti gyvybingais plačiame temperatūrų diapazone (nuo užšalimo iki 60°C temperatūros), išdžiūvimui, ilgai išgyvena rūgščioje terpėje, jie atsparūs įprastinių koncentracijų (0,5 – 1,0 mg/l) chloro dezinfekuojančioms medžiagoms, tačiau jautrūs didelių koncentracijų natrio hipochlorito tirpalui [39].

### Norovirusinė infekcija

Norwalk veiksnio sukelta infekcija – ūminė žarnyno infekcija, įvairiose pasaulio šalyse esanti apie 10% - 15% vaikų iki 5 metų gastroenteritų priežastimi. Amerikos ir Europos šalyse NVI protrūkiai sudaro apie 50% visų užregistruotų gastroenterito protrūkių [39].

Lietuvoje 2016 m. vaikų (0-17 m.) NVI sudarė 15,3% (706 atvejų) visų patikslintų virusinių žarnyno infekcinių ligų vaikų tarpe. NVI pavieniai atvejai ir protrūkiai registruojami ištisus metus, tačiau daugiausia ligos atvejų įregistruojama šaltuoju metų periodu (spalio – vasario mėnesiais) (8 pav.).



**8 pav.** Sergamumas norovirusiniu gastroenteritu pagal metų mėnesius Lietuvoje 2016 m. (pagal 2017 m. ULAC pateiktus duomenis).

Virusas plinta visuomenėje viešose erdvėse, perduodamas per užterštus maisto produktus (salotas, vaisius, desertus, kiautuotus vėžiagyvius), vandenį [21]. Pagrindinis plitimo tipas yra fekalinis – oralinis. Infekcijos šaltinis yra žmogus, sergantis ūminiu norovirusiniu gastroenteritu [39]. NoV sukeltas gastroenteritas gali būti įgytas bendruomenėje sporadinių, epideminių atvejų metu ir hospitaliniai [39].

Nuo patogenų patekimo į organizmą, pirmieji infekcijos požymiai gali atsirasti praėjus 12-48 val. trunkančio inkubacinio periodo. Virus sukeltai infekcijai būdingas staigus pykinimas, vienkartinis ar daugkartinis vėmimas, vandeningas viduriavimas – enteritas, pilvo skausmas. Vėmimas būdingas vaikams, galintis kartotis 1-72 val., neretai esantis vienintelis

NVI simptomas. Nors ligos požymiai gali būti sunkūs, jie paprastai praeina po 12-72 val., tačiau vaikams ir vyresnio amžiaus asmenims sunkūs ligos simptomai gali užtrukti 4-6 dienas [39]. Apie 30% NVI atvejų gali būti besimptomės formos, tačiau ir šie sergantys asmenys taip pat išskiria į aplinką virusus mažesniais kiekiais. Ligonių išmatose galima aptikti virusų iki 2-4 savaitių nuo ligos pradžios. Daugiausia virusų išsiskiria su sergančiojo išmatomis pirmosiomis 2-5 ligos dienomis, apie 5 mlrd. dalelių – viename grame išmatų. Kadangi užkrečiamoji dozė yra labai maža – 10-100 viruso dalelių (virionų), atsparūs šalčiui bei karščiui, norovirusai pasižymi dideliu virulentiškumu [21]. Persirgus NVI įgyjamas trumpalaikis imunitetas tam tikrai viruso padermei, tačiau kitoms virusų grupėms apsauga neužtikrinama. Dėl didelio genetinio NoV kintamumo galimi pakartotiniai susirgimai [39]. NoV sukelti viduriavimo protrūkiai yra sunkiai kontroliuojami ir sukelia didelę visuomenės sveikatos problemą. Todėl labai svarbu greitai diagnozuoti sukėlėją efektyviai protrūkio kontrolei.

#### 1.5.2.3. Adenovirusas

Virusinis patogenas, kuris paplitęs vaikų tarpe ir susijęs su virškinimo, kvėpavimo, šlapimo takų infekcijomis [20, 21]. *Adenoviridae* šeimai priklausantis atstovas išsiskiria iš kitų patogenų, turinčiu dvigrandžiu DNR genomu [21]. Žmogaus adenovirusas skirstomas į septynis pogrupius (A-G), iš jų adenovirusas F (ADV-F; serotipas 40/41) dažniausiai sukeliantis gastroenteritą [40]. Adenoviruso sukeltoms infekcijoms nėra būdingų specifinių simptomų [21]. Dažniausiai nuo kitų patogenų sukeliama viduriavimo išsiskiria ilgiau trunkančiu vandeningu viduriavimu, kartu su vėmimu [40]. Virusui patekus į organizmą pasireiškia iki 10 dienų trunkantis karščiavimas, vėmimas, viduriavimas, pilvo skausmas. Patogenas perduodamas per išmatas oraliniu keliu.

#### 1.5.2.4. Astrovirusas

Astrovirusas – viengrandis RNR (ss-RNA). 28-30 nm, 6,1-7,3 kb dydžio virusas, priklausantis *Astroviridae* šeimai. Astroviruso reikšmė diarėjos procese nebuvo labai įvertinta, dėl mažo virusinio patogeniškumo (klinikiniai simptomai yra silpnesni, lyginant su rotavirusu), bei ribotų diagnostikos priemonių [20]. Diagnostikos metodų tobulinimas lėmė, kad astrovirusas yra gana svarbi priežastis, vaikų diarėjos atveju. Jis susijęs su 5-9% vaikų gastroenterito atvejų. *HastVI* – vienas plačiausiai paplitusių viruso serotipų visame pasaulyje, nors daugėja pranešimų ir apie kitus pasitaikančius serotipus [21]. Astroviruso sukelta infekcija nėra kliniškai sunki infekcija, būdingas lengvos formos, vandeningas viduriavimas,



trunkantis iki 3-4 dienų, karščiavimas, vėmimas, dažni pilvo skausmai, anoreksija – svorio netekimas [21]. Pagrindinis astroviruso perdavimo būdas yra per užterštą maistą ir vandenį.

#### 1.5.2.5. Sapovirusas

Sapovirusas – viengrandis RNR (ss-RNA), 7,1-7,7 kb, 41-46 nm skersmens virusas, priklausantis *Caliciviridae* šeimai [40]. Sapovirusas yra padalintas į penkias genų grupes, iš kurių I, II, IV ir V yra laikomos galinčiomis užkrėsti individą [21]. Sapovirusas aptiktas įvairiuose pasaulio regionuose, bet mažai turima žinių apie viruso sukeltus viduriavimo protrūkius. Šis virusas gali sukelti virusinį gastroenteritą pavieniais atvejais ar protrūkius visose amžiaus grupėse [40]. Infekcinis efektas aptinkamas kūdikių gastroenteritų protrūkių metu, nors tikėtina, kad gali infekuotis ir suaugusiame organizme. Dažniausiai sapovirusas perduodamas per fekalinį-oralinį kelią.

### 1.5.3. Ūmios diarėjos parazitiniai sukėlėjai

#### 1.5.3.1. *Giardia lamblia*

*Giardia lamblia* (sin.: *D.duodenalis*, *G.intestinalis*) dažniausiai sukeliantis viduriavimą žiuželinis pirmuonis, aptinkamas vaikų iš silpnos ekonomikos lygio šalių žarnyne. Kaip ameba, *G.lamblia* turi dvi raidos ciklo stadijas: žiuželinę dvibranduolio trofozoito ir keturbranduolės cistos stadijas. Trofozoitai telkiasi viršutinėje plonojo žarnyno dalyje prilipdami prie epitelinių ląstelių, dalijasi ir užima didelius gleivinės plotus [41]. Cistos – pašalinamos su išmatomis, aplinkoje gali išlikti gyvybingos kelias savaites [41].

#### Lambliozė

*G.lamblia* sukelia giardiazę (lambliozę), kuri yra viena labiausiai paplitusi nevirusinės kilmės viduriavimo priežasčių vaikų tarpe. Pagrindinis infekcijos šaltinis yra sergantis ar sveikas giardijų nešiotojas (gyvūnai, žmonės). Lambliozė užsikrečiama cistoms patekus į plonąjį žarnyną tiesioginiu, oraliniu būdu, per užterštą vandenį, maistą. Svarbu, jog giardijos laisvai plinta vaikų ugdymo įstaigose, dienos centruose, kur dėl netinkamos vaikų higienos pirmuonių cistomis randami užkrėsti žaislai, patalynė [42]. Patekusios į organizmą cistos pasiekia plonąjį žarnyną, kuriame trofozoitai maitinasi, auga ir dauginasi pažeisdami žarnyno gleivinę, sutrikdydami žarnų peristaltiką, normalų absorbcijos procesą [41, 42]. Esant inkubaciniam periodui, klinikinių simptomų gali nepasirodyti (besimptomis cistų nešiojimas). Patekus 10-25 cistoms formuojasi sunkesnės formos infekcija, prasideda uždegiminis procesas galintis sukelti lėtinį ar ūmų viduriavimą. Įprastai viduriavimas trunka

5-10 dienų, kuris esant silpnai imuninei sistemai pereina į sudėtingą būklę. Išmatos būna vandeningos, gausios, riebios (steatorėja), dvokiančios, be kraujo ir pūlių priemaišų [41]. Infekciją lydi pilvo skausmai, pykinimas, malabsorbcija, skysčių netekimas, svorio kritimas, todėl kaip pasekmė – sutrinka vaiko augimas ir vystymasis [42]. *G.lambliia* kaip infekcijos sukėlėjas diagnozuojamas radus išmatose cistų ar trofozoitų, kurių kiekis gali siekti iki 18 mlrd. [42]. Infekcijai išvengti reikia laikytis asmens higienos, sanitarijos reikalavimų, vengti užterštų geriamojo vandens telkinių vartojimo.

### 1.5.3.2. *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* – patogeniškas, ameboidinis pirmuonis, sukeliantis žarnyno arba kepenų ligą, labiausiai paplitęs paatogrąžų ir atogrąžų klimato juostose. Jų sukeltos infekcijos stiprumas varijuoja priklausomai nuo geografinės vietos ir vaiko imuniteto būklės [24]. Amebai būdingos dvi ciklo stadijos: trofozoitai – kurie vystosi storosios žarnos gleivinėje (komensaliai); cistos – kartu su išmatomis pašalinamos iš organizmo – susidarius palankioms sąlygoms, formos gali pereiti viena į kitą.

Pagrindinis infekcijos šaltinis yra sergantis amebiaze arba sveikas amebų nešiotojas, kurių išmatose yra amebų cistų. Atspariai *E.histolytica* cistai iš aplinkos oraliai patekus į skrandį ir plonąją žarną, pirmiausia ištirpsta išorinis apvalkalas ir laisvos amebos (trofozoitai) patenka į storąją žarnyną. Trofozoitams gyvenant storosios žarnos viduje jie gleivinės nepažeidžia ir nesukelia ligos simptomų. Tačiau, susidarius palankioms sąlygoms (pasikeitus ligo mitybai, mikroflorai), trofozoitai išskiriamais fermentais pradeda ardyti storąją žarnyno gleivinę, sukelia paviršinius arba gilius išopėjimus [41]. Tokiu mechanizmu sukeliama amebinis kolitas, „amebinė dizenterija“. Nesiimant infekcijos gydymo, trofozoitai krauju per žarnos gleivinės kraujagysles gali plisti į kepenis, plaučius, kitus organus, juose sudaryti pūlinius darinius [41]. „Amebinės dizenterijos“ metu išmatose randama daug gleivių, pūlių, kraujo, keturbranduolių cistų, kurių kiekis viename grame išmatų gali siekti 6 mln. Amebiazė paplitusi visame pasaulyje, tačiau daugiausia susirgimų registruojama šiltesniuose kraštuose, Europoje, taip pat ir Lietuvoje registruojami pavieniai ligų atvejai, kurie dažniausiai įvežtiniai. Norint išvengti amebiazių, reikia laikytis higienos ir sanitarijos reikalavimų.

### 1.5.3.3. *Cryptosporidium* spp.

*Cryptosporidium* spp. – parazitinis viduląstelinis pirmuonis, sukeliantis įvairiems stuburiniams žinduoliams (įskaitant žmogų) virškinimo trakto ir kvėpavimo takų ląstelių pažeidimus [42]. Yra žinoma apie 20 *Cryptosporidium* spp. rūšių, galinčių parazituoti žmogų,

tuo tarpu kryptosporidiazės atvejais dažniausiai minėtini *C.hominis* ir *C.parvum*. Parazitui būdingos dvi – trofozoito ir oocistos stadijos.

Pagrindinis infekcijos šaltinis yra sergantis žmogus, gyvūnai į aplinką su išmatomis išskiriantys oocistas. Kryptosporidiazė užsikrečiama fekaliniu – oraliniu būdu, parazitui patekus į virškinimo traktą su išmatomis užkrėstu maistu, besimaudant užterštuose vandens telkiniuose. Nelytinės stadijos metu iš oocistos plonosiose žarnose išsilaisvina parazitai, kurie pažeidžia epitelines gleivinės ląsteles, infekuojasi ir dauginasi. Toliau seka lytinė raidos stadija, kai susiliejus vyriškosioms ir moteriškosioms parazito ląstelėms virstama oocistomis, kurios šalinamos iš organizmo [41]. Oocistos su išmatomis išsiskiria jau nuo pirmų ligos simptomų atsiradimo dienų ir dar kelias savaites po ligos simptomų išnykimo. Infekcijos metu galimos kelios ligos formos: besimptomė nešiojant oocistas; ūminės žarnyno infekcijos (gastroenteritas, dehidracija, elektrolitų disbalansas); lėtinė recidyvuojanti diarėja su malabsorbciniu sindromu [42]. Ligai vystantis pirmiausia pakyla temperatūra, pacientas vemia, prastėja bendra savijauta, pagrindinis klinikinis infekcinis simptomas – padažnėjęs tuštinimasis vandeningomis išmatomis. Kryptosporidijų sukelta infekcija pavojingesnė imunosupresiniams vaikams ar vaikams iš silpnos ekonomikos šalių. Dažnai kryptosporidiazė susergera AIDS sergantys žmonės, kuriems kartu padidėja ir mirties rizika. Norint identifikuoti parazitą reikia išmatose rasti oocistas, kurių aptikimui naudojama speciali technika ir dažymo būdai [41].

#### 1.5.3.4. *Blastocystis hominis*

*Blastocystis hominis* – anaerobinis virškinimo trakto pirmuonis. Nors ilgą laiką *Blastocystis hominis* buvo laikomas nepatogenišku agentu, šiuo metu pasirodo pranešimai apie jo vaidmenį diarėjos procese.

*B.hominis* paplitęs plačiai visame pasaulyje, daugiausia parazitu užsikrėtusių randama vietose, kurioje prastos gyvenimo ir higienos sąlygos, dienos priežiūros centruose. Pagrindinis pirmuonių infekcijos šaltinis yra gyvūnai ir žmonės, galintys į aplinką su išmatomis išskirti cistas. Cista fekaliniu-oraliniu būdu patenka į virškinamąjį traktą, virsta kita parazito forma (vakuole, granuliacine, ameboidine forma). Žarnynų viduje vakuolės formos parazitas vėl virsta cistomis, kurios pašalinamos į aplinką. Kaip ir kitų parazitinių infekcijų atvejais, galima besimptomė blastocistozės klinika, tačiau dažnai pastebimas dirgliosios žarnos sindromas, viduriavimo atvejai, pilvo skausmai, svorio kritimas.

### 1.5.3.5. *Dientamoeba fragilis*

*Dientamoeba fragilis* – patogeninis flagelinis parazitas, taip pat paplitęs visame pasaulyje. Patogeno paplitimas, ryšys su specifiniu plitimo mechanizmu ir ligomis nėra tiksliai išaiškintas [43, 44]. Iki 70% pacientų, priklausomai nuo taikyto tyrimo metodo ir tiriamųjų populiacijos, yra randamas *D.fragilis* [45, 46]. Atlikti tyrimai kelia hipotezę, apie *D.fragilis* ir *Enterobius vermicularis* bendrą ryšį [47]. Dažniausiai *D. fragilis* sukelta infekcija diagnozuojama jauno amžiaus, iki 20 metų amžiaus pacientams [46]. Bendrai, klinikiniai požymiai susiję su *D. fragilis* nėra platus – pasireiškia intensyvesnis viduriavimo epizodas, atsiranda pilvo skausmas, nuovargis, pykinimas [44].

### 1.5.3.6. *Cyclospora cayetanensis*

*Cyclospora cayetanensis* – kokcidinis, obligatinis, viduląstelinis pirmuonis, sukiantis lėtinę ir ūminę viduriavimo infekcijas. Parazito paplitimas apima atogrąžų, subtropikų sritis [48]. Europoje infekcijos paplitimo atvejai nėra dažni, dažniausiai tai pavieniai atvejai susiję su asmenimis grįžtančiais po kelionių iš endeminių parazito paplitimo sričių [48, 49]. Infekcijos šaltinis yra įvairūs užkrėsti parazitu maisto produktai – daržovės, prieskoninės žolelės, vaisiai, vanduo [48, 50]. Parazitas perduodamas fekaliniu-oraliniu būdu [50]. Patekusios į organizmą pirmuonių oocistos infekuojasi plonajame žarnyne. Infekcijos metu vargina nuovargis, vėmimas, lengvas karščiavimas, svorio netekimas bei staigus viduriavimo atsiradimas. Viduriavimas trukti gali iki 3-4 dienų, retais atvejais iki keletos savaitių. *C.cayetanensis* parazito sukelta infekcija imlesnė vaikams, imunosupresuotiems asmenims (sergantiems ŽIV/AIDS), kuriems infekcijos simptomai gali trukti iki kelių mėnesių [49, 50].

## 1.6. Sukėlėjų laboratoriniai tyrimo metodai

Tinkamas mėginių surinkimas turi didelę reikšmę teisingos diagnozės suformulavimui, tyrimo klaidų išvengimui. Mėginiai turi būti surenkami kuo anksčiau atsizvelgiant į klinikinę paciento būklę. Ūmaus gastroenterito ir kitais nežinomos viduriavimo priežasties metu, mėginiai turėtų būti imami 1–4 ligos atsiradimo dienomis [21]. Išmatų mėginiai renkami pagal standartinius reikalavimus mikrobiologiniams tyrimams. Išmatos surenkamos į sterilius, plastikinius konteinerius su vienkartinio šaukštelio. Iki tyrimo mėginys siunčiamas į laboratoriją ir laikomas 4°C temperatūroje. Ilgesniam tyrimo laikotarpiui mėginiai gali būti laikomi keletą mėnesių -70°C temperatūroje specialiuose konteineriuose [21, 25]. Tyrimo laikas, laikymo temperatūra yra svarbiausi kriterijai nuo mėginio paėmimo,

ypatingai tai svarbu teisingam virusų RNR bei bakterijų DNR aptikimui taikant itin tikslus molekulinis metodus [21].

### 1.6.1. Tradiciniai laboratoriniai metodai

Surinkus bendrą klinikinę anamnezę, nustatyti viduriavimo sukėlėją yra beveik neįmanoma. Enterito ar gastroenterito sindromais gali pasireikšti tiek virusinės, parazitinės, tiek kai kurios bakterinės žarnyno infekcijos. Tokias atvejais be papildomų laboratorinių tyrimų ligos etiologiją nustatyti sudėtinga. Klasikiniu atveju, laboratorinę išmatų analizę apima mikroskopinis (koprologinis), cheminis, mikrobiologinis tyrimai [23]. Tai ypač svarbu siekiant išsiaiškinti galimus mikroorganizmus sukėlusius infekciją, epidemiją, nes reikia paskirti tinkamus epidemiologinius tyrimus ir sudaryti tinkamą gydymo planą.

**Koprologiniam išmatų tyrimui** – reikalingos šviežios (natyvinės) išmatos. Netinka išmatos išskirtos po klizmos procedūrų, žvakučių, vaistų, turinčių įtaką išmatų formavimuisi, vartojimo. Preanalizės metu išmatos surenkamos į sterilų specialų indelį (konteinerį), iškart pristatomas į laboratoriją arba iki pristatymo laikomas šaldytuve +2 - +8 °C temperatūroje [25]. Tyrimui užtenka apie 10 mg tiriamos medžiagos. Koprologinio tyrimo metu makroskopiškai įvertinama išmatų spalva, konsistencija, kiekis. Mikroskopuojant vertinamas eritrocitų (RBC), leukocitų (WBC), parazitų cistų ir kiaušinėlių kiekis, maistinių medžiagų – skaidulų, riebalų buvimas tiriamoje medžiagoje.

**Bakteriologinis išmatų pasėlis** (žarnyno patogenų kultūra, išmatų kultūra arba koprologinė kultūra.). Išmatų pasėlis taikomas norint išauginti potencialių žarnyno patogenų kultūrą. Standartiniu būdu ieškoma penkių bakterinių sukėlėjų – *E.coli*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Yersenia enterocolitica*, įtarus kitokią infekciją paskiriami kiti specialūs tyrimai [6]. Patogenų augimo pasėlyje galima tikėtis, kai: koprologinio tyrimo metu randamas didelis leukocitų skaičius; pasireiškia kraujinga diareja; lydi karščiavimas; yra tenezmai (primygtinis, skausmingas, dažnas noras tuštintis); neaiški klinika arba ligonis grįžo iš kelionės; esant ligonio kontaktavimui su patogenine medžiaga. Nors pasėlio metu išskiriamos įvairios kultūros, bet jų identifikavimas turi ribotą klinikinę vertę. Tyrimai trunka 3-5 dienas [11].

Įtariant virusinio ar *C.difficile* sukeltą gastroenterito atvejį, yra sukurtų **greitų diagnostikos rinkinių, nustatančių virusų, toksinus A/B gaminančios *C.difficile* antigenus išmatose**. Testų pagalba ištyrus išmatas, ligos etiologiją galima patvirtinti arba paneigti per kelias minutes [51]. Rotavirusui, norovirusui, adenovirusui ir *C.difficile* nustatymui yra naudojami vienkartiniai imunochromatografiniai testai [57]. Testo metu, tiriamojoje medžiagoje esant specifiniams šių sukėlėjų antigenams, šie migruoja link testo

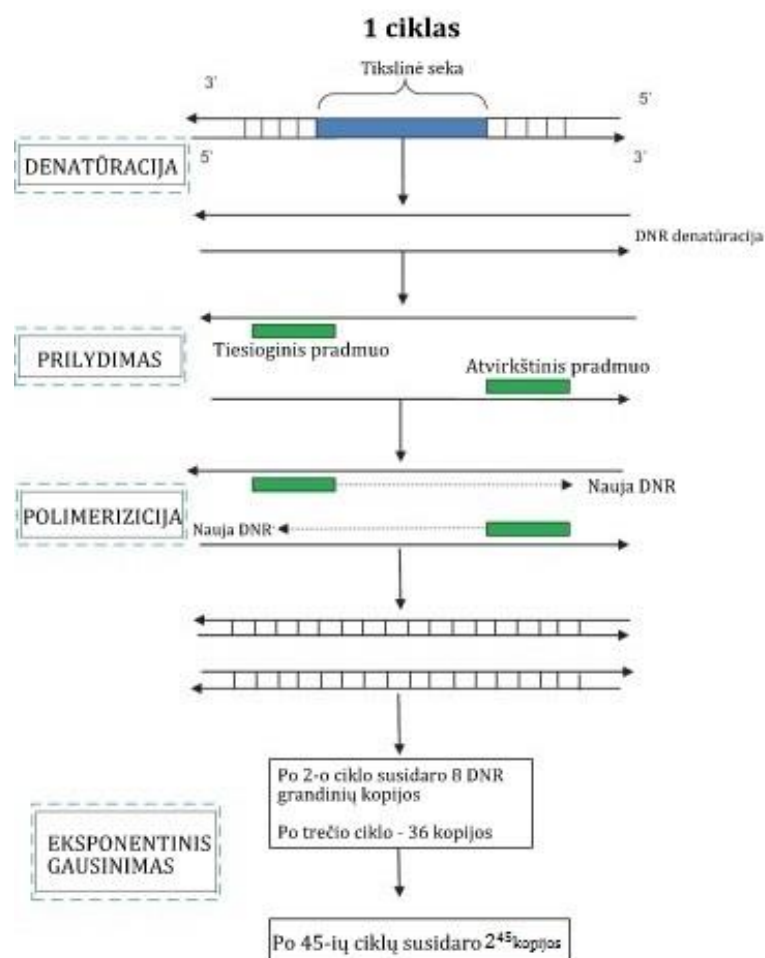
juostelės paviršiuje esančių antikūnų, kuriems sudarius sąveiką toje vietoje išryškėja spalvotą žymę (mėginys teigiamas tirtam sukėlėjui) [11]. Šie testai universalūs ir patogūs naudoti laboratorinės diagnostikos centruose, kadangi jiems atlikti nereikia jokios specialios įrangos, mėginių nereikia papildomai filtruoti ar centrifuguoti ir vos per keletą minučių gaunami tikslūs kokybiniai rezultatai [25].

### **1.6.2. Molekuliniai metodai. RL-PGR.**

Tradiciniai diagnostiniai metodai, tokie kaip serologinis tyrimas, mikroskopavimas keletą dešimtmečių buvo vieni svarbiausių patogenų diagnostikoje. Tačiau šie metodai nepasižymėjo aukštu jautrumu [21]. Molekulinė biologija yra viena sparčiausiai besivystančių mokslo šakų, kuri sukėlė perversmą infekcinių ligų diagnostikoje [19]. Aukštam jautrumui ir specifiskumui pasiekti, greitai diagnostikai atlikti buvo sukurti molekuliniai metodai, tokie kaip polimerazės grandininė reakcija (PGR), realaus laiko (tikro laiko) PGR, kurie vis plačiau taikomi klinikinėse laboratorijose [14, 19, 21, 50,]. Taikant molekulinis tyrimo metodus, pasiekiami aukšto lygio tyrimo rezultatai, kadangi polimerazės grandininės reakcijos metu aptinkami mažiausi specifiniai mikroorganizmo nukleorūgščių (NR) kiekiai [51, 52].

NR koduoja genus, kuriuos ištyrus naujausiais šiuolaikiniais metodais patogų analizuoti. Iš tiriamosios medžiagos išgryninti NR kiekiai būna ypatingai maži, todėl juos reikia amplifikuoti – tam naudojamas polimerazės grandininės reakcijos metodas [23]. Pagrindinis PGR metodo principas – jog cikliškai keičiant reakcijos mišinio temperatūrą vykdomas savitų DNR sekų padauginimas *in vitro* – iš kiekvienos DNR grandinės sintetinama nauja komplementari grandinės matrica [19, 53]. Reakcijai atlikti naudojamas specifinių reagentų mišinys, sudarytas iš DNR polimerazės, tiesioginio ir atvirkštinio DNR grandinės pradmenų (sintetiniai viengrandžiai DNR fragmentai), divalenčio  $Mg^{2+}$  katijono ir buferinės sistemos. Polimerazės grandininė reakcija sudaryta iš ciklų pasikartojančių iki 45 kartų [53]. Kiekvienas PGR ciklas vyksta trimis etapais: denatūracijos, pradmenų prilydimo (anilinimo), DNR polimerizacijos (kopijų sintezė) (9 pav.) [19]. Kiekvienas naujas PGR programos ciklas prasideda nuo pradinio dvigrandės DNR atskyrimo (denatūracijos), kuri vyksta 92-96°C temperatūroje [53]. Jos metu suardomi vandeniliniai ryšiai tarp DNR struktūrą palaikančių komplementarių nukleotidų porų. Išlydžius dvigrandę DNR iki viengrandės DNR, prie jos antrojo etapo metu – anilinimo metu (prilydimas), gali prisijungti pradmenys. Pradmenys prie tikslinės viengrandės DNR grandinės prisilydo pagal komplementarumo principą susidarant vandeniliniams ryšiams. Pradmenų prilydimo efektyvumas priklauso nuo parinktos tinkamos prilydimo temperatūros [53]. Prilydimo temperatūra turi būti mažesnė už pradmenų lydimosi

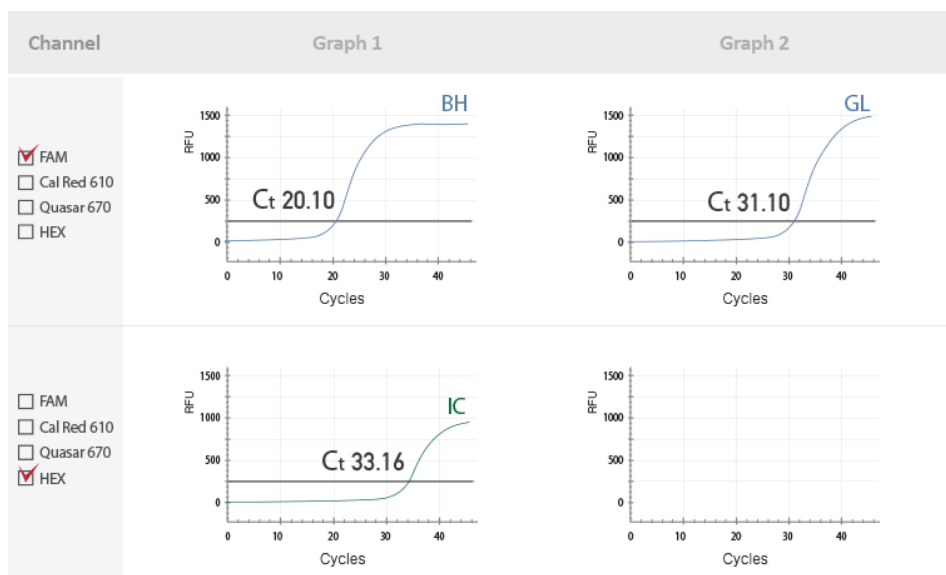
temperatūrą, dažniausiai ji būna 37-68°C, priklausomai nuo naudojamų pradmenų sudėties [53]. Trečiojoje DNR polimerizacijos (DNR grandinės sintezės) stadijoje fermento – DNR polimerazės pagalba vykdoma amplifikuojamo DNR fragmento sintezė 5'→3' kryptimi [19]. Polimerizacijai atlikti parenkama optimaliausia polimerazei, dažniausiai 72°C temperatūra. Labai svarbu, jog šio etapo metu reakcijos mišinyje būtų pakankamas pradmenų, oligonukleotidų ir katijono kiekis [53]. Po kiekvieno ciklo iš vienos DNR molekulės susidaro dvi naujos kopijos, tai yra sintetinamų fragmentų skaičius kiekvieno ciklo metu padvigubėja geometrinės progresijos principu [19]. Polimerazės grandinės reakcijai pasibaigus, po n ciklų turėtų susidaryti 2<sup>n</sup> DNR kopijų [50].



**9 pav.** Polimerazės grandinės reakcijos principas [50].

Realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (RL-PGR) yra modifikuotas PGR metodas, pagrįstas fluorescencijos emisijos pokyčio matavimu kiekvieno ciklo metu. Tuo pačiu metu norimas DNR kiekis yra pagausinamas ir įvertinamas kiekybiškai [53]. Nuo įprasto PGR metodo RL-PGR skiriasi reakcijoje naudojamais fluorescentiniais žymenimis [53]. Fluorescuojančių žymenų skleidžiamas intensyvumas nustatomas po kiekvieno DNR

fragmento gausinimo ciklo, kuris priklauso nuo reakcijos mišinyje susidariusio dvigrandės DNR kiekio (10 pav.) [19, 50]. Kuo daugiau susintetinama DNR kopijų – tuo stipresnis fluorescentinis signalas [19, 54]. Ciklas, kuriame užfiksuojamas švytėjimas, vadinamas slenkstiniu ciklu ( $C_T$ ), kuris yra pagrindinis RL-PGR rodiklis [54]. T.y.  $C_T$  nurodo PGR ciklą, kurio metu mėginio fluorescencija viršija foninį lygį [53].



**10 pav.** RL-PGR specifinių fluoroforų matuojamų fluorescuojančių žymenų intensyvumo laike ir slenkstinio taško vaizdavimas analizatoriumi [55].

Realaus laiko PGR metodas suteikia galimybę rezultatus gauti tikslesnius ir greičiau (mėginių tyrimas analizatoriumi trunka apie 2.5 val.) negu įprastais laboratoriniais metodais [21, 53, 55]. RL-PGR technologijoje mėginio paruošimą galima pusiau automatizuoti, sumažinant klaidingai teigiamų rezultatų riziką dėl tiriamojo amplikono užsiteršimo [56]. Šis metodas pasižymi aukštu jautrumu – leidžia nustatyti priežastinius infekcinių ligų sukėlėjus, amplifikuojant DNR fragmentus iš minimalaus tiriamosios medžiagos kiekio [52]. Todėl ši technologija yra viena efektyviausių *in vitro* diagnostikos įrankių tiksliam ir kokybiškam NR aptikimui [53].

Pagrindiniais trūkumais, norint taikyti realaus laiko PGR metodą, tampa reikalingos įrangos bei reagentų didelė kaina – atliekant tyrimus labai jautriu metodu, naudojami ypač grynai reagentai arba biotechnologinių įmonių jau paruošti PGR mišiniai „Master Mix“ [51]. Netinkamai atlikus nukleorūgščių išgryninimą iš sudėtinių mėginių (pvz.: išmatų), gali likti junginių, kurie inhibuoja PGR reakciją [51]. Tačiau atlikus sudėtingą duomenų analizę, yra gaunami informatyvūs tyrimų rezultatai.



## 2. TYRIMO MEDŽIAGA IR METODAI

Diarėjos sukėlėjų molekulinės analizės studija atlikta Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje. Tyrimui atlikti išmatų ėminiai buvo renkami Vaikų ligoninės (Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų filialas) gastroenterologijos skyriuje. 2016 01 mėn. – 2017 04 mėn. laikotarpiu buvo surinkti 53 išmatų ėminiai. Kiekvieno tiriamojo paciento ėminiai buvo surenkami į sterilų indelį be priedų ir kartu su tyrimo užsakymo forma buvo siunčiami į VUL SK Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratoriją. Čia laikyti -20°C temperatūroje iki tyrimo. Kad būtų galima palyginti atliekamo RL-PGR metodu gautus tyrimo rezultatus, tiriamųjų pacientų išmatos VUL SK Vaikų ligoninės filiale mikrobiologijos laboratorijos darbuotojų buvo iširtos klasikiniiais mikrobiologiniais metodais.

### 2.1. Tyrime naudoti rinkiniai

„Gene All Ribospin® vRD Kit“ (Seegene, P.Korėja) rinkinį sudaro: Buffer FL, Buffer VL, Buffer RB1, kolonėlės su stiklo pluošto filtrais, Buffer RBW, Buffer RNW, 1,5 ml surinkimo mėgintuvėliai, vanduo be nukleazių. (11 pav.);



**11 pav.** „Gene All Ribospin® vRD Kit“ rinkinys su papildomu buferiu „Buffer FL“ (autorės nuotrauka).

**GI9703Y „Allplex™ GI-Parasite Assay“** (Seegene, P.Korėja) rinkinį sudaro: 5X GI-P MOM, 5X Anyplex PCR Master Mix (su UDG), GI-P PC, GI-BP IC, vanduo be nukleazių). Rinkinys skirtas žmonių išmatose esančių *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cyclospora cayatanensis* pagausinimui ir identifikavimui taikant RL-PGR;

**GI9801Y „Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay“** (Seegene, P.Korėja) rinkinį sudaro: 5X GI-B(I) MOM, 5X Anyplex PCR Master Mix (su UDG), GI-B(I) PC, GI-BP IC, vanduo

be nukleazių). Rinkinys skirtas žmonių išmatose esančių *Shigella* spp./enteroinvazinės *Escherichia coli* (EIEC), *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Clostridium difficile* B toksino, *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp. pagausinimui ir identifikavimui taikant RL-PGR;

**GI9702Y „Allplex™ GI-Bacteria(II) Assay“** (Seegene, P.Korėja) rinkinį sudaro: 5X GI-B(II) MOM, 5X Anyplex PCR Master Mix (su UDG), GI-B(II) PC, GI-BP IC, vanduo be nukleazių). Rinkinys skirtas žmonių išmatose esančių Shiga toksinų (*stx1/stx2*), enteropatogeninės *Escherichia coli* (EPEC) *eaeA*, enterotoksigeninės *Escherichia coli* (ETEC) *lt/st*, *E.coli* O157, enteroinvazinės *Escherichia coli* (EIEC) *aggR* toksinų genų ir *Clostridium difficile* pagausinimui ir identifikavimui taikant RL-PGR;

**GI9701Y „Allplex™ GI-Virus Assay“** (Seegene, P.Korėja) rinkinį sudaro: 5X GI-V MOM, Real-time One-step Enzyme, 5X Real-time One-step Buffer, GI-V PC, GI-V IC, vanduo be nukleazių). Rinkinys skirtas žmonių išmatose esančių noroviruso GI/GII, rotaviruso A, adenoviruso F (serotipo 40/41), astroviruso, sapoviruso (genograpių G1,2,4) pagausinimui ir identifikavimui taikant RL-PGR.



**12 pav.** Allplex™ rinkinių keturios panelės skirtos pilnam diarėjos sukėlėjų (bakterijų, virusų, pirmuonių) iš išmatų tyrimui (autorės nuotrauka).

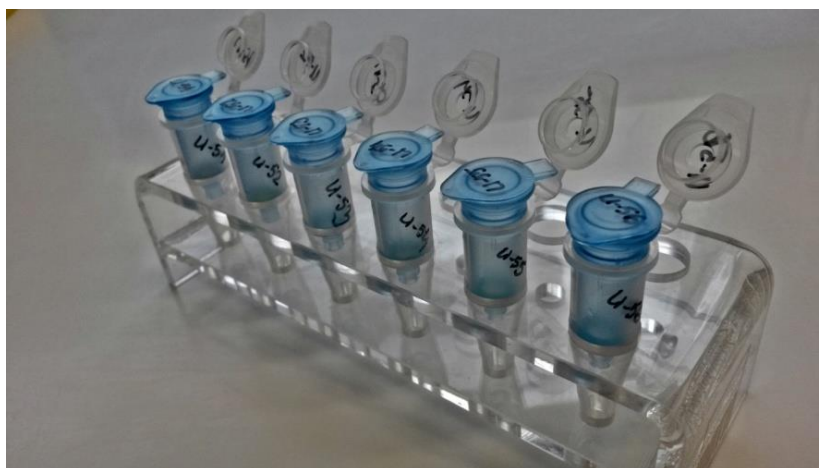
## 2.2. DNR, RNR išskyrimas iš pirminės medžiagos

Sukėlėjų nukleorūgštims išskirti tiesiai iš išmatų mėginių, buvo naudojamas GeneAll Ribospin® vRD Kit rinkinys.

Pirminiam vieno mėginio paruošimui steriliu tamponu ėminiai buvo sumaišomi ir paimta tiriamoji medžiaga išmaišoma 1 ml Buffer FL, 2 ml steriliame Eppendorf'o mėgintuvėlyje. Gautas mišinys 1 min buvo maišomas purtykle ir inkubuojamas 10 min kambario temperatūroje, vėliau centrifuguojamas 2 min 14,000 rpm apskomis. Nusiurbama

iš pradinio mišinio po centrifūgacijos susidariusio 300 µl supernatanto į sterilius 2 ml talpos Eppendorfo mėgintuvėlius, kurie toliau buvo naudojami nukleorūgščių išgavimo etape.

NR išskyrimas toliau buvo tęsiamas pagal GeneAll Ribospin® vRD Kit pateiktą protokolą. 2 ml steriliame Eppendorfe esantis 300 µl gauto mėginio supernatantas sumaišomas su 10 µl kiekviename Allplex™ rinkinyje esančiu vidinės kontrolės tirpalu (GI-BP IC, GI-V IC, GI-P IC) ir 500 µl Buffer VL. Mišinys maišomas pulsuojančia purtykle 10 s ir inkubuojamas 10 min kambario temperatūroje. Į mišinį toliau buvo įpilama 700 µl Buffer RB1 ir maišoma 5 s. Gautas visas mišinys buvo perkeliamas į kolonėlę su stiklo pluošto filtru ir centrifuguojamas 30 s 20,000 x g (14,000 rpm). Pro kolonėlę centrifugavimo metu prasifiltravęs skystis išpilamas. Į kolonėlę toliau buvo įpilama 500 µl Buffer RBW ir vėl centrifuguojama 30 s 14,000 rpm apsucomis. Susidaręs skystis pašalinamas, kolonėlė toliau plaunama 500 µl Buffer RNW ir dar kartą centrifuguojama 30 s. Kad kolonėlėje esantis filtras būtų sausas, tik su sulaikytomis nukleorūgštimis, kolonėlė buvo centrifuguojama dar kartą 1 min 14,000 rpm apsucomis.



**13 pav.** Iš išmatų ėminių išskiriamų nukleorūgščių sulaikymas, plovimas ir atplovimas į sterilią Eppendorfinę talpą naudojant stiklo pluošto kolonėles (autorės nuotrauka).

Toliau buvo vykdomas elucijos (tirpinimo) procesas: kolonėlė perkeliama į sterilią 1,5 ml talpos Eppendorfo mėgintuvėlį (13 pav.), ant kolonėlės stiklo pluošto filtro pilama 50 µl vandens be nukleazių, inkubuojama 1 min kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min 14,000 rpm apsucomis. Gautos nukleorūgštys iš mėginių toliau buvo naudojamos tolimesniame RL-PGR etape, bei saugomos – 80°C temperatūroje.

### 2.3. Realaus laiko polimerazės grandininė reakcija

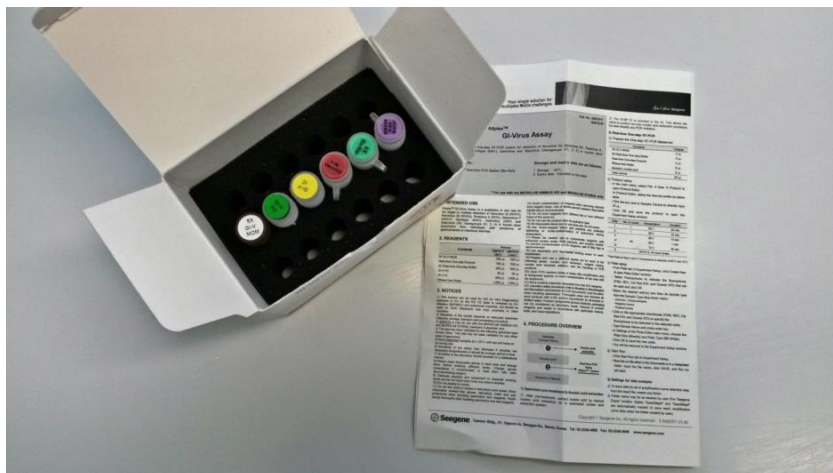
Galimam mikroorganizmui/mikroorganizmams aptikti ir identifikuoti iš išmatų mėginių, buvo taikoma kiekybinė realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (RL-PGR).

Pirmuonių NR pagausinimui ir aptikimui tiriamuosiuose mėginiuose, RL-PGR buvo atliekama naudojant „Allplex™ GI-Parasite“ rinkinį. RL-PGR reakcijos mišinį (vienam pavyzdžiui, 20 µl) sudarė: 5 µl 5X GI-P MOM, 10 µl vandens be nukleazių, 5 µl 5X Anyplex PCR Master Mix;

Bakterijų NR pagausinimui ir aptikimui tiriamuosiuose mėginiuose, RL-PGR buvo atliekama naudojant Allplex™ GI-Bacteria(I) rinkinį. RL-PGR reakcijos mišinį (vienam pavyzdžiui, 20 µl) sudarė: 5 µl 5X GI-B(I) MOM, 10 µl vandens be nukleazių, 5 µl 5X Anyplex PCR Master Mix;

Bakterijų išskiriamų toksinų nukleorūgščių, esančių tiriamuosiuose išmatų mėginiuose pagausinimui ir aptikimui, RL-PGR buvo atliekama naudojant Allplex™ GI-Bacteria(II) rinkinį. RL-PGR reakcijos mišinį (vienam pavyzdžiui, 20 µl) sudarė: 5 µl 5X GI-B(II) MOM, 10 µl vandens be nukleazių, 5 µl 5X Anyplex PCR Master Mix;

Virusų nukleorūgščių, esančių tiriamuosiuose išmatų mėginiuose, pagausinimui ir aptikimui, RL-PGR buvo atliekama naudojant Allplex™ GI-Virus rinkinį (14 pav.). RL-PGR reakcijos mišinį (vienam pavyzdžiui, 20 µl) sudarė: 5 µl 5X GI-V MOM, 8 µl vandens be nukleazių, 5 µl 5X Real-time One-step Buffer, 2 µl Real-time One-step Buffer.



**14 pav.** Allplex™ GI-Virus rinkinys skirtas naudoti virusinių diarėjos sukėlėjų nukleorūgščių gausinimui taikant RL-PGR (autorės nuotrauka).

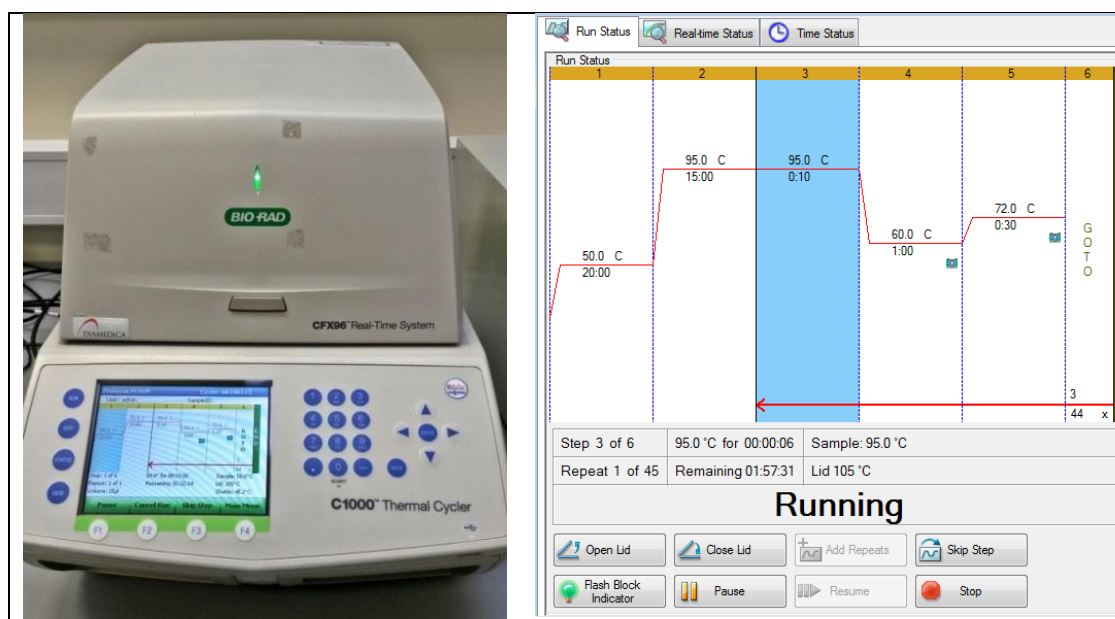
PGR plokštelėje esančiuose šulinėliuose (PCR tubes) į kiekvieną 20 µl paruošto reakcijos mišinio buvo įpilama po 5 µl iš tiriamojo mėginio išskirtų nukleorūgščių. Bendras vieno mėginio reakcijos tūris buvo 25 µl. Papildomai buvo paruošiami teigiamos (PC) ir

neigiamos (NC) kontrolės mišiniai (be tiriamojo mėginio). Paruoštų galutinių mišinių realaus laiko polimerazės grandininė reakcija buvo atlikta naudojant CFX96 Real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories) įrangą (15 pav.), pagal Seegene pateiktą protokolą (3 lentelė).

Naudotame „CFX96 Real-time PCR system“ nukleorūgščių gausinimo aparate momentiška 4-ame ir 5-ame gausinimo etapų metu, parinktais metodui specialiais fluoroforais (FAM, HEX, Cal Red 610, Quasar 670), mėginyje buvo fiksuojamas tam tikro fluoroforo švytėjimas – analizės pagausėjimas (3 priedas).

**3 lentelė.** RL-PGR reakcijos sąlygos. \*4 ir \*5 etapų metu fiksuojamas fluoresuojančių žymenų intensyvumas.

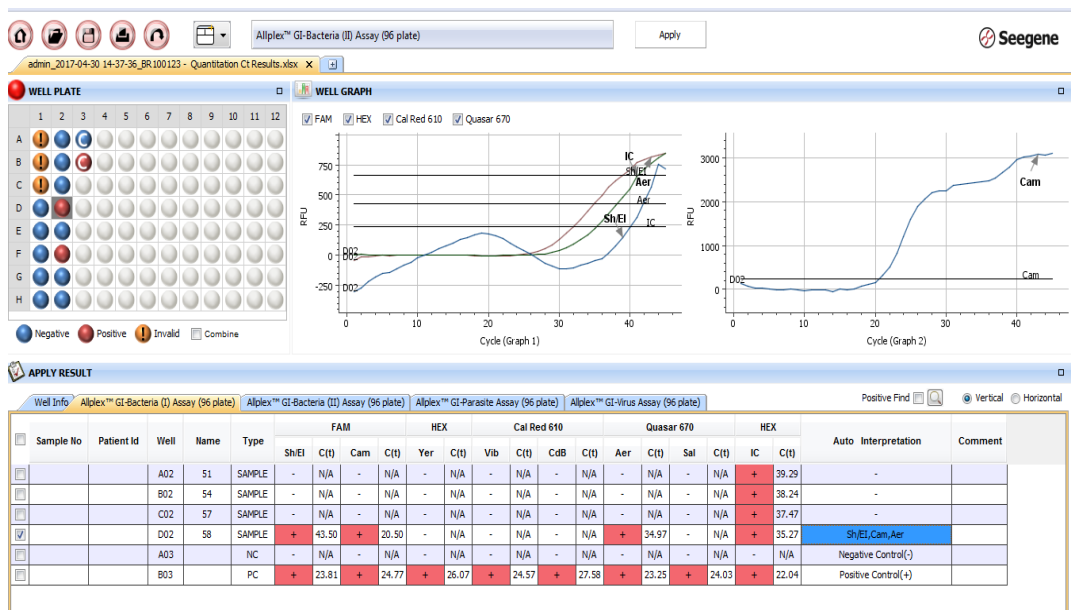
Etapai	Ciklų skaičius	Temperatūra, °C	Trukmė
1.Šildymas	1	50°C	20min
2.Pradinė denatūracija		95°C	15min
3.Denatūracija	45	95	10s
4.Anilinimas *		60	1min
5.Polimerizacija *		72	30s
6.	Grįžimas į 3 etapą, kartojant 44 kartus		



**15 pav.** „CFX96 Real-time PCR system“ (Bio-Rad Laboratories) naudojama įranga nukleorūgščių gausinimui RL-PGR metodu (autorės nuotrauka).

„CFX96 Real-time PCR system“ gauti duomenys grafikų pavidale buvo analizuoti „Seegene viewer“ kompiuterine programa. Programos pagalba pagal gautas kreives ir  $C_T$  vertes buvo interpretuojami tyrimo rezultatai (16 pav., 3 priedas).





16 pav. Duomenų analizė ir interpretavimas Seegene viewer programos pagalba (autorės nuotrauka).

## 2.4. Duomenų apdorojimas ir analizė

Statistiniam kategorinių duomenų skirtumo reikšmingumui įvertinti taikytas neparametrinis Chi-kvadrato ( $\chi^2$ ) kriterijus. Koreliacija tarp tikrinamų požymių laikyta statistiškai reikšminga, kai  $p \leq 0,05$ . Surinkti duomenys buvo analizuoti naudojant IBM SPSS Statistics v.22.0 ir Windows Microsoft Office Excel 2007 programas.

## 3. TYRIMO REZULTATAI

### 3.1. Infekcinių sukėlėjų nustatymas

Vykdam diarejos sukėlėjų analizę iš išmatų, Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (RL-PGR), buvo ištirti 53 vaikų (0–17 m.) išmatų mėginiai. Bendri, molekulinio tyrimo ir klasikinių mikrobiologinių tyrimų rezultatai pateikiami 1 priedo lentelėje. Tiriamąją imtį pagal lytį sudarė 45,3% mergaičių ir 54,7% berniukų (4 lentelė). Atkreipus dėmesį į tiriamosios imties amžių, didžiausią grupę sudarė jaunesni nei 5 metų ( $\leq 5$  metų) amžiaus vaikai – 67,9%, kurioje didžiausią dalį sudarė berniukai (41,5%).

**4 lentelė.** Kryžminė tiriamųjų pasiskirstymo tarp amžiaus grupių ir lyties apibendrinta lentelė ( $p>0.05$ ).

			Amžius		Viso:
			0-5 metai	>5 metai	
Lytis	Mergaitės	Viso:	14	10	24
		Pasiskirstymo dažnis, %	26,4%	18,9%	45,3%
	Berniukai	Viso:	22	7	29
		Pasiskirstymo dažnis, %	41,5%	13,2%	54,7%
Viso:		Viso:	36	17	53
		Pasiskirstymo dažnis, %	67,9%	32,1%	100,0%

Atlikus molekulinio ir tradicinių laboratorinių išmatų tyrimų rezultatų suvestinę, bent vienas diarėjos sukėlėjas, nors vienu iš taikytų metodų, buvo rastas 37-iuose mėginiuose (69,8%). Didžiausią grupę (47,2%) sudarė jaunesnių nei 5 metų amžiaus vaikų išmatų mėginiai, kuriuose rasti infekciniai sukėlėjai. Išskiriant mėginius į teigiamą ir neigiamą (rastas/nerastas sukėlėjas) pagal pacientų lytį, negalime teigti, kad patogeninio mikroorganizmo aptikimas mėginyje priklauso nuo lyties ( $p>0,05$ ) (6 lentelė). Tačiau, berniukų mėginiai, kuriuose rasti diarėjos sukėlėjai, sudarė didžiausią grupę (37,7%).

**5 lentelė.** Kryžminė atvejų skaičiaus, tarp sukėlėjų aptikimo mėginyje ir amžiaus, lentelė ( $p>0,05$ ).

			Amžius		Viso:
			0-5 metai	>5 metai	
Mėginių skaičius	Sukėlėjas rastas	Viso:	25	12	37
		Pasiskirstymo dažnis, %	47,2%	22,6%	69,8%
	Sukėlėjas nerastas	Viso:	10	5	15
		Pasiskirstymo dažnis, %	20,8%	9,4%	30,2%
Viso:		Viso:	36	17	53
		Pasiskirstymo dažnis, %	67,9%	32,1%	100,0%

**6 lentelė.** Kryžminė lentelė atspindinti sukėlėjų aptikimą mėginyje pagal lytį ( $p>0,05$ ).

			Mėginių skaičius		Viso:
			Sukėlėjas rastas	Sukėlėjas nerastas	
Lytis	Mergaitės	Viso:	17	8	25
		Pasiskirstymo dažnis, %	32,1%	15,1%	47,2%
	Berniukai	Viso:	20	8	28
		Pasiskirstymo dažnis, %	37,7%	15,1%	52,8%
Viso:		Viso:	37	16	53
		Pasiskirstymo dažnis, %	69,8%	30,2%	100,0%

RL-PGR tyrimo metu, buvo panaudoti keturi reagentų rinkiniai virusų, bakterijų ir pirmuonių nukleorūgštims aptikti. Jų pagalba tiriamojoje imtyje ( $n=53$ ) iš viso buvo rasti 49

diarėją sukeltantys patogeniniai organizmai (7 lentelė). Iš 25-ių diarėjos sukėlėjų, kuriuos galima aptikti molekulinio metodu, buvo aptiktos 7 bakterijų, 2 viruso ir 2 pirmuonių rūšys. Tuo tarpu Vaikų ligoninės Mikrobiologijos laboratorijoje klasikiniiais laboratoriniais metodais tirtuose tų pačių vaikų išmatų mėginiuose iš viso rasti tik 22 patogeniniai diarėjos sukėlėjai.

**7 lentelė.** Diarėjos sukėlėjai aptikti molekulinio RL-PGR ir klasikiniiais mikrobiologiniais tyrimų metodais.

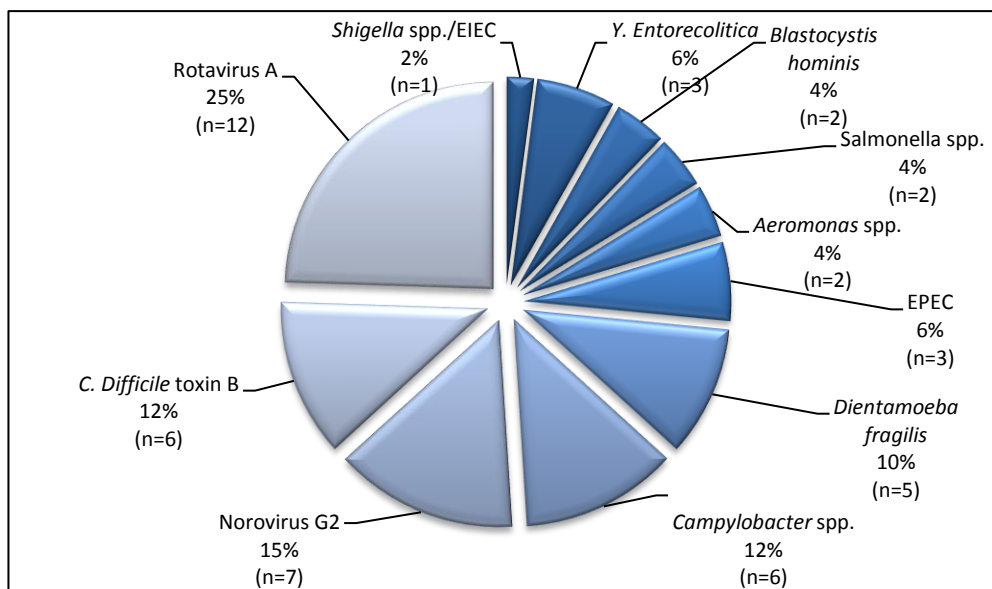
	RL-PGR metodu aptiktų sukėlėjų skaičius	Klasikiniiais laboratoriniais metodais aptiktų sukėlėjų skaičius
<b>BAKTERIJOS</b>		
<i>Shigella</i> spp./EIEC	1	0
<i>Vibrio</i> spp.	0	0
<i>Aeromonas</i> spp.	2	0
<i>Campylobacter</i> spp.	6	3
<i>Y. Entocolitica</i>	3	2
<i>C. Difficile toxin B</i>	6	1
<i>Salmonella</i> spp.	2	4
<i>EHEC</i>	0	0
E. Coli O157	0	0
<i>D. difficile hypervirulent</i>	0	0
<i>EPEC</i>	3	1
<i>ETEC</i>	0	1
<i>EAEC</i>	0	0
<b>VIRUSAI</b>		
<i>Astrovirus</i>	0	0
<i>Sapovirus</i>	0	0
<i>Rotavirus A</i>	12	5
<i>Norovirus G2/G1*</i>	7	0
<i>Adenovirus 40/41</i>	0	0
<b>PIRMUONYS</b>		
<i>Blastocystis hominis</i>	2	2
<i>Dientamoeba fragilis</i>	5	0
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	0	0
<i>Giardia lamblia</i>	0	0
<i>Enatamoeba histolytica</i>	0	0
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	0
Viso:	49	22

\* Noroviruso G1 ir G2 serotipai RL-PGR metodu nustatomi atskirai.



### 3.2. Diarėjos sukėlėjų pasiskirstymas taikant RL-PGR

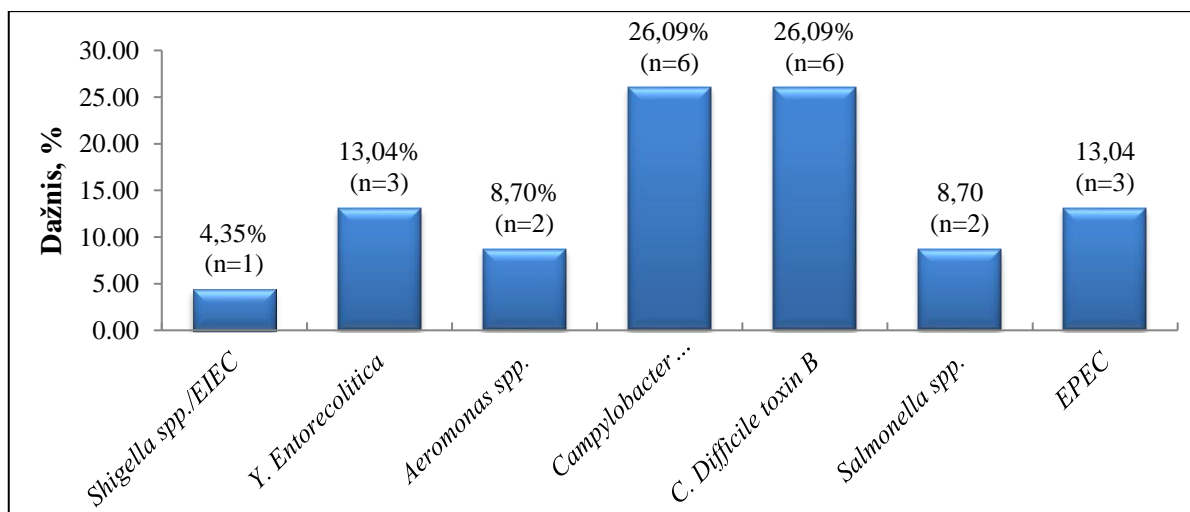
Bendras visų diarėjos sukėlėjų (virusų, bakterijų, pirmuonių) nustatytų RL-PGR metodu pasiskirstymas pavaizduotas 17 paveiksle.



17 pav. RL-PGR metodu nustatytų patogeninių diarėjos sukėlėjų dažnis.

#### 3.2.1. Bakterijų pasiskirstymas

Molekuliniu RL-PGR metodu tiriamojoje (n=53) imtyje pavyko rasti 23 bakterinės kilmės vaikų diarėjos sukėlėjus (7 lentelė), kurie sudarė 46,94% visų molekuliniu metodu rastų sukėlėjų dalį. Didžiausią molekuliniu metodu nustatytų bakterinės kilmės sukėlėjų dalį sudarė *C. difficile* toksiną B gaminanti bakterija (26,09%; n=6) ir *Campylobacter* spp. bakterija (26,09%; n=6) (18 pav.).



18 pav. RL-PGR metodu aptiktų bakterinės diarėjos sukėlėjų pasiskirstymas.

Klasikiniais metodais nustatant *C.difficile* toksiną, iš imunochromatografiniu metodu ištirtų išmatų mėginių, tik vienas mėginys identifiikuotas kaip teigiamas. Iš 53 atvejų *C.difficile* toksinas nebuvo įtartas ir imunochromatografiniu metodu nebuvo tirtas 30-čiai pacientų (8 lentelė).

**8 lentelė.** *Clostridium difficile* toksino B nustatymo rezultatai (n=53).

<i>C.difficile</i> toksinas B	Klasikiniais laboratoriniais metodais				
	RL-PGR	Rasta	Nerasta	Nėra duomenų	Viso:
Teigiama		1	3	2	6
Neigiama		0	19	28	47
Viso:		1	22	30	

Mažiausias rastas sukėlėjų skaičius molekulinio metodu priklauso *Shigella* spp./EIEC ir *Aeromonas* spp., *Salmonella* spp. bakterijoms.

Sudaryta palyginamoji duomenų lentelė (9 lentelė) tarp mėginių rezultatų, taikant skirtingus bakterijų aptikimo laboratorinius (pasėlio ir molekulinį) metodus. Tik septyni mėginiai buvo identifiukuoti kaip teigiami vienai iš bakterijų, ir 27 mėginiai – kaip neigiami, ištyrus abiem laboratoriniais metodais. Tačiau 10-yje mėginių pasėlio metodu enterobakterijų nerasta, o molekulinio metodu – identifiukuoti kaip teigiami bakteriniam sukėlėjui. Be to, net 5 mėginiai, kuriuose molekulinio metodu nebuvo rasta bakterijų nukleorūgščių, pasėlio metodu buvo identifiukuoti kaip teigiami nors vienai enterobakterijai.

**9 lentelė.** Ūminį viduriavimą sukeliančių bakterijų aptikimo laboratoriniais metodais rezultatai (n=53).

Bakterijos	Klasikiniais laboratoriniais metodais				
	RL-PGR	Rasta	Nerasta	Nėra duomenų	Viso:
Teigiama		7	10	0	17
Neigiama		5	27	4	36
Viso:		12	37	4	

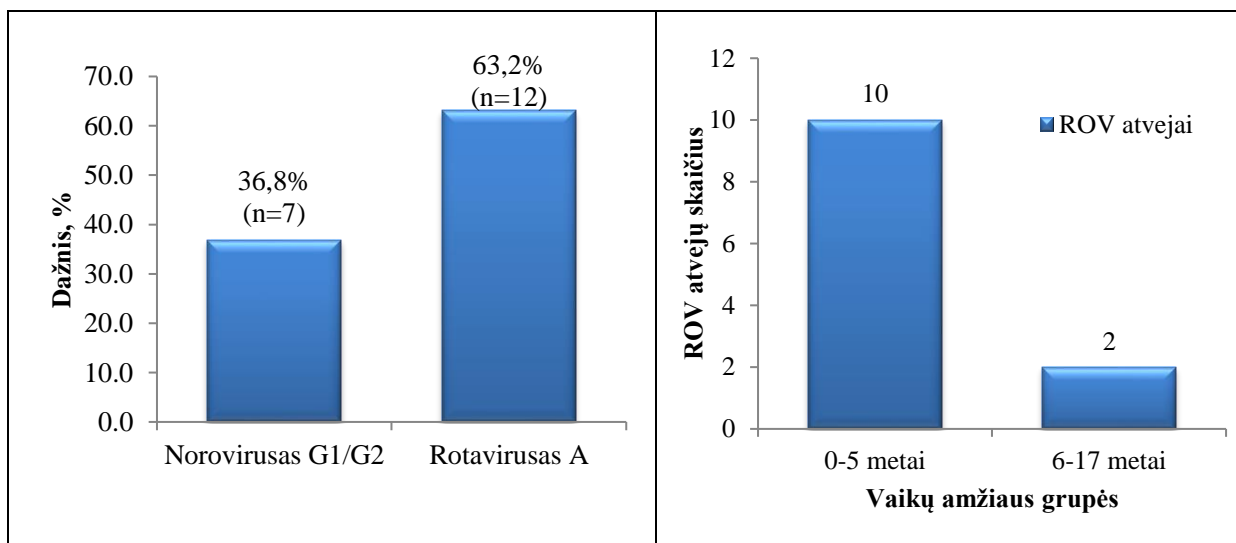
### 3.2.2. Virusų pasiskirstymas

Tiriamajoje imtyje (n=53), molekulinio metodu 17-oje mėginių (32,06%) pavyko aptikti virusų nukleorūgščių (10 lentelė). RL-PGR metodu buvo nustatyti tik dviejų rūšių

virusai – norovirusas G2 ir rotavirusas A, kurie virusinių diarėjos sukėlėjų grupėje pasiskirstė atitinkamai – 36,8% ir 63,2% (19 pav.). Didžiausią virškinimo trakto patogeninių sukėlėjų dažnį sudarė rotavirusas A t.y. 25% (17 pav.). Daugiausia rotavirusinės infekcijų atvejų nustatytas vaikams, jaunesniems nei penkių metų amžiaus (20 pav.). Atlikus RL-PGR ir imunochromatografinio metodo palyginamąją analizę nustatyta, kad 11-oje mėginių (20,75%) PGR buvo aptiktos virusų nukleorūgštys, kuriuose imunochromatografiniu greituoju testu virusų antigenų neaptikta. Taip pat 3-iose mėginiuose RL-PGR metodu nebuvo aptikta viruso NR, o greituoju testu mėginiai identifikuoti kaip teigiami virusui.

**10 lentelė.** Viduriavimą sukeliančių virusų aptikimo laboratoriniais metodais tyrimų rezultatai (n=53).

Virusai	Klasikiniais laboratoriniais metodais			
	Rasta	Nerasta	Nėra duomenų	Viso:
RL-PGR				
Teigiama	5	11	1	17
Neigiama	3	23	10	36
Viso:	8	34	11	

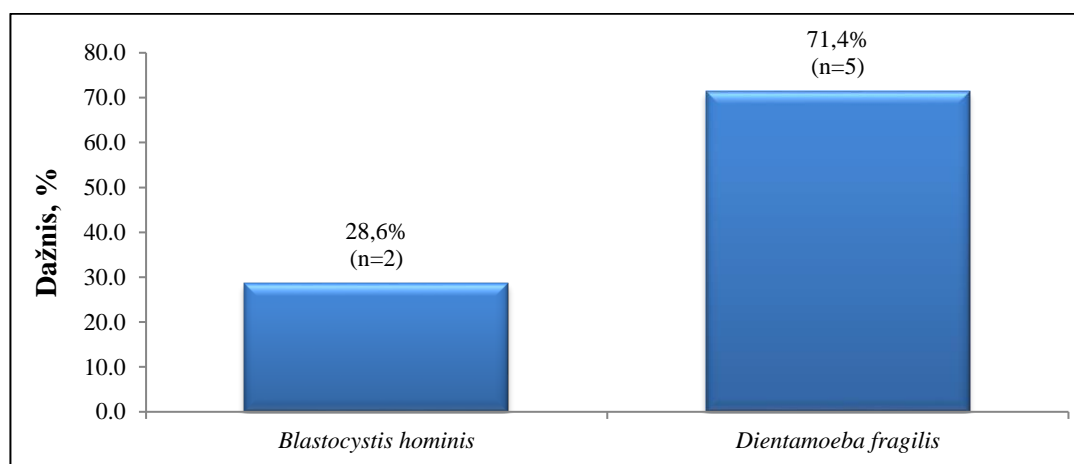


**19 pav.** RL-PGR aptiktų virusinių sukėlėjų pasiskirstymas (n=17).

**20 pav.** Rotavirusinės infekcijos atvejų skaičius, aptiktų RL-PGR metodu (n=12).

### 3.2.3. Pirmuonių pasiskirstymas

Septyniuose (13,21%) išmatų mėginiuose buvo nustatyti dviejų rūšių *Blastocystis hominis* (28,6%) ir *Dientamoeba fragilis* (71,4%) parazitiniai pirmuonys (21 pav.; 11 lentelė).



**21 pav.** Patogeninių pirmuonių aptiktų molekulinio RL-PGR metodu pasiskirstymas mėginiuose (n=7).

Visi septyni pirmuonys, kurių NR aptiktos molekulinio metodu, mikroskopavimo metu buvo nerasti, tuo tarpu, mikroskopuojant aptikti du pirmuonys, kurių NR molekulinio metodu neaptikta (11 lentelė).

**11 lentelė.** Ūminių viduriavimą sukeliančių pirmuonių aptikimo laboratoriniais metodais rezultatai (n=53).

Pirmuonys	Klasikiniais laboratoriniais metodais			
	Rasta	Nerasta	Nėra duomenų	Viso:
Teigiama	0	7	0	7
Neigiama	2	29	15	46
Viso:	2	36	15	

### 3.2.4. Mišrios sukėlėjų grupės

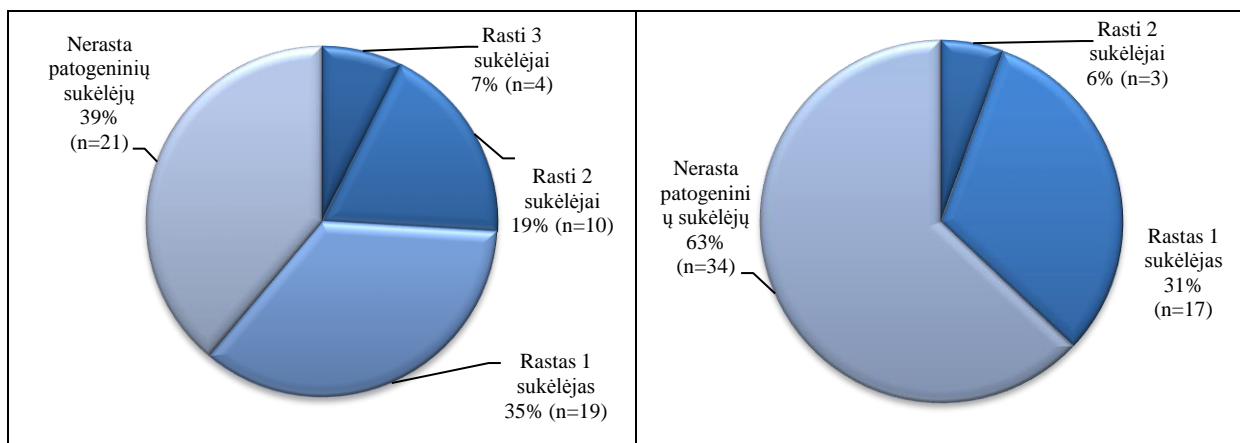
Diarejos sukėlėjų molekulinio metodo tyrimo metu buvo nustatyta keletas mėginių, kuriuose aptikti ne po vieną patogeninį sukėlėją. RL-PGR metodu mišrių patogenų grupės buvo nustatytos dažniau negu tradiciniais laboratoriniais metodais. Iš 33-ių mėginių (22 pav.), kurie teigiami bent vienam diarejos sukėlėjui, net 14-oje jų buvo nustatyti mišrūs diarejos sukėlėjų infekciniai atvejai (12 lentelė). Molekulinio išmatų tyrimo metu buvo aptikti tokie sukėlėjų deriniai: virusas ir virusas, virusas ir bakterija, virusas ir pirmuonis, bakterija ir bakterija, virusas ir dvi bakterijos, trys bakterijos mėginyje.

**12 lentelė.** Mišrūs sukėlėjų deriniai ( $p>0,05$ ) ( $n=14$ ).

Teigiami mėginiai	realaus laiko polimerazės grandininė reakcija												Klasikiniai metodais			
Rotavirusas A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Norovirusas G2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Campylobacter</i> spp.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Salmonella</i> spp.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>C.difficile</i> toksinas B	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Dientamoeba fragilis</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EPEC	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Aeromonas</i> spp.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Shigella</i> spp./EIEC	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>Y.enterocolitica</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

### 3.3. Laboratorinių tyrimų rezultatų palyginimas

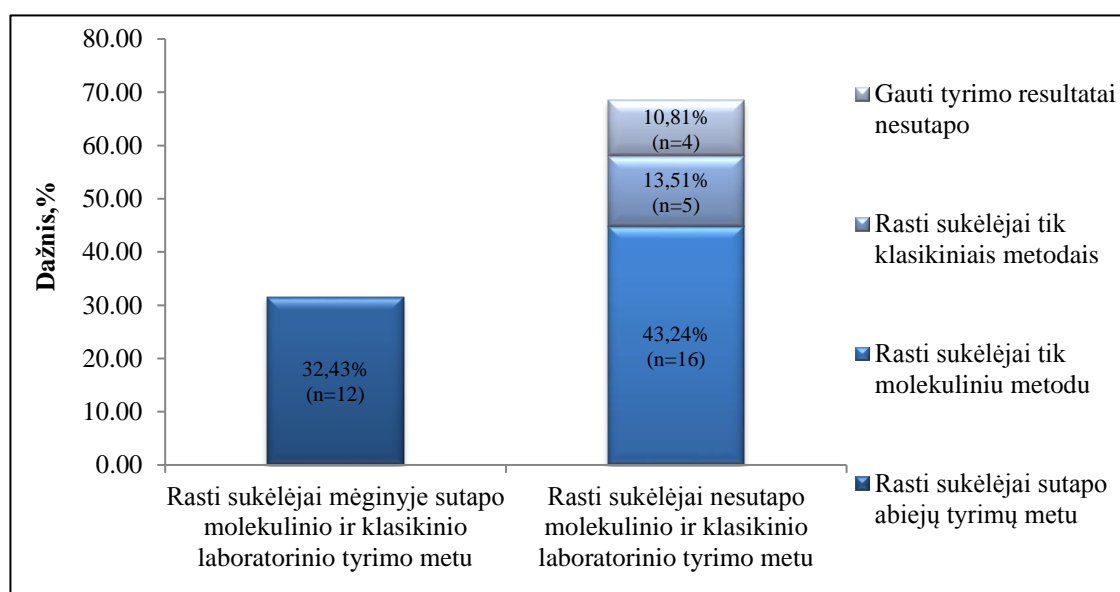
Taikant molekulinį tyrimo metodą, diarėjos sukėlėjų radimui šviežiose išmatose, tiriamojoje imtyje ( $n=53$ ), net 62,26% mėginių buvo identifikuoti kaip teigiami bent vienam patogeniniam diarėjos sukėlėjui (22 pav.). Iš jų: 35% ( $n=19$ ) mėginių identifikuoti kaip teigiami tik vienam patogeniui, 19% ( $n=10$ ) mėginių – teigiami dviem sukėlėjams ir 7% ( $n=4$ ) mėginių buvo teigiami net trimis patogeniniams diarėjos sukėlėjams. Tuo tarpu, klasikiniiais mikrobiologiniais išmatų tyrimų metodais tirtuose mėginiuose, net 63% ( $n=34$ ) mėginių sudarė grupę, kuriuose neaptiktas nė vienas patogeninis diarėjos sukėlėjas. Mažiausią grupę sudarė vos 6% ( $n=3$ ) mėginių, kurie identifikuoti kaip teigiami dviem patogeniniams sukėlėjams, o likusieji 31% ( $n=17$ ) buvo teigiami vienam patogeniniam vaikų diarėjos sukėlėjui (23 pav.).



**22 pav.** Rastas sukėlėjų skaičius mėginyje, ištyrus RL-PGR metodu ( $n=53$ ).

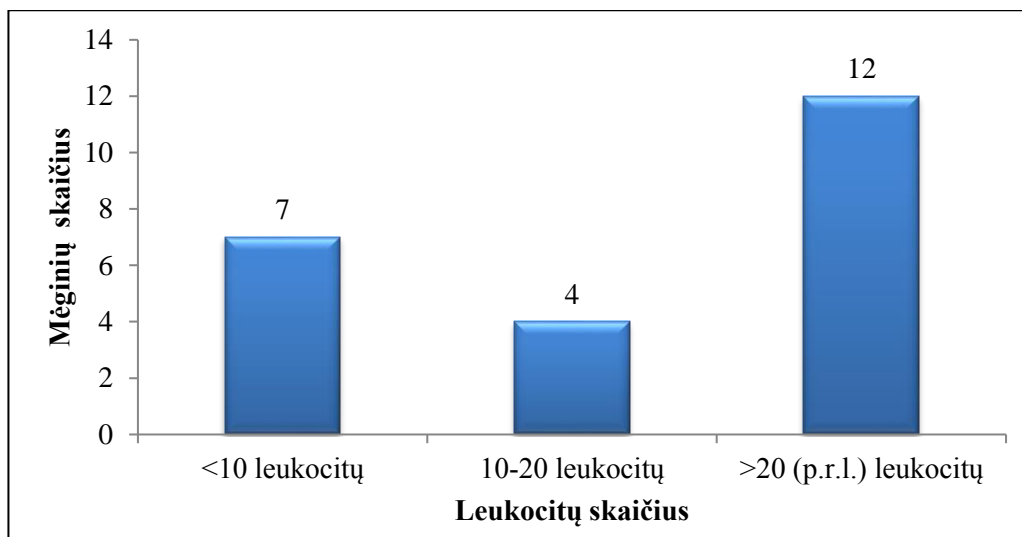
**23 pav.** Rastas sukėlėjų skaičius mėginyje, ištirtuose klasikiniiais laboratoriniais mikrobiologiniais metodais ( $n=53$ ).

Iš 37-ių mėginių, kurie identifikuoti kaip teigiami bent vienam sukėlėjui (molekuliniu ir/arba klasikiniu mikrobiologiniu metodu) (24 pav.), pastebėta, kad mėginių grupę, kurių tyrimų rezultatai sutampa bent vienam diarėjos sukėlėjui sudaro 32,43%. Didžiausią mėginių dalį, 67,57% (n=25) atvejų, mėginiai buvo identifikuoti kaip teigiami bent vienam sukėlėjui tik vienu iš taikytų laboratorinių metodų (molekuliniu arba klasikiniu mikrobiologiniu) arba abiem metodais, tačiau gauti tyrimų rezultatai nesutapo. Iš šių mėginių, pagal tiriamąjį metodą, 16-oje ištirtų mėginių sukėlėjai rasti tik molekuliniu RL-PGR metodu, 5-iuose mėginiuose diarėjos patogeniniai sukėlėjai rasti tik klasikiniiais mikrobiologiniais metodais, o 4-juose tirtuose mėginiuose – sukėlėjai buvo rasti abiem laboratoriniais metodais, tačiau tyrimų rezultatai nesutapo.



**24 pav.** RL-PGR ir klasikiniiais laboratoriniais metodais gautų tyrimų rezultatų sutapimą vaizduojanti diagrama.

Koprologinis tyrimas – yra vienas iš pagrindinių išmatų laboratorinių tyrimo metodų. Šiame darbe, buvo atkreiptas dėmesys į rastus pirmuonis ir leukocitų skaičių išmatų mėginyje. Pagal baltųjų kraujo kūnelių skaičių (regimajame lauke) ir abiejų tyrimų metodų, teigiamą/neigiamą sukėlėjams tyrimo atsakymą, sudaryta palyginamoji stulpelinė diagrama (25 pav.). Turimi rezultatai rodo, kad daugiausia (n=12) mėginių identifikuoti kaip teigiami bent vienu iš tyrime naudotų metodų, esant daugiau nei 20 leukocitų (pilnam regėjimo laukui) regimajame mikroskopavimo lauke.



**25 pav.** Mėginių, kuriuose bent vienu iš metodų aptiktas sukėlėjas, pasiskirstymas pagal leukocitų skaičių mėginyje.

#### 4. Rezultatų aptarimas

Šio tyrimo metu siekta išanalizuoti molekulinio RL-PGR metodu išmatų mėginius vaikų (0-17 m.), besiskundžiančių pasikeitusiu tuštinimosi pobūdžiu – įtariant gastroenteritą, bakterines, virusines ir kitas virškinimo trakto infekcijos priežastis. Taip pat siekta palyginti gautus rezultatus su klasikinių laboratorinių metodų tyrimų rezultatais. Diagnostinėse laboratorijose naudojami įvairūs molekuliniai tyrimo metodai. Vienas iš plačiausiai klinikiniuose tyrimuose pritaikomų molekulinės diagnostikos metodų – realaus laiko polimerazės grandininė reakcija [53, 57]. Tyrimo metu molekulinis metodas buvo pasirinktas diarėjos sukėlėjų analizei dėl ypač aukšto metodo jautrumo aptinkant net labai mažą patogeninio sukėlėjo NR kiekį, kurį sudėtinga įvertinti taikant klasikinius laboratorinius metodus [23, 52]. Mūsų tyrimo metu NR gausinimui, buvo naudotas pilnas (keturių panelių) reagentų rinkinys, kuris rekomenduojamas naudoti tyrimuose esant ūmaus gastroenterito, „keliautojų“ diarėjos atvejais [56, 58]. Kadangi vaikų organizme daugelis suaugusiems netokių pavojingų mikroorganizmų yra svarbūs kaip galimi sunkių virškinimo trakto infekcijų sukėlėjai, buvo svarbu ištirti visus galimus diarėjos sukėlėjų variantus. Literatūroje plačiai minima, jog visame pasaulyje daugiausia nuo diarėjos kenčia ir miršta vaikai iki 5-erių metų amžiaus [59]. Šiame tyrime taip pat buvo pastebėta, jog vaikai  $\leq 5$  metų amžiaus sudarė didžiausią, beveik 70%, tiriamųjų grupę. ULAC pateikiamose metinėse ataskaitose matome, kad visoje šalyje didžiausia infekcinėmis ligomis sergančiųjų yra berniukų, jaunesnių 5 metų amžiaus, grupė [15], šiuos duomenis mūsų tyrimas taip pat patvirtina.

Taigi, iš 53-jų mėginių, 62,23% (n=33) mėginių buvo aptikti 49 patogenai molekulinio metodu ir 20-yje (37,74%) mėginių 22 patogenai tradiciniais laboratoriniais

metodais. Tai parodo, kad beveik 25% daugiau mėginių, molekulinio metodu buvo įvertinti kaip teigiami vienam iš sukėlėjų, lyginant su tradiciniais tyrimų metodais. Y.ZBOROMYRSKA su kolegomis analizuodami keliautojų diarėjos atvejus tyrime įrodė, kad Seegene Allplex reagentai, įvairiems sukėlėjams aptikti, pasižymi aukštu jautrumu ir specifiškumu (*Shigella* spp. 100% ir 100%, EAEC 81,3% ir 96,2%, *B.hominis* 100% ir 67,6%, norovirusas G1/G2 87,5% ir 96,3%, ETEC 50% ir 90,6%) [55]. Taip pat aukštą specifiškumą (100%) ir jautrumą (100%) bakterijų NR aptikimui (naudojant Seegene Allplex Gastrointestinal Panel) įrodė H.DUNN su kolegomis [56].

Analizuojant molekulinio tyrimo (vykdyto 2016 01 – 2017 04 laikotarpiu) rezultatus, matomas įvairių diarėjos sukėlėjų pasiskirstymas. Tiriamajame darbe daugiausia mėginių buvo identifikuoti kaip teigiami (mažėjimo tvarka) rotavirusui (25%), *C.difficile* (12%), norovirusui (15%), *Campylobacter* spp. (12%), *Dientamoeba fragilis* (10%) diarėjos sukėlėjams. Pagal ULAC pateiktą to paties laikotarpio užkrečiamų ligų statistiką rotavirusinė infekcija sudarė 18,1%, kampilobakteriozė 4,1%, Norwalk viruso sukelta 3,5%, salmoneliozės 2,6%, infekcijos – buvo pasireiškusios dažniausiai sergančiųjų infekcinėmis ligomis vaikų tarpe (1 pav.) [39, 15]. Tačiau didelę dalį enteritų sudaro nenustatyti bakterinės (18,4%) ir virusinės kilmės (24,0%) sukėlėjai [15]. Toks didelis procentas nepatvirtintų infekcijos sukėlėjų atvejų galimas dėl klaidingai neigiamų tyrimo rezultatų, apsunkinto bakterijų augimo mitybinėse terpėse, dėl pakitusių virusų antigeninių determinančių arba nepilno spektro infekcinių virškinimo trakto sukėlėjų ištyrimo [60].

Nors buvo didelė mėginių dalis įvertinta kaip teigiama įvairiems sukėlėjams, rezultatuose pastebėjome, kad keliuose mėginiuose (9-11 lentelė) mikroorganizmai buvo aptikti tradiciniais mikrobiologiniais metodais, bet neaptiktos tų mikroorganizmų NR molekulinio metodu. Norėdami išsiaiškinti, kodėl molekulinio metodu neaptikome NR, atkreipėme dėmesį į atliktų tyrimų datas, ir pastebėjome, kad dalis išmatų buvo paimti molekuliniam tyrimui 4-5 dienomis vėliau, nei buvo atlikti pirmieji mikrobiologiniai tyrimai. Taigi, buvo tirti skirtingu laiku paimti išmatų ėminiai. Taip pat papildomai buvo pasidomėta apie tų pačių pacientų gydymą medikamentais. Pastebėta, kad kai kuriais atvejais prieš pakartotinį išmatų tyrimą pacientai jau buvo vartoję mikroorganizmus naikinančius antibiotikus (Biseptol/Gentamycini). Todėl, padarėme išvadą, kad antibiotikų poveikyje, dėl nuslopintos sukėlėjų biosintezės ir skirtingo ėminių paėmimo laiko (per kurį galėjo pasišalinti sukėlėjų NR), molekulinio metodu atliktame tyrime šių pacientų išmatose sukėlėjų nukleorūgščių nebuvo aptikta.

Taip pat, analizuojant bakterijų aptikimo rezultatus buvo nustatyta, kad, septyni mėginiai (13,21%) buvo identifikuoti bakteriniam sukėlėjui abiem, molekulinio ir klasikiniais,



tyrimų metodais. Tačiau net 10-yje mėginių (18,87%) – bakteriniai sukėlėjai aptikti tik molekulinio metodu (pasėlio metodu – bakterijų nerasta). Remdamiesi Y.ZBOROMYRSKA tyrimo metu gautais aukštais molekulinio tyrimo specifiškumo rezultatais, darėme prielaidą, kad bakterijos pasižymėdamos apsunkintu augimu mitybinėje terpėje, gali net nesudaryti kolonijų, ko pasekoje galimas klaidingai neigiamas atsakymas apie bakterijų kolonijų nesuformavimą mitybinėje terpėje [17, 55, 61]. Todėl, šiuo atveju galima teigti, kad molekulinio RL-PGR metodu buvo nustatyta daugiau bakterijų dėl amplifikacijos metu pagausintų bakterijoms specifinių nukleorūgščių.

*C.difficile* toksinas ir virusų antigenai tiriami greitaisiais imunochromatografiniais testais (klasikinis mikrobiologinis metodas). Analizuojant rezultatus, greituoju testu tik vienas mėginys buvo įvertintas kaip teigiamu *C.difficile* toksinui, o RL-PGR iš viso toksinui teigiami buvo net 6 mėginiai (8 lentelė). Deja, iš šių 6-ių mėginių, net 2 pacientams nebuvo atliktas *C.difficile* tyrimas, o kiti trys mėginiai buvo neigiami toksino aptikimui (imunochromatografiniu metodu). Nors *C.difficile* ištyrimui gydytojai nusprendžia tyrimą atlikti ne visais enterito atvejais, o dažniau esant ilgiems vandeningo viduriavimo bei ilgo gydymo antibiotikais laikotarpiui, tačiau tai sumažina pilną diarėjos sukėlėjų ištyrimą ir padidina infekcijos sukėlėjų klaidingai neigiamų atsakymų skaičių [61, 62]. Analizuojant virusinius sukėlėjus, išmatų mėginiai taip pat buvo tirti naudojant specifiniams virusų antigenams imunochromatografinius testus. Tačiau ir čia, PGR metodu 17-a mėginių (32,06%) teigiami virusiniam sukėlėjui, iš kurių net vienuolika buvo įvertinti kaip neigiami virusiniams sukėlėjams greito testo metu. STOCKMANN straipsnyje nurodoma, jog moksliniais tyrimais jau įrodytas imunochromatografinio tyrimo žemas jautrumas nustatant virusus išmatose, kuris siekia vos 35 – 52% [3]. Norint palyginti molekulinio PGR metodu gautus RoV duomenis su ULAC pateiktais rotavirusinės infekcijos susirgimais šalyje, buvo sudaryta diagrama (20 pav.). Pastebėjome, jog tyrime didžiausias rotavirusinių infekcijų skaičius buvo aptiktas 0 – 3 metų amžiaus vaikams [15]. Mūsų tyrimo rezultatai atitinka ULAC pateiktus metinius duomenis, kad didžiausias sergamumas rotavirusine infekcija yra  $\leq$  5 metų amžiaus vaikų grupėje [15].

Nors pirmuonys, sukeltantys infekcinius gastroenteritų atvejus Lietuvoje, sudaro vos pavienius atvejus (0,1% diarėjų atveju), tačiau negydant jie gali sukelti labai pavojingus, net mirtinus atvejus. RL-PGR metodu iš šešių galimų aptikti pirmuonių, buvo aptiktos dvi rūšys: *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*. Tyrimo metu buvo septyni mėginiai, teigiami vienam iš šių pirmuonių. Tačiau, buvo pastebėta, kad šiuose mėginiuose, mikroskopavimo metu pirmuonių nebuvo aptikta. Kadangi vadovavomės atliktais tyrimais, įrodančiais aukštą molekulinio metodo jautrumą [55, 56], manome, kad mikroskopavimo

rezultatai buvo klaidingai neigiami dėl per žemo mikroskopavimo jautrumo [17]. Taip pat, pagal laboratorinius standartus yra žinoma, kad teisingam mėginio ištyrimui yra labai svarbūs etapai, tokie kaip paciento pasiruošimas ėminio paėmimui, tiriamojo ėminio surinkimas, transportavimo ir laikymo sąlygų laikymasis, tinkamas medžiagos paruošimas, tiriančiojo gebėjimas interpretuoti matomą vaizdą ir kiti veiksniai [61]. Reikia prisiminti ir molekulinio metodo privalumus, aptinkant net ir negyvybingų mikroorganizmų genetinę informaciją (NR) mėginyje [60]. Remiantis tyrimo rezultatais, galime teigti, jog molekulinio metodu buvo nustatyti net septyni mėginiai, kurie galimai dėl žemo mikroskopavimo jautrumo ir specifiškumo, buvo įvertinti kaip klaidingai neigiami [17].

Atlikdami diarėjos sukėlėjų tyrimą iš išmatų molekulinio RL-PGR metodu, rezultatus apie sukėlėjus gavome kelių valandų laikotarpyje nuo tyrimo pradžios. Pilnas nukleorūgščių iš išmatų išskyrimas truko apie 60 min., amplifikacija ir aptikimas RL-PGR metu truko apie 2 val. 40 min. Apie greitą virškinimo trakto sukėlėjų ištyrimą iš išmatų molekuliniais metodais, mokslinių darbų metu patvirtino ir kiti tyrėjai [55, 56]. Taigi, atliekant RL-PGR tyrimą, kliniciстą apie virškinimo trakto sukėlėjus galima informuoti net tą pačią dieną nuo mėginio gavimo.

Taigi, pagal turimus molekulinio ir tradicinių mikrobiologinių tyrimų analizės rezultatus, galima daryti išvadą, kad molekulinis išmatų tyrimas yra greitesnis ir aptinkantis daugiau diarėjos sukėlėjų vienu tyrimu negu tradiciniai mikrobiologiniai metodai.

## IŠVADOS

1. Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje iš virškinimo sistemos sutrikimus turinčių vaikų (0-17 m.) išmatų, RL-PGR metodu buvo nustatyti šie infekciniai gastroenterokolito sukėlėjai: 6 bakteriniai (*Shigella* spp., *Y.enterocolitica*, *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *C.difficile* (toksinas B), *Salmonella* spp., EPEC), 2 virusiniai (Norovirusas G2, rotavirusas A), 2 pirmuonys (*Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis*).
2. Daugiausia infekcinės kilmės diarėjos atvejų vaikų (0-17 m.) grupėje sudarė virusinės kilmės infekcijos, sukeltos rotaviruso (25%), noroviruso (15%) ir bakterinės, *C.difficile* (12%), *Campylobacter* spp. (12%) kilmės infekcijos.
3. RL-PGR metodu nustatytas didesnis infekcinės diarėjos sukėlėjų, mišrių infekcinių atvejų skaičius, lyginant su tradiciniais mikrobiologiniais tyrimų rezultatais. Molekulinis tyrimo metodas yra pranašesnis būdas nustatant diarėjos sukėlėjus iš išmatų mėginių, nei klasikiniai mikrobiologiniai metodai, nes:
  - RL-PGR metodu aptinkamos iš išmatų mėginio išskirtos sukėlėjų nukleorūgštys, nustatant net ypač mažus genetinės informacijos kiekius;
  - RL-PGR metodu vienu kartu yra ištiriamas pilnas gastroenterokolito sukėlėjų spektras, sudarant galimybę aptikti mišrius infekcinio virškinimo trakto atvejus;

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. TAFTI Z.S.M., RAHBAR M., ESLAMI P., HASHEMI S.H.R., HAJIA M., DORI M.G., ABDINIA B. A survey of the epidemiology and antibiotic resistance patterns of enteropathogens isolates in a n Iranian hospital. *International Journal of enteric Pathogens*. 2016, **4**: 0 – 3.
2. EL-SHABRAWI M., SALEM M., ABOU-ZEKRI M., EL-NAGHI S., HASSANIN F., EL-ADLY T., EL-SHAMY A. The burden of different pathogens in acute diarrhoeal episodes among a cohort of Egyptian Children less than five years old. *Przegląd Gastroenterologiczny*. 2015, **10**: 173 – 180.
3. STOCKMANN C., ROGATCHEVA M., HARREL B., VAUGHN M., CRISP R., PORITZ M., THATCHER S., KORGENSKI E.K., BARNEY T., DALY J. IRPAVIA A.T. How Well Does Physician Selection of Microbiologic Tests Identify *Clostridium difficile* and other Pathogens in Paediatric Diarrhoea? Insights Using Multiplex PCR-Based Detection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015, **21**: 9 – 15.
4. RINTALA A., MUNUKKA E., WEINTRAUB A., ULLBERG M., EEROLA E. Evaluation of a multiplex real-time PCR kit Amplidiag® Bacterial GE in the detection of bacterial pathogens from stool samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2016, **128**: 61 – 65.
5. GUARINO A., ALBANO F., ASHKENAZI S., GENDREL D., HOEKSTRA H., SHAMIR R., SZAJEWSKA H. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases Evidence-based Guidelines for the Management for Acute Gastroenteritis in Children in Europe. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2008, **46**: 81 – 122.
6. VALANTINAS J., KUPČINSKAS L IR KT. Klinikinė gastroenterologija. Ketvirtoji pataisyta ir papildyta laida. UAB „Vaistų žinios“. Vilnius, 2010. Psl.: 99 – 121. ISBN 978-9955-884-36-1.
7. FAURE C. Role of Antidiarrhoeal Drugs as Adjunctive Therapies for Acute Diarrhoea in Children. *International Journal of Pediatrics*. 2013, **2013**: 1–14.
8. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Sergamumo užkrečiamosiomis ligomis Lietuvoje 2011 m. apžvalga. Vilnius: ULAC; 2012.
9. FIEDORUK.K., DANILUK T., ROZKIEWICZ D., ZAREMBAA M.L.,OLDAK E., SIEPUK M., LESZCZYŃKA K. Conventional and molecular methods in the diagnosis of community-acquired diarrhoea in children under 5 years of age from the north-eastern region of Poland.*International Journal of Infectious Diseases*. 2015, **37**: 145 – 15.

10. WHYTE L.A., AL – ARAJI R.A., MCLOUGHLIN L.M. Guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*. 2015, **100**: 308 – 312.
11. ELLIOTT E.J. Acute gastroenteritis in children. *BMJ*. 2007, **334**: 35 – 40.
12. ESMAEILI DOOKI MR., RAJABNIA R., BARARI SAWADKOHI R., MOSAIEBNIA GATABI Z., POOMASROLLAH M., MIRZAPOUR M. Bacterial enteropathogens and antimicrobial susceptibility in children with acute diarrhea in Babol, Iran. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2014, **5**: 30 – 34.
13. PENSABENE L., TALARICO V., CONCOLINO D., CILIBERTO D., CAMPANOZZIA., GENTILE T., STAIANO A. Postinfectious Functional Gastrointestinal Disorders in Children: A Multicenter Prospective Study. *The Journal of Pediatrics*. 2015, **166**: 903 – 907.
14. VELIJEVAITĖ R. Viduriavimo gydymo gairės. Medpraktika.lt. portalas medikams. 2012. (žiūrėta: 2016.12.14).
15. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Metinės ataskaitos. <http://www.ulac.lt/ataskaitos> (žiūrėta 2017.05.22)
16. AL JAROUSHA AM, EL JAROU MA, EL QOUQA IA. Bacterial Enteropathogens and Risk Factors Associated with Childhood Diarrhea. *Indian Journal of Pediatrics*. 2011, **78**:165 – 170.
17. HALLIGAN E., EDGEWORTH J., BISNAUTHSING K., BIBLE J., CLIFF P., AARONS E., KLEIN J., PATEL A., GOLDENBERG S. Multiplex molecular testing for management of infectious gastroenteritis in a hospital setting: a comparative diagnostic and clinical utility study. *Clin Microbiol Infect*. 2014, **20**: 460 – 467.
18. Vilniaus universitetas. Rotavirusinė infekcija. Mokomoji knyga. Vilnius, 2006. ISBN 9955-449-99-3
19. FIRANTIENĖ R., SASNAUSKIENĖ S., ĖMUŽYTĖ R. Polimerazės grandininės reakcijos diagnostinio metodo ypatumai. *Laboratorinė medicina*. 2009, **41**: 43 – 50.
20. RIBAS ML., TEJERO Y., CORDERO Y., RODRIGUEZ M., PEREZ – LASTRE J., TRIANA T., GUERRA M., AULLON L., ESCALANTE G., HADAD J. Detection of rotavirus and other enteropathogens in children hospitalized with acute gastroenteritis in Havana, Cuba. *Archives of Virology*. 2015, **160**: 1923 – 1930.
21. SIDOTI F., RITTA M., COSTA C., CAVALLO R. Diagnosis of viral gastroenteritis: limits and potential of currently available procedures. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2015, **9**: 551 – 561.
22. HUMPHRIES R.M., LINSKOTT A.J. Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev*. 2015, **28**: 3 – 31.

23. FREEMAN K., TSERTSVADZE A., TAYLOR-PHILLIPS S., MCCARTHY N., MISTRY H., MANUEL R., MASON J. Agreement between gastrointestinal panel testing and standard microbiology methods for detecting pathogens in suspected infectious gastroenteritis: Test evaluation and meta-analysis in the absence of a reference Standard. *Plos One*. 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0173196.
24. MANDAL A. 2013. Diarrhea Epidemiology. Interneto prieiga: <http://www.news-medical.net/health/Diarrhea-Epidemiology.aspx> (žiūrėta 2015.11.13).
25. VINGRAS A., SIMANAUSKAS K. Vaikų ūminės žarnyno infekcinės ligos. Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas. 2007, **4**: 279 – 286.
26. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Užkrečiamos ligos. Ešerichiozė. Interneto prieiga: <http://www.ulac.lt/ligos/E/eserichioze> (žiūrėta 2017.02.10).
27. LU, L., JIA, R. & ZHONG, H. Molecular characterization and multiple infections of rotavirus , norovirus , sapovirus , astrovirus and adenovirus in outpatients with sporadic gastroenteritis in Shanghai, China, 2010–2011. 2015, **160**: 1229 – 1238.
28. Microbiologyinpictures.com. Echerichia coli. Interneto prieiga: <http://www.microbiologyinpictures.com/escherichia%20coli.html> (žiūrėta 2017.02.10).
29. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Salmoneliozės profilaktikos ir kontrolės metodinės rekomendacijos. 2014, Vilnius. ISBN 978-609-454-116-2. Interneto prieiga: <http://www.ulac.lt/metodines-rekomendacijos> (žiūrėta 2017.02.10).
30. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Užkrečiamos ligos. Kampilobakteriozė. Interneto prieiga: <http://www.ulac.lt/ligos/K/kampilobakterioze> (žiūrėta 2017.02.10).
31. World Health Organization. Campylobacter (Fact sheet. Updated December 2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>(žiūrėta 2017.02.10).
32. PO-LIN CHEN, CHI-JUNG WU, WEN-CHIEN KO. Aeromonas species. Interneto prieiga: <http://www.antimicrobe.org/b74.asp> (žiūrėta 2017.02.10).
33. World Health Organization. Aeromonas. Interneto prieiga: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/admicrob2.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob2.pdf) (žiūrėta 2017.02.10).
34. J. MICHAEL JANDA, SHARON L. ABBOTT. The Genus Aeromonas: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbioly Reviews*. 2010, **23**: 35 – 73.
35. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Vilniaus Universiteto Infekcinių Ligu, Dermatovenerologijos ir Mikrobiologijos klinika. Pirmuonių sukeltų žarnyno ligų (amebiasės, giardiazės (lambliazės), balantidiazės, kriptosporidiazės) epidemiologinė priežiūra, klinika, diagnostika ir gydymas (Metodinės rekomendacijos). Vilnius. 2009.

36. Užkrečiamųjų ligų ir aids centras. Rotavirusinės infekcijos profilaktika ikimokyklinio ugdymo įstaigose. 2011, Vilnius. ISSN 2029-8617 Interneto prieiga: <http://www.ulac.lt/metodines-rekomendacijos> (žiūrėta 2017.02.10).
37. TATE J.E., BURTON A.H., BOSCHI – PINTO C., STEELE A.D., DUQUE J., PARASHAR U.D. 2008 estimate of worldwide rotavirus – associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta – analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2012, **12**: 136 – 141.
38. BUČYTĖ S. Rotavirusų sukeltas vaikų viduriavimas – didelė mažylių bėda. *Farmacija ir laikas*. 2005, **3**: 42 – 43.
39. Užkrečiamųjų ligų ir aids centras. Norovirusinė infekcija. Protrūkių valdymas ir profilaktika vaikų ugdymo įstaigose. Metodinės rekomendacijos. 2013, Vilnius. ISSN 2029-8617. Interneto prieiga: <http://www.ulac.lt/metodines-rekomendacijos> (žiūrėta 2017.02.10).
40. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Vilniaus miesto klinikinė ligoninė. Clostridium difficile infekcijos epidemiologija ir profilaktika (Metodinės rekomendacijos). Vilnius. 2011. <http://www.ulac.lt/uploads/downloads/clostridium%20difficile.pdf>.
41. Užkrečiamųjų ligų ir AIDS centras. Sergamumo užkrečiamosiomis ligomis Lietuvoje 2011 m. apžvalga. Vilnius: ULAC; 2012.
42. ÖGREN J., VAN NGUYEN S., NGUYEN M.K., DIMBERG J., MATUSSEK A. Prevalence of Dientamoeba fragilis, Giardia duodenalis, Entamoeba histolytica/dispar, and Cryptosporidium spp in Da Nang, Vietnam, detected by a multiplex real-time PCR. *APMIS*. 2016, **124**: 529 – 533.
43. HOLTMAN G.A., KRANENBERG J.J., BLANKER M.H., OTT A., LISMAN-VAN LEEUWEN L., BERGER M.Y. Dientamoeba fragilis colonization is not associated with gastrointestinal symptoms in children at primary care level. *Family Practice*. 2017, **34**: 25 – 29.
44. ÖGREN J., DIENUS O., LÖFGREN S., IVEROTH P., MATUSSEKA. Dientamoeba fragilis DNA detection in Enterobius vermicularis eggs. *Pathogens and Disease*. 2013, **69**: 157 – 158.
45. RÖSER D., NEJSUM P., CARLSGART A.J., NIELSEN H.V., STENSVOLD C.R. DNA of Dientamoeba fragilis detected within surface-sterilized eggs of Enterobius vermicularis. *Experimental Parasitology*. 2013, **133**: 57 – 61.
46. SANCHEZ-VEGA J.S., CABRERA-FUENTES H.A., ROMERO-OLMEDO A.J., ORTIZ-FRIAS J.L., SOKOLINA F., BARRETO G. Cyclospora cayetanensis: This Emerging Protozoan Pathogen in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014, **90**: 351 – 353.

47. JONG M.J., KORTERINK J.J., BENNINGA M.A., HILBINK M., J. WIDDERSHOVEN, DECKERS-KOCKEN J.M. *Dientamoeba fragilis* and chronic abdominal pain in children: a case-control study. *Arc Dis Child*. 2014, **99**: 1109 – 1113.
48. BEDNARSKA M., BAJER A., WELC-FALECIAK R., PAWELAS A. Cyclospora cayetanensis infection in transplant traveller: a case report of outbreak. *Parasites & Vectors*. 2015, **8**:411.
49. OROZCO-MOSQUEDA G.E., MARTINEZ-LOYA O.A., ORTEGA Y.R. Cyclospora cayetanensis in a Pediatric Hospital in Morelia, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014, **91**: 537 – 540.
50. MAHEASWARI R., KSHIRSAGAR J.T., LAVANYA N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2016, **20**: 128 – 135.
51. BOER R.F., OTT A., KESZTYUS B., KOOISTRA-SMID A.M.D. Improved Detection of Five Major Gastrointestinal Pathogens by Use of a Molecular Screening Approach. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, **48**: 4140 – 4146.
52. MEJIA R., VICUNA Y., BRONCANON., SANDOVAL C., VACA M., CHICO M., COOPER P.J., NUTMAN T.B. A Novel, Multi-Parallel, Real-Time Polymerase Chain Reaction Approach for Eight Gastrointestinal Parasites Provides Improved Diagnostic Capabilities to Resource-Limited At-Risk Populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013, **88**: 1041 – 1047.
53. KASNAUSKIENĖ J. Viso žmogaus genomo analizės metodai. Mokomoji knyga. Vilnius, 2014. Vilniaus universitetas. ISBN 978-609-417-082-9.
54. VERWEIJ J.J., STENSVOD C.R. Molecular Testing for clinical Diagnosis and Epidemiological Investigations of Intestinal Parasitic Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, **27**: 371 – 418.
55. ZBOROMYRSKA Y., HURTADO J.C., ALEJO I., ALVAREZ-MARTÍNEZ M.J., VALLS M.E., VILA J. Evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of traveller's diarrhoea. *Poster Presented at the 2017 ESCMID*. 2015.
56. DUNN H., CARTWRIGHT M., SWARCZEWSKI E., HOLLOWAY H., REBBAPRAGADA A. Evaluation of the Copan Fecal Swab and Seegene Allplex Gastrointestinal multiplex panels for Accurate Molecular Detection of Stool Pathogens with Operational Efficiency for Implementation in a High Volume Laboratory Setting. *Poster Presented at the 2017 ECCMID*. <http://www.copanusa.com/education/scientific-studies/evaluation-copan-fecal-swab-and-seegene-allplex-gastrointestinal-multiplex-panels-accurate-molecular-detection-stool-pathogens-o/> (žiūrėta 2017.05.17).



57. PLATTS-MILLS J.A., OPERATIO D.O., HOUP T E.R. Molecular Diagnosis of Diarrhea: Current Status and Future Potential. *Curr Infect Dis Rep.* 2012, **14**: 41 – 46.
58. Seegene. Allplex Gastrointestinal Panel Assays. Interneto prieda: [http://seegene.com/neo/en/products/Gastrointestinal/allplex\\_GI\\_fp.php](http://seegene.com/neo/en/products/Gastrointestinal/allplex_GI_fp.php) (Žiūrēta 2017.03.15).
59. LEUNG D.T., CHISTI M.J., PAVIA A.T. Prevention and Control of Childhood Pneumonia and Diarrhea. *Pediatric Clinics of North America.* 2016, **63**: 67 – 79.
60. PAVILIONIS A. Klinikinė mikrobiologija. KMU leidykla, Kaunas. 2006, 658-679. ISBN 978-9955-15-137-1.
61. PAVILIONIS A., LASINSKAITĖ-ČERKAŠINA A., VAIČIUVENAS A. Diagnostinė mikrobiologija. Kaunas, 2007. KMU biblioteka. ISBN 978-9955-15-153-1.
62. Mayo Clinic. C.difficile infection. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/c-difficile/diagnosis-treatment/diagnosis/dxc-20202420> (žiūrēta 2017.02.20).

## SANTRAUKA

### **Diarėjos sukėlėjų analizė molekulinės diagnostikos metodu**

Viduriavimo sutrikimai yra labai svarbi, vaikų sergamumą ir mirtingumą sukelianti medicinos problema visame pasaulyje. Viduriavimas – virškinimo trakto infekcijos pasekmė gali būti sukiamas įvairių mikroorganizmų – bakterijos, virusų, pirmuonių. Diagnostinėse laboratorijose virškinamojo trakto infekciniai sukėlėjai dažniausiai aptinkami taikant pasėlio, mikroskopavimo, antigenų nustatymo testus. Tačiau ilgą laiką nepamainoma pagalba buvę metodai, dažnai nebepasižymi aukštu jautrumu ir atrankumu. Todėl šiuo metu infekcinių ligų diagnostikoje svarbią vietą užima nauji – molekuliniai tyrimų metodai. Šio darbo tikslas buvo realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu iširti ir išanalizuoti virškinamojo trakto infekcinius sukėlėjus VUL Santaros klinikų filialo Vaikų ligoninės pacientų išmatų mėginiuose. Tikslui pasiekti buvo užsibrėžti šie darbo uždaviniai: 1) nustatyti vaikų (0-17 m.) diarėjos sukėlėjus išmatų mėginiuose realaus laiko polimerazės grandininės reakcijos metodu; 2) įvertinti nustatytų diarėjos sukėlėjų pasiskirstymo dažnį; 3) atlikti laboratorinių metodų rezultatų palyginamąją analizę: palyginti molekulinio ir klasikiniais laboratoriniais metodais gautų diarėjos sukėlėjų tyrimų rezultatus.

Diarėjos sukėlėjų analizė buvo vykdoma Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje. Darbo metu buvo iširtos 53 vaikų su gastroenterito požymiais išmatos, naudojant Seegene Allplex rinkinį, 25–ių diarėją sukeliančių mikroorganizmų aptikimui.

Tyrimo metu molekulinio RL-PGR metodu iš išmatų buvo aptikta 11 skirtingų infekcinių diarėjos sukėlėjų. Daugiausia infekcinės kilmės diarėjos atvejų vaikų tarpe sudarė virusinės kilmės infekcijos, sukeltos rotaviruso (25%), noroviruso (15%) ir bakterinės – *C.difficile* (12%), *Campylobacter spp.* (12%) kilmės infekcijos. Molekulinio metodu buvo aptiktas didesnis kiekis infekcinių sukėlėjų, lyginant su klasikinių laboratorinių metodų rezultatais kadangi nauji molekuliniai laboratoriniai metodai geba aptikti net mažus mikroorganizmų nukleorūgščių kiekius, bei kelis skirtingus sukėlėjus viename išmatų mėginyje.

## SUMMARY

### Detection of Different Microorganisms Causing Diarrhoea by Real-Time PCR

Diarrhoeal disease is the second leading cause of mortality and morbidity in children younger than five years old. Gastrointestinal infections caused by organisms such as bacteria, viruses or protozoa. The principle diagnostic modalities have historically included culture, microscopy and antigen based tests. But these methods aren't always specific and selective. A new molecular diagnostics have an emerging role in the diagnosis of infectious diseases. The aim of this study was to detect and analyze gastrointestinal pathogens from stool samples by real-time polymerase chain reaction. In order to carry out the aim of the study, these tasks were established: 1) to detect the etiologic agents of diarrhoea in children using Real-Time PCR; 2) to evaluate the frequency of organisms causing infectious diarrhea; 3) to compare molecular method with standard microbiological methods involved with direct antigen detection, bacterial culture and microscopy used in infectious diarrhoea diagnostics.

The detection of microorganisms causing diarrhea was performed at Vilnius University Hospital Santaros Clinics Centre of Laboratory Medicine. The study involved the analysis of the 53 stool samples of pediatric patients with gastroenteritis using commercial multiplex RT-PCR (Allplex™ Gastrointestinal Panel Assays) covering 25 diarrhea – causing pathogens.

The results of this researched showed that 11 infectious gastrointestinal microorganisms from fecal samples were detected by using RT-PCR. Viral infections included with Rotavirus A (25%), Norovirus (15%) and bacterial infections included with *C. difficile* (12%), *Campylobacter* spp. (12%), showed the highest prevalence of infections diarrhea in children of 0-17 years group. By using RT-PCR were detected more infections diarrheal pathogens and mixed gastrointestinal infections than conventional methods. Newer molecular tests have the capability to detect small amount of nucleic acid of microorganisms, enumerate multiple pathogens and define the relative amounts in a single stool sample.

## **PADĖKA**

Už suteiktą galimybę ruošti šį magistrinį darbą, pagalbą ir pasitikėjimą, nuoširdžiai dėkoju Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijos vedėjai ir savo darbo vadovei dr. Silvijai Kiverytei. Taip pat UAB „Diamedika“ atstovei Astai Križanauskienei, už pagalbą įsisavinant metodologinius principus, bei molekulinės biologijos darbuotojams už suteiktus vertingus patarimus.

## PRIEDAI

**1 priedas.** Molekuliniu RL-PGR ir klasikiniiais mikrobiologiniais (koprologiniu, virusų antigenų, pasėlio) metodais tirtų mėginių tyrimų rezultatai. C<sub>T</sub>

Nr.	Lytis	Amžius, metai	PGR						VUL vaikų ligoninės Mikrobiologijos laboratorija			
			Virusai	C <sub>T</sub>	Bakterijos	C <sub>T</sub>	Pirmuonys	C <sub>T</sub>	Virusų Ag tyrimas	<i>C.dificile</i> toks. A ir B	Bakteriologinis pasėlis	Pirmuonys
1.	V	2	ROV	24.57	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
2.	V	16	ROV	24.46	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
			NVG2	37,93								
3.	M	13	-	-	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
4.	V	2	ROV	25.61	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
5.	V	0	ROV	34.17	Cam	19.75	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
6.	V	1	-	-	Sal	30.97	-	-	neigiamas	neigiamas	<i>Salmonella</i> spp.	nerasta
7.	V	9	-	-	CdB	41.79	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	BH 4-5 r.l.
8.	M	10	-	-	-	-	DF	29.55	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
9.	M	4	NVG2	35,05	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
10.	M	10	-	-	-	-	DF	35,25	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
11.	M	0	ROV	22,95	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
12.	V	11	-	-	-	-	-	-	X	neigiamas	nerasta	nerasta
13.	V	1	-	-	CdB	39.49	-	-	X	X	nerasta	X
					eaeA	24.99						
14.	M	16	-	-	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	<i>E.coli</i> 018	nerasta
15.	M	9	-	-	Cam	39.97	-	-	X	neigiamas	nerasta	BH
16.	M	2	-	-	CdB	33.43	-	-	neigiamas	X	nerasta	nerasta
17.	V	15	-	-	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
18.	V	1	-	-	Aer	36.80	-	-	X	X	nerasta	X
19.	M	13	-	-	-	-	BH	30,15	X	X	nerasta	nerasta
20.	M	4	NVG2	28	Cam	35,18	-	-	neigiamas	X	nerasta	nerasta
21.	V	8	-	-	CdB	37,58	-	-	X	Teigiamas	nerasta	nerasta
					Aer	43,67						
22.	M	0	-	-	-	-	-	-	neigiamas	neigiamas	X	nerasta
23.	V	1	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	<i>Salmonella</i> spp.	nerasta
24.	M	2	-	-	-	-	BH	37,98	ROV	X	<i>Y.enterocolitica</i>	nerasta
25.	M	0	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	<i>E.coli</i> O6	nerasta
26.	V	1	ROV	19,18	Sal	39,15	-	-	neigiamas	X	<i>Salmonella</i> spp.	nerasta
27.	V	2	NVG2	33,19	-	-	DF	23,18	NVG	X	X	nerasta
28.	V	1	NVG2	39,61	Cam	26,37	-	-	ROV	X	<i>C.jejuni</i>	nerasta
					Yer	43,22						
29.	V	1	NVG2	15,31	Yer	22,91	-	-	neigiamas	X	<i>Y.enterocolitica</i> ; <i>S.derby</i>	X
					Sal	29,69						
30.	V	1	NVG2	21,85	-	-	-	-	NVG	X	nerasta	X
			ROV	25,24								
31.	M	0	-	-	-	-	-	-	X	X	nerasta	nerasta
32.	M	2	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	nerasta	nerasta
33.	V	10	-	-	-	-	-	-	X	neigiamas	nerasta	X
34.	M	3	-	-	-	-	DF	41,66	neigiamas	X	nerasta	nerasta
35.	V	2	ROV	35,91	CdB	29,84	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	X
36.	V	2	ROV	17,37	-	-	-	-	ROV	X	nerasta	nerasta

37.	M	6	-	-	-	-	DF	30,89	ROV	X	nerasta	nerasta
38.	M	1	ROV	32,41	Cam	19,8	-	-	neigiamas	neigiamas	<i>C.jejuni</i>	X
					eaeA	33,87						
39.	M	2	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	nerasta	nerasta
40.	M	17	ROV	35,63	-	-	-	-	X	neigiamas	nerasta	nerasta
41.	V	5	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	nerasta	X
42.	M	0	-	-	-	-	-	-	NVG	X	nerasta	nerasta
43.	V	1	-	-	-	-	-	-	X	nerasta	nerasta	X
44.	V	0	ROV	26,55	-	-	-	-	ROV	X	X	X
45.	V	0	-	-	-	-	-	-	X	neigiamas	X	X
46.	M	4	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	nerasta	X
47.	M	11	-	-	Sh/EI	43,5	-	-	neigiamas	X	<i>C.jejuni</i>	X
					Cam	20,5						
					Aer	34,97						
48.	V	0	-	-	Yer	28,65	-	-	neigiamas	X	<i>Y.enterocolitica</i>	nerasta
					eaeA	37,86						
49.	V	11	-	-	CdB	25,18	-	-	neigiamas	neigiamas	nerasta	nerasta
50.	V	0	-	-	-	-	-	-	X	X	nerasta	X
51.	M	16	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	nerasta	nerasta
52.	V	0	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	X	nerasta
53.	V	1	-	-	-	-	-	-	neigiamas	X	nerasta	X

**2 priedas.** Tyrimo metu naudotų panelių rinkiniuose esančių sukėlėjų ir šių sukėlėjų sutrumpinimai.

Pirmuonys	
BH	<i>Blastocystis hominis</i>
DF	<i>Dientamoeba fragilis</i>
CC	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
GL	<i>Giardia lamblia</i>
EH	<i>Enatamoeba histolytica</i>
CR	<i>Cryptosporidium spp.</i>

Bakterijos II	
stc1/2*	<i>EHEC</i>
O157	<i>E. Coli O157</i>
CD hyper	<i>D. difficile hypervirulent</i>
stc1/2*	EPEC
lt/st	ETEC
aggR	EAEC

Bakterijos I	
Sh/EI	<i>Shigella spp./EIEC</i>
Vib	<i>Virbio spp.</i>
Aer	<i>Aeromonas spp.</i>
Cam	<i>Campylobacter spp.</i>
Yer	<i>Y. Entorecolitica</i>
CdB	<i>C. Difficile toxin B</i>
Sal	<i>Salmonella spp.</i>

Virusai	
ASV	<i>Astrovirus</i>
SV	<i>Sapovirus</i>
ROV	<i>Rotavirus A</i>
NVG1	<i>Norovirus G1</i>
ADC-F	<i>Adenovirus 40/41</i>
NVG2	<i>Norovirus G2</i>

**3 priedas.** Analizių aptikimas pagal specifinių fluoroforų švytėjimo signalą ir rezultatų interpretavimas.

Allplex™ GI-Parasite Assay		
Fluoroforas	Analitės	
FAM	BH	GL
HEX		
Cal Red 610	DF	EH
Quasar 670	CC	CR

Allplex™ GI-Bacteria(II) Assay		
Fluoroforas	Analitės	
FAM	stc1/2*	stc1/2*
HEX	IC	lt/st
Cal Red 610	O157	aggR
Quasar 670	CD hyper	

Analitė	C <sub>T</sub> vertė	Rezultatas
Tiriamoji medžiaga	≤43	Aptikta (+)
	>43; N/A	Neaptikta (-)
IC	≤43	Aptikta (+)
	>43; N/A	Neaptikta (-)

Analitė	C <sub>T</sub> vertė	Rezultatas
IC	≤43	Aptikta (+)
	>43; N/A	Neaptikta (-)
Tiriamoji medžiaga	≤43	Aptikta (+)
	>43; N/A	Neaptikta (-)
CD hyper	≤45	Aptikta (+)
	N/A	Neaptikta (-)

Allplex™ GI-Bacteria(I) Assay		
Fluoroforas	Analitės	
FAM	Sh/EI	Cam
HEX	IC	Yer
Cal Red 610	Vib	CdB
Quasar 670	Aer	Sal

Allplex™ GI-Virus Assay		
Fluoroforas	Analitės	
FAM	ASV	NVG2
HEX	IC	ADC-F
Cal Red 610	SV	NVG1
Quasar 670	ROV	

Analitė	C <sub>T</sub> vertė	Rezultatas
Tiriamoji medžiaga	≤45	Aptikta (+)
	N/A	Neaptikta (-)
IC	≤43	Aptikta (+)
	>43; N/A	Neaptikta (-)

C <sub>T</sub> vertė	Rezultatas
≤40	Aptikta (+)
>40; N/A	Neaptikta (-)