

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ
ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ «НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
СПЕЦИАЛИСТОВ
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.

Δ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 66
4 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

АПРЕЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостоповская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

**Ответственность за достоверность
информации, содержащейся в рекламных
материалах, несут рекламодатели**

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 20.03.2021.
Подписано в печать 25.03.2021.
Формат 60 × 88½.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Micrology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Индекс 71442 — для подписчиков

**Подписка через Интернет: www.aks.ru,
www.pressa-rf.ru**
**Подписка на электронную версию:
elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2021. № 4. 193–256.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Петербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красноярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*), В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Швеция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*), К.П. КАШКИН (*Москва*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*), А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ (*Москва*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-Петербург*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

THE ALL-RUSSIAN
ORGANIZATION
"THEORETICAL AND
PRACTICAL SOCIETY
OF SPECIALISTS
OF LABORATORY
MEDICINE"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 66
4 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

APRIL

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

**The responsibility for credibility of
information contained in advertising materials
is accounted for advertisers**

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

All rights reserved. Any part of this edition can not be entered computer memory nor be reproduced with any other mode without preliminary permission of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY,
V.T. MOROZOVA, L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN,
G.G. KHARSEEVA (executive editor), I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*),
I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV
(*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK
(*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*),
T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*),
A.V. INDUTNY (*Omsk*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*),
A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN
(*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), G.V. KOR-
SHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV
(*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO
(*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL'
(*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Плосконос М.В.

Полиамины биологических жидкостей организма и диагностическое значение их определения в клинических и лабораторных исследованиях (обзор литературы) 197

Макарова Е.Л., Терехина Н.А.

Влияние беременности на показатели обмена железа и меди у женщин с нормальной массой тела и женщин с ожирением. 205

ИММУНОЛОГИЯ

Петрова О.В., Твердохлебова Д.К., Мурыгина О.И., Смельцова Е.В., Никулина Д.М.

Диагностические характеристики серологических тестов для выявления случаев SARS-CoV-2. 210

ЦИТОЛОГИЯ

Пожарская В.В.

Цитогенетические аномалии деления лимфоцитов крови у школьников, проживающих в средних и высоких широтах. 213

МИКРОБИОЛОГИЯ

Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Савельяева М.В., Кунгурцева Е.А., Воропаева Н.М.

Оценка чувствительности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты толстой кишки у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами, к препаратам бактериофагов. 217

Герасимова Е.Н., Исмагуллин Д.Д., Лямин А.В., Жестков А.В.

Общая характеристика, особенности культивирования и антибиотикорезистентности представителей *Mycobacterium fortuitum* group (обзор литературы) 223

Бондаренко Е.И., Филимонова Е.С., Краснова Е.И., Криницина Э.В., Ткачев С.Е.

Случаи заболевания Ку-лихорадкой, выявленные у жителей Новосибирской области, госпитализированных с подозрением на инфекции, передаваемые клещами. 229

Мельникова О.В., Трушина Ю.Н., Адельшин Р.В., Андаев Е.И., Леонова Г.Н.

Анализ эффективности методов детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах. 237

Канащенко М.Е., Мицевич И.П., Карцев Н.Н., Асташкин Е.И., Детушева Е.В., Храмов М.В., Светоч Э.А., Фурсова Н.К.

Изучение профиля чувствительности *Elizabethkingia meningoseptica* к антибактериальным препаратам и дезинфектантам. 242

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С.

Характеристика уропатогенных изолятов *Escherichia coli*, выделенных в условиях стационара. 248

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Ploskonos M.V.

Polyamines of biological fluids of the body and the diagnostic value of their determination in clinical and laboratory researches (review of literature) 197

Makarova E.L., Terekhina N.A.

Influence of pregnancy on iron and copper exchange rates in women with normal body weight and women with obesity 205

IMMUNOLOGY

Petrova O.V., Tverdokhlebova D.K., Murygina O.I., Smeltsova E.V., Nikulina D.M.

Diagnostic characteristics of serological tests for the detection of SARS-CoV-2 cases 210

CYTOLOGY

Pozharskaya V.V.

Cytogenetic status of blood lymphocytes in schoolchildren living middle and high latitudes 213

MICROBIOLOGY

Grigorova E.V., Rychkova L.V., Belkova N.L., Nemchenko U.M., Savelkaeva M.V., Kungurtseva E.A., Voropaeva N.M.

Evaluation of the sensitivity of bacteriophage preparations to *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the colon microbiota in children with functional gastrointestinal disorders 217

Gerasimova E.N., Ismatullin D.D., Lyamin A.V., Zhestkov A.V.

General characteristics, features of cultivation and antibiotic resistance representatives of *Mycobacterium fortuitum* group representatives (review of literature) 223

Bondarenko E.I., Filimonova E.S., Krasnova E.I., Krinitsina E.V., Tkachev S.E.

Cases of q fever detected in residents of the Novosibirsk region hospitalized with suspicion of infections transmitted by ticks 229

Mel'nikova O.V., Trushina Yu.N., Adel'shin R.V., Andaev E.I., Leonova G.N.

Analysis of effectivity of the tick-borne encephalitis virus detection methods in ixodid ticks 237

Kanashenko M.E., Mitzhevich I.P., Kartsev N.N., Astashkin E.I., Detusheva E.V., Khramov M.V., Svetoch E.A., Fursova N.K.

A study of antibiotic and disinfectant susceptibility of *Elizabethkingia meningoseptica* 242

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S.

Epidemiological characteristics of uropatogenic isolates of *Escherichia coli* in hospitals 248

БИОХИМИЯ

© ПЛОСКОНОС М.В., 2021

Плосконос М.В.

ПОЛИАМИНЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОРГАНИЗМА И ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО Астраханский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 414000, Астрахань, Россия

В обзоре проведен анализ содержания основных полиаминов (ПА) – спермина, спермидина и путресцина в важнейших биологических жидкостях организма человека (крови, мочи, семенной жидкости и др.), даётся оценка их диагностического и прогностического значения в клинической практике. Показана новизна и ценность оценки уровня метаболитов ПА в качестве новых диагностических маркеров различных заболеваний, таких как рак, инсульт, почечная недостаточность, для которых поиск ранних маркеров особо актуален. Данные обзора могут представлять практический интерес и учитываться при оценке уровня ПА и их производных в клинико-диагностических и лабораторных исследованиях. Поиск литературы для обзора осуществлялся по базам данных Scopus, Web of Science, MedLine, РИНЦ.

Ключевые слова: полиамины; спермин; спермидин; путресцин; биологические жидкости; обзор.

Для цитирования Плосконос М.В. Полиамины биологических жидкостей организма и диагностическое значение их определения в клинических лабораторных исследованиях (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 197-204. DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-197-204>

Ploskonos M.V.

POLYAMINES OF BIOLOGICAL FLUIDS OF THE BODY AND THE DIAGNOSTIC VALUE OF THEIR DETERMINATION IN CLINICAL AND LABORATORY RESEARCHES (REVIEW OF LITERATURE)

Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation, 414000, Astrakhan, Russia

The review provides the analysis of the content of the main polyamines (PA) - spermine, spermidine and putrescine in the most important biological fluids of the human body (blood, urine, seminal fluid, etc.). The assessment of their diagnostic and prognostic value in clinical practice is carried out. The novelty and value of assessing of the level of PA metabolites as new diagnostic markers of various diseases has been shown. Among such diseases as cancer, stroke, renal failure, for which the search for early markers is especially relevant. This survey data can be of practical interest and taken into account in estimating the level of PA and its derivatives in clinical and laboratory reseaches. The literature search for the review was carried out using the Scopus, Web of Science, MedLine, RSCI databases.

Key words: polyamines; spermine; spermidine; putrescine; biological fluids; review.

For citation: Ploskonos M.V. Polyamines of biological fluids of the body and the diagnostic value of their determination in clinical and laboratory researches (review of literature). *Klinicheskheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 197-204. (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-197-204>

For correspondence: *Ploskonos M.V.*, Doctor of Biological Sciences, professor department of Chemistry; e-mail: ploskonoz@mail.ru

Information about author:

Ploskonos M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2505-924X>.

Conflict of interest. *The author declare no conflict of interest.*

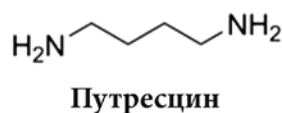
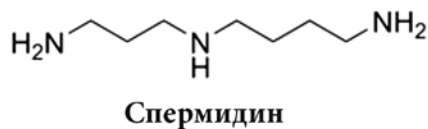
Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 28.03.2021
Accepted 30.03.2021

Среди биологически активных соединений организма человека особое внимание заслуживают полиамины (ПА). Это низкомолекулярные алифатические амины, имеющие различной длины цепи из атомов углерода с двумя или несколькими первичными аминогруппами. Основными представителями ПА животных тканей считают спермин (Спм) и спермидин (Спд), а также их предшественник диамин путресцин (Пут) [1, 2].

Синтез ПА происходит в клетках реакцией декарбоксилирования из таких аминокислот, как орнитин, аргинин, лизин, пролин и метионин под действием ферментов орнитиндекарбоксилазы (ОДК), спермидин- и сперминсинтазы (СДС и СМС) и находится под контролем гормональной системы [3, 4].

Ферментативные механизмы взаимопревращений ПА осуществляются при участии ацетилтрансферазы и полиаминоксидазы (ПАО), обеспечивающей быстрое



Основные полиамины животных тканей и биологических жидкостей человека.

расщепление ацетилированных ПА [5]. Важным путём катаболизма ПА является окислительное дезаминирование их концевых групп (-CH₂NH₂) при помощи моноаминоксидазы (МАО) и диаминооксидазы (ДАО) [6, 7].

ПА могут синтезироваться кишечной микрофлорой (кишечной палочкой, энтеробактериями, энтерококками, лактобациллами) и анаэробами (бактероидами, бифидобактериями и, особенно, клостридиями) из аминокислот [8-10]. *Helicobacter pylori* может продуцировать Спд [11-13].

После всасывания в кишечнике ПА разносятся кровотоком и попадают в периферические ткани (тимус, печень). У здоровых людей ПА, образующиеся в основном в толстом кишечнике, в норме подвергаются деструкции бактериальными ферментами или после проникновения в печень детоксицируются печеночными аминоксидазами [7, 14].

Значение ПА для организма достаточно велико: они жизненно необходимы для регуляции процессов роста и деления клетки [7, 11, 12], активации и ингибирования апоптоза и аутофагии [15 - 18], а исследования последних лет свидетельствуют об участии ПА в регулировании иммунитета [10, 19] и продолжительности жизни организма [20-24].

Они участвуют в биосинтезе белка, защите ДНК от действия нуклеаз и укрепления структуры хроматина, стабилизации структуры рибосом и плазматических мембран, проявляют антиоксидантный и противовоспалительные эффекты, играют важную роль в устойчивости к стрессу [23, 25-28].

Обладают нейромедиаторной и нейромодуляторной функциями, необходимы для нормального функционирования клеток кишечника, почек, сердечно-сосудистой системы [10, 29, 30]. ПА играют значительную роль в репродуктивной функции человека, а также на всех стадиях развития живого организма, начиная с эмбрионального развития [7, 12, 31].

Механизмы действия ПА очень сильно зависят от их концентраций: отсутствие или недостаток (истощение) ПА приводят к нарушениям метаболических процессов организма и к тяжёлым последствиям, замедлению роста клеток и эмбрионального развития, к старению. Однако

избыточное накопление ПА, вследствие сбоев в регуляции их синтеза, также является губительным для клеток, приводит к апоптозу, так как метаболиты ПА являются очень токсичными веществами. Усиление катаболизма клеточных ПА при помощи ПАО, сперминоксидазы (СМО) или ацетилполиаминоксидазы (АсПАО), повышает окислительный стресс клеток, может способствовать старению, генерирует перекись водорода и реактивный токсичный метаболит акролеин, который связывается с остатками лизина клеточных белков [3, 32-35].

ПА могут находиться в организме и в связанном с белками, и в свободном состоянии в клетках различных тканей и органов на разных ступенях развития. Также ПА содержатся в различных физиологических жидкостях организма: в крови, в моче, в сперме, в грудном молоке. В милли- и наномольных концентрациях присутствуют в поте, слюне, желчи, цереброспинальной, дуоденальной, амниотической жидкостях и т.д. [2, 3, 7, 15].

Их содержание зависит от взаиморегулирования процессов синтеза, высвобождения из внутриклеточных структур, метаболических и катаболических превращений в производные и продукты деградации. Базовым фактором регуляции синтеза принято считать концентрацию самих ПА [3].

ПА являются потенциальными биомаркерами: внутриклеточными «маркерами роста» и маркерами активности пролиферативных процессов. При этом Спм считается маркером дифференцировки, а Спд и Пут – маркерами пролиферации [3, 12, 36].

Содержание одного или нескольких ПА, их ацетилированных производных, метаболитов ПА, а также ферментов синтеза и катаболизма, в биологических жидкостях организма может изменяться при некоторых патологических состояниях: атопическом дерматите, псориазе, волчанке, ревматоидных артритах, гепатитах, уремии, при анемиях различной этиологии, некоторых врожденных аномалиях метаболизма, диабете, при паразитарных инфекциях, воспалении, инсульте и особенно при неопластическом росте [2, 10, 36 - 39].

Так, повышение уровней метаболита ПА – конъюгированного с белком акролеина (РС-Асго) и ферментов катаболизма ПА, например, ПАО, обнаружены в плазме крови пациентов, перенесших инсульт. Учитывая отсутствие надежных биохимических маркеров ранней стадии инсульта, метаболиты ПА в крови или моче, являются хорошими маркерами для ранней диагностики этого заболевания [35, 40]. РС-Асго является хорошим биомаркером хронической почечной недостаточности и может использоваться при установлении уровня тяжести этого заболевания [41].

Увеличение концентрации самих ПА в организме хоть и является характерным, но не специфичным маркером опухолевого процесса, однако может иметь значение в комплексной диагностике злокачественных опухолей. Повышение концентрации ПА в биожидкостях при неопластическом росте происходит как за счёт пролиферации клеток и роста опухоли, так и за счёт гибели раковых клеток и выхода из них ПА, что особенно показательно при эффективной терапии. Определенные ПА в биологических жидкостях человека может служить незаменимым тестом для быстрого выбора наиболее эффективных химиопрепаратов или дозы облучения [36, 42-44].

Дело в том, что содержание ПА в биологических жидкостях имеет чёткую корреляцию со степенью эф-

фективности лечения. Считается, что наиболее «информативными» из ПА являются Спд и Пут [36]. Ещё D.N. Russell [45] предложила считать концентрацию экскретируемого с мочой Пут, маркером пролиферативной активности раковых клеток, а концентрацию Спд – маркером, отражающим гибель опухолевых клеток в процессе лечения.

Для определения эффективности лечения предложено рассчитывать соотношение этих двух ПА до и через 48 ч после начала лечения. Полученный индекс при успешной терапии должен быть выше 1,25, а при неэффективной – ниже [43].

При эффективном лечении в первые 48-72 ч уровень ПА и в моче, и в крови возрастает, доказывая гибель раковых клеток и выделение из них ПА. При достижении положительного эффекта после лечения содержание ПА в моче и крови снижается, доходя даже до нормы. Вторичное повышение концентрации ПА у пациентов служит доказательством рецидива заболевания. При неэффективной терапии сохранялось исходное (до лечения) содержание ПА [43, 44].

Изменение содержания ПА в биологических жидкостях больных раком может служить прогностическим признаком и для определения скорости роста опухоли: увеличение содержания ПА характерно для больных с быстрорастущими опухолями, имеющими высокую пролиферативную активность (например, лимфома Беркитта), низкий процент увеличения – для больных с опухолями, у которых скорость роста более низкая [45].

Таким образом, присутствие ПА во всех структурных элементах организма и множество мишеней для них, заставило ограничить рассмотрение этих важных биологически активных веществ. Поэтому в данной работе мы сосредоточимся лишь на присутствии свободных ПА в биологических жидкостях организма человека.

Анализ данных литературных источников показал, что исследования ПА наиболее активно проводились в 70-х – 80-х годах прошлого столетия [36, 43, 45, 46]. Несмотря на то, что на сегодняшний день ведутся активные исследования физиологического значения метаболизма ПА, к сожалению, нет обобщённых систематизированных сведений о концентрациях ПА в важнейших биологических жидкостях организма человека в норме и при различных патологических состояниях, а иногда эти данные носят противоречивый характер [47]. Такие сведения позволили бы провести оценку диагностического и прогностического значения уровня ПА в лабораторных исследованиях.

В настоящем обзоре проводится анализ содержания основных ПА в важнейших биологических жидкостях организма человека, даётся оценка их диагностического и прогностического значения в клинической практике. Показана новизна и ценность оценки уровня метаболитов ПА в качестве новых диагностических маркеров различных заболеваний, таких как рак, инсульт, почечная недостаточность, для которых поиск ранних маркеров особо актуален. Тем более что для определения метаболитов ПА возможно использовать высокочувствительный и доступный метод иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA).

Содержание ПА в крови. Основная часть ПА крови находится в конъюгированной форме, в основном в виде ацетилированных дериватов. Оценка содержания свободных ПА в крови здоровых людей показала, что данные, полученные разными авторами, различаются.

Это, по-видимому, связано с чувствительностью методов, использованных для определения ПА и зависит от количества проведенных исследований, а также от других причин.

Так, по данным некоторых авторов, использовавших разные методы для определения ПА, но получивших сходные результаты, в свободном состоянии в цельной крови здоровых людей в возрасте от 18 до 48 лет обнаруживаются Спм и Спд, причём преобладает последний. Общее содержание свободного Спд в цельной крови человека соответствует $9,23 \pm 0,38$ (от 7,20 до 11,26) нмоль/мл, для Спм содержание составляет $7,01 \pm 0,24$ (от 5,55 до 8,47) нмоль/мл. Суммарное содержание ПА при этом равно $16,24 \pm 0,62$ (11,15-21,33) нмоль/мл. Отношение Спд/Спм, являющееся важным показателем интенсивности процессов пролиферации и дифференцировки в организме, составляет 1,31 [48 - 50].

Более низкий уровень ПА, был получен авторами других работ [51, 52] и, возможно, связан с небольшим количеством проведённых ими исследований. Тем не менее следует отметить, что все цитируемые авторы не обнаружили в цельной крови здоровых людей свободного Пут или предел его обнаружения был ниже чувствительности использованного метода.

По данным разных авторов существенной разницы в содержании ПА в крови людей в зависимости от их пола, не обнаружено. Однако, у женщин концентрация ПА в крови может изменяться в зависимости от фазы менструального цикла. У мужчин же эта величина более постоянна. Колебаний уровня ПА в крови у женщин, принимающих контрацептивы, не выявлено [48, 52].

В плазме и сыворотке крови уровень ПА составляет не более 1 нмоль/мл (причём содержание Пут и Спд выше, чем Спм) и с возрастом имеет тенденцию к снижению [7, 46, 53 - 55].

Таким образом, концентрация ПА в цельной крови может зависеть от содержания ПА в форменных элементах (эритроцитах, тромбоцитах и особенно лейкоцитах, где больше всего ПА, причём преобладает Спм), хотя может быть связано и не только с ядерными клетками [48].

Исследовано содержание ПА в цельной крови здоровых детей. Достоверных различий между концентрациями Спд и Спм в зависимости от пола детей не выявлено, но обнаружены возрастные особенности изменения их уровня: с возрастом у детей уменьшение содержания свободных ПА происходит почти синхронно. Тем не менее, количество Спд уменьшается более медленно, чем количество Спм. Отношение Спд/Спм практически не изменяется с возрастом детей. Пут в образцах отсутствовал или выявлен в следовых концентрациях. Так, в крови детей до 2-х летнего возраста уровень свободного Спд составляет $17,0 \pm 1,3$ нмоль/мл, Спм – $15,1 \pm 1,5$ нмоль/мл, общий уровень ПА – $34,0 \pm 2,6$ нмоль/мл, отношение Спд/Спм равно 1,1. В возрасте с 3-х до 11 лет уровень свободного Спд $14,0 \pm 0,7$ нмоль/мл, Спм – $11,4 \pm 0,5$ нмоль/мл, общий уровень ПА – $26,0 \pm 1,0$ нмоль/мл, отношение Спд/Спм равно 1,2. В крови детей 12-14 лет уровень свободного Спд составляет $8,6 \pm 0,4$ нмоль/мл, концентрация Спм – $7,5 \pm 0,4$ нмоль/мл, общий уровень ПА – $15,8 \pm 0,6$ нмоль/мл, а отношение Спд/Спм равно 1,2 [56, 57].

При различных патологических состояниях концентрация ПА в крови может изменяться. Например, у больных ожоговой болезнью содержание ПА в кро-

ви незначительно больше по сравнению со здоровыми людьми и равно $19,6 \pm 1,47$ нмоль/мл. Основной причиной отсутствия значительного накопления ПА в крови, по-видимому, является вовлечение их в усиленный биосинтез белка. Однако, у обожжённых в крайне тяжелом состоянии, количество ПА в крови снижалось в последние сутки жизни до 10 нмоль/мл [58].

При аутоиммунных заболеваниях, например, артрите, концентрация ПА повышена [59].

У больных хроническим миелолейкозом и хроническим лимфолейкозом в крови содержание ПА в 2 раза и более превышает норму и составляет $17,1 \pm 1,32$ и $15,7 \pm 1,89$ нмоль/мл соответственно для Спм и $15,0 \pm 1,04$ и $13,7 \pm 1,13$ нмоль/мл для Спд [43].

Весьма существенное повышение содержания ПА (в основном Спд) в крови выявлено у 82% больных неходжкинскими лимфомами и лимфогранулематозом II – IV стадий: количество ПА при этом $8,97 \pm 0,74$ мкг/мл, тогда как у практически здоровых людей оно составляет от 0,1 до 3,0 мкг/мл. Корреляции между содержанием ПА в сыворотке крови и клинической стадией опухолевого процесса не выявлено [43, 46].

Большинство больных карциномами толстой и прямой кишки имеют повышенную концентрацию ПА в сыворотке крови [46, 53].

Содержание ПА в моче. ПА являются нормальными компонентами мочи здорового человека и содержатся там и в свободной, и в связанной форме в виде N-ацетилпутресцина, N-ацетилспермина и N-ацетилспермидина [6, 14, 42, 43].

Основной частью (до 85%) фракционного состава свободных ПА мочи здоровых людей в возрасте от 17 до 55 лет являются Спд и Пут [14]. Статистически значимой разницы в содержании ПА в моче здоровых мужчин и женщин не обнаружено, не зависимо от возрастных групп пациентов. Здоровые люди выделяют с мочой за сутки в среднем $7,4 \pm 0,4$ мг (2-10 мг в сутки) ПА: количество Спд $3,4 \pm 0,5$ мг в сутки, Спм – $1,95 \pm 0,41$ мг в сутки, Пут – $2,45 \pm 0,43$ мг в сутки [43, 58].

Такие данные согласуются с данными более ранних работ, в которых сообщалось о том, что за сутки здоровый человек выделяет менее 5 мг каждого ПА. Однако, одни авторы обнаружили, что концентрация всех ПА в моче была примерно одинаковой: Спд $3,1 \pm 0,56$ мг, Спм – $3,4 \pm 0,67$ мг, Пут – $2,7 \pm 0,53$ мг [45]. Другие авторы выявили, что суточное количество выделяемого Спм больше по сравнению со Спд: Спд в моче было $1,12 \pm 0,11$ мг, Спм – $3,4 \pm 0,67$ мг, Пут – $4,21 \pm 0,41$ мг [46].

Суточное определение ПА не всегда бывает удобно, так как качество анализа зависит от количества мочи, от тщательности и аккуратности её сбора. Сама процедура также удлиняет время выдачи результата исследования. Поэтому, предложено определять ПА в разовой пробе, а концентрацию ПА рассчитывать на содержание в пробе креатинина [14].

Содержание Спд и Пут в пробах, взятых из разовой порции мочи, идентично результатам проб из суточного количества и равно соответственно $3,29 \pm 0,20$ и $2,10 \pm 0,33$ мкмоль на 1 ммоль креатинина. Причём различия в концентрациях ПА в пробах мочи, взятых в разные промежутки времени, были статистически недостоверны. Содержание Спм при этом было чуть меньше 1 мкмоль на 1 ммоль креатинина [58].

Однако, некоторыми авторами выявлен более низкий уровень свободных ПА в моче [10].

Согласно некоторым литературным источникам нормальный диапазон концентраций ПА в моче довольно широк и составляет от 0,1 до 1 мкг/мл [42]. Например, для Спд приводятся значения $0,37$ мкг/мл [53], $0,10 - 0,14$ мкг/мл [42].

Немного численны исследования, где изучалась экскреция ПА у людей в зависимости от возраста. Выявлено, что различия в экскреции ПА у людей отдельных возрастных групп незначительны. Самое низкое содержание ПА в суточной моче отмечено у здоровых людей в возрасте от 10 до 40 лет (примерно 5 мг в сутки), а в возрастных группах от 41 до 70 лет концентрация ПА повышается до 8 мг. Наиболее высокая экскреция ПА выявлена у людей 61-70 лет ($8,93 \pm 1,37$) мг в сутки. У людей преклонного и старческого возрастов (71-100 лет) содержание ПА в моче составляло в среднем 6-7 мг в сутки, что несколько ниже, чем у людей 51-70 лет. При этом фракционный состав ПА представлен Спм у 27,2, Спд – у 98,2, Пут – у 51% обследованных [43, 57].

При беременности, особенно на ранних сроках, происходит увеличение концентрации выделяемых с мочой ПА, что, наверняка, связано с поступлением в кровь матери ПА из быстрорастущих тканей плода и недостаточным повышением уровня ДАО в крови на ранних стадиях беременности. Суммарное количество Спм, Спд и Пут, выделяемых с мочой в 1-2 месяца беременности составляет $17,6 \pm 1,9$ мг в сутки, а к 7-8 месяцам – $13,8 \pm 2,3$ мг в сутки [43].

В более ранних работах отмечено, что у беременных выделение за сутки Спд составляет $7,7 \pm 0,83$ мг, Спм – $10,5 \pm 1,8$ мг, Пут – $3,7 \pm 0,58$ мг [45]. Есть данные о количестве Спд $2,4 \pm 0,79$ мг, Спм – $5,05 \pm 2,44$ мг, Пут – $12,9 \pm 0,39$ мг за сутки [46].

Диагностическое значение имеет определение количества ПА, выделяемых с мочой, при различных патологических состояниях, например, для прогноза исхода ожоговой болезни [58]. Так, при благополучном исходе уровень ПА в моче возрастает параллельно тяжести ожога. В первые сутки после ожога, когда идёт усиленный синтез белка и стимуляция активности ОДК, у больных с благополучным исходом наблюдают повышенное содержание ПА в моче по сравнению с экскрецией у здоровых людей: $80,7 \pm 9,80$ мкмоль ПА в сутки (Спм $9,1 \pm 1,25$ мкмоль, Спд $36,5 \pm 5,39$ мкмоль и Пут $35,1 \pm 4,31$ мкмоль) по сравнению с $57,5 \pm 3,05$ мкмоль в сутки соответственно. Последующие периоды болезни сопровождаются усилением экскреции ПА, но по мере выздоровления уровень ПА в моче постепенно снижается. Чрезвычайно высокий уровень ПА в моче также является неблагоприятным прогностическим признаком.

При летальных исходах у большинства обожжённых с обширными поражениями наблюдается низкое содержание ПА в моче: в первые сутки после ожога с мочой выделялось $21,1 \pm 5,12$ мкмоль ПА (Спм $4,9 \pm 1,58$ мкмоль, Спд $8,9 \pm 2,17$ мкмоль и Пут $7,4 \pm 1,93$ мкмоль), что значительно ниже среднего уровня, характерного для здоровых людей. Слабое протекание биосинтетических реакций и сильный стресс у пострадавших в состоянии агонии приводит к снижению активности функций ОДК и угнетению синтеза ПА [14, 58].

У больных с почечной недостаточностью значительное снижение экскреции ПА сопровождалось повышением их уровня в крови [15, 58]. У больных псориазом выявлена повышенная экскреция ПА с мочой [4].

Обнаружено значимое различие в экскреции ПА и их диацетилированных производных у больных злокачественными опухолями в отличие от здоровых людей или пациентов с неопухолевыми заболеваниями [43, 45]. Так, содержание основных ПА и их метаболитов в моче увеличивается в 5-10 раз у больных, как с гематологическими, так и с солидными опухолями, причем у первых экскреция ПА выше [46].

У больных с системными опухолевыми заболеваниями - неходжкинскими лимфомами и лимфогранулематозом II – IV стадий - содержание ПА (в основном Спд и Пут) в моче увеличивается в 3-9 раз по сравнению с нормой, но не зависит от клинической стадии злокачественного процесса [43, 46].

У больных раком желудка и раком лёгкого экскреция ПА (особенно Спд и Пут) в несколько раз превышала экскрецию у здоровых людей и у больных с неопухолевыми заболеваниями желудка и лёгких (острая и хроническая пневмония), однако зависимость величины экскреции ПА от стадии опухолевого процесса не всегда выявлялась, хотя у больных с обширными метастазами выделение ПА особенно высокое [43].

Экскреция ПА (в основном Спд и Пут) у больных раком гортани более чем в 2-3 раза превышает экскрецию у здоровых лиц и зависит от стадии заболевания [46].

У больных со злокачественными опухолями поджелудочной железы, средостения, пищевода, у больных с опухолью забрюшинного пространства, со злокачественными полипами кишечника, с лимфоретикулосаркомой, карциномой предстательной и молочной железы, злокачественными новообразованиями мочеполовой системы наблюдается повышенное содержание ПА в моче [43, 53].

Например, при раке молочной железы экскреция ПА в основном увеличивается за счёт Спд и Пут, причём выявлена прямая зависимость величины экскреции ПА от стадии заболевания: количество ПА увеличивается в моче в зависимости от распространённости злокачественного процесса. При доброкачественных опухолях молочной железы (фиброаденомах и фиброаденоматозах) выделение ПА было несколько выше нормы $7,9 \pm 1,2$ и $12,0 \pm 2,4$ мг в сутки соответственно [36, 43].

При злокачественных опухолях яичников, тела и шейки матки выделение ПА увеличивалось в 3 раза по сравнению с показателями у здоровых людей, причём у больных раком тела и шейки матки отмечена экскреция лишь Спд и Пут. У больных раком яичников содержание ПА в суточной моче прямо пропорционально степени развития заболевания, однако экскреция ПА у 30% больных доброкачественными опухолями яичников такое же высокое, как и у больных раком яичников [36, 45].

Только у 50% больных раком прямой кишки выделение ПА с мочой увеличено и зависит от стадии заболевания. Вероятно, при этом заболевании часто встречаются медленно растущие формы опухолей, для которых не характерно высокое содержание ПА в опухолевых клетках. Кроме того, у пациентов с этим видом рака экскреция ПА ниже, чем у больных раком желудка, лёгких, молочной железы и др. [46].

Для больных раком щитовидной железы, мочевого пузыря, толстой кишки зависимость экскреции ПА от активности злокачественного процесса не выявлена [43].

Интересно отметить, что закономерное повышение уровня ПА, выделяемых с мочой у онкологических больных, не наблюдается у пациентов с опухолями ЦНС

и, видимо, может быть связано с медленными темпами роста такого типа опухолей [45].

Существует мнение, что концентрация Пут в моче может зависеть от процессов взаимопревращения ПА, при которых Спм превращается в Спд, а последний в Пут. Фактически Пут рассматривается как промежуточный продукт взаимопревращений ПА и как конечный продукт катаболизма, а не как один из биологически активных ПА. Из-за небольшой длины алифатической цепи Пут и специфической потребности в Спм и Спд при процессах пролиферации, Пут считают неактивной формой ПА [15, 36].

Исследования последних лет подтверждают, что всё же более надёжным и чувствительным маркером злокачественных новообразований является повышение экскреции с мочой не самих ПА, а их ацетилированных производных, например, N1, N12-диацетилспермина, N1,N8-диацетилспермидина [6, 29, 32, 37, 44].

Ацетилированные производные являются отличными диагностическими и прогностическими маркерами различных онкологических заболеваний человека по сравнению с некоторыми из известных маркеров опухолевых процессов, позволяют выявить рак толстой кишки и молочной железы на ранних стадиях и эффективны при обнаружении рецидивов, чувствительны к изменениям в клиническом состоянии пациентов [6, 35, 37].

Содержание ПА в других биологических жидкостях. ПА содержатся в небольших количествах в норме и в других биологических жидкостях организма, хотя данные по их содержанию очень немногочисленны. В цереброспинальной жидкости концентрация Пут и Спм составляет $182,0 \pm 79,0$ и $120,0 \pm 34,0$ пмоль/мл, соответственно. При злокачественных опухолях спинного мозга в спинномозговой жидкости выявлено увеличение концентрации Пут и Спд, в то время как у больных с другими заболеваниями центральной нервной системы (гидроцефалия, апоплексический удар и др.) содержание ПА было в пределах нормы [2, 43].

В желчи содержание Спм и Спд составляет 14,6 и 16,1 мкг/мл, соответственно; дуоденальная жидкость содержит Спм в количестве $1,9 \pm 0,3$ мкг/мл, а Спд – $1,27 \pm 0,6$ мкг/мл; в поте Спм и Спд по 0,25 мкг/мл каждого, а в слюне – по 0,05 мкг/мл; амниотическая жидкость содержит Пут, Спм и Спд в количествах $0,96 \pm 0,2$, $0,33 \pm 0,1$ и $0,76 \pm 0,2$ мкг/мг креатинина, соответственно [26, 43].

ПА крайне важны для репродуктивной функции человека. Их участие в созревании и фертилизации половых клеток является строгой необходимостью [3, 15, 47, 60].

В доступных источниках литературы данные о содержании ПА в фолликулярной жидкости у женщин не обнаружены. В собственных экспериментах выявить содержание свободных ПА в этой биологической жидкости не удалось. Объяснением может быть выявленный в фолликулярной жидкости достаточно высокий уровень ферментов катаболизма ПА – ДАО, ПАО и СМО, обеспечивающих быстрое расщепление ПА (данные не опубликованы).

Интересна роль продуктов окисления ПА в семенной плазме, как кофакторов в развитии рака шейки матки у женщин. Результаты показали, что половая активность без механической контрацепции может вести к появлению мутагенных и иммуносупрессивных продуктов окисления ПА в половых путях женщин. Таким образом, женщины, имеющие высокие уровни ПАО и/или ДАО в слизи цервикального канала, могут входить в

группу повышенного риска развития рака шейки матки, особенно если в сперме мужчины-партнёра содержатся высокие уровни ПА [3, 47].

В репродуктивной системе мужчин ПА синтезируются в предстательной железе, эпидидимисе, в яичках в сперматогенных клетках, клетках Сертоли и клетках Лейдига [3]. Содержание ПА в семенной жидкости и секрете предстательной железы у человека существенно выше, чем в любой другой биологической жидкости организма [2, 15, 47].

Полиаминный состав секрета предстательной железы человека представлен Спм ($2,44 \cdot 10^{-2}$ - $3,18 \cdot 10^{-2}$ г/л) и Спд ($3,0 \cdot 10^{-2}$ - $3,7 \cdot 10^{-1}$ г/л). Средняя концентрация Спм - 1320 мкг/мл (от 244 до 3180 мкг/мл) [2, 3, 15].

В семенной плазме фертильных мужчин выявлены Пут ($0 - 1,83 \cdot 10^{-1}$ г/л), Спд ($2,58 \cdot 10^{-3}$ - $1,67 \cdot 10^{-1}$ г/л) и Спм ($2,77 \cdot 10^{-2}$ - $4,44$ г/л) [3, 47].

Установлено, что концентрации ПА в семенной жидкости бесплодных мужчин заметно ниже по сравнению со здоровыми фертильными мужчинами [47]. При различных формах бесплодия выявлены изменения не только концентраций свободных Спм и Спд в семенной жидкости, но также и изменение соотношения Спм/Спд по сравнению с таковыми показателями у фертильных мужчин.

Так, при полизооспермии наблюдалось снижение количества ПА в семенной жидкости; при олигозооспермии уровень ПА был повышен; при астенозооспермии снижалось содержание Спд и, соответственно, повышалось отношение Спм/Спд; в спермоплазме мужчин с большим количеством мертвых гамет был повышен уровень Спм и соотношение Спм/Спд [3, 15, 47].

Заключение. Анализируя данные разных исследований, проведённых как в России, так и за рубежом, причем как в прошлом столетии, так и в современных условиях, можно сделать вывод, что полученные авторами величины содержания ПА в таких средах как кровь, моча имеют сопоставимые значения. Иногда данные имеют некоторые отличия, что вероятно обусловлено тем, что при количественном анализе ПА, например, в цельной сыворотке или плазме, могут происходить их значительные потери, обусловленные большим количеством и гетерогенностью исследуемого материала, а также различиями в методиках определения и количестве исследованных образцов.

Можно заключить, что ПА в организме осуществляют сложные биохимические и молекулярно-биологические функции и под влиянием разнообразных причин выделяются в биологические жидкости, а избыток выводится с мочой. Определение концентрации и соотношения отдельных представителей ПА, их производных, а также продуктов их метаболических превращений в крови, в моче и других биологических жидкостях представляет интерес при нарушении обменных процессов в организме и особенно при заболеваниях опухолевой природы. Всё это свидетельствует о том, что определение содержания ПА и их метаболитов в биологических жидкостях организма может дать важную информацию, как исследователям, так и практическим врачам, помочь ранней диагностике и скорейшему лечению различных заболеваний.

В этом отношении поиск ранних биомаркеров патологических состояний, разработка новых, быстрых и дешёвых методов диагностики различных заболеваний, особенно заболеваний опухолевой природы, представляет собой одну из основных целей и задач современных клинических исследований, позволит дополнить

диагностический арсенал при исследовании нарушений в организме человека, и тем самым повысить информативность исследования причин различных патологий у людей. Действительно, повышенная концентрация ПА или их производных, ферментов их синтеза или катаболизма, а в некоторых случаях просто обнаружение присутствия какого-то из перечисленных веществ, информирует о наличии патологического процесса в организме пациента, в частых случаях о возникновении опухоли ещё на очень ранних стадиях, либо о прогрессировании или рецидиве опухолевого заболевания.

Данные этого обзора могут представлять практический интерес и учитываться при оценке уровня ПА в лабораторных исследованиях. Считаю возможным использовать определение концентрации и соотношения представителей класса ПА и их метаболитов в биологических жидкостях организма человека в клинико-диагностических лабораториях в качестве биомаркера некоторых патологических состояний, а также дополнительного способа контроля над эффективностью проводимой терапии в клинической практике.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 5-14, 17-32, 34-42, 44-46, 49-55, 59 см. REFERENCES)

- Плосконос М.В., Николаев А.А. Определение полиаминов в разных биологических средах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 3:16-9.
- Силачев Д.Н., Плотноков Е.Ю., Горюнов К.В., Романов А.Ю., Плосконос М.В., Долгушина Н.В., и др. Роль полиаминов в жизнедеятельности клеток репродуктивной системы. *Цитология*. 2018; 60(3):164-72. Doi:10.31116/tsitol.2018.03.02.
- Каграманова А.Т., Тищенко Л.Д., Березов Т.Т. Орнитиндекарбоксилазная активность эпидермиса при псориазе как биохимический показатель гиперпролиферативного процесса. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1993; 6:618-20.
- Плосконос М.В., Евдокимов В.В. Полиамины уrogenитального тракта мужчин как фактор регуляции апоптоза сперматозоидов. *Урология*. 2019; 4:74-9. Doi:10.18565/urology.2019.4.74-79.
- Плосконос М.В., Николаев А.А. Влияние полиаминов на апоптоз лимфоцитов периферической крови человека in vitro. *Гематология и трансфузиология*. 2010; 55(4):16-9.
- Плосконос М.В. Экстернализация фосфатидилсерина и функционально-морфологические нарушения сперматозоидов у мужчин, состоящих длительное время в бесплодном браке. *Урология*. 2016; 4:87-91.
- Залеток С.П., Бердинских Н.К., Драга Н.В. Некоторые аспекты биологической роли полиаминов при нормальном и опухолевом росте. *Экспериментальная онкология*. 1984; 4(6):10-7.
- Плосконос М.В., Николаев А.А. Содержание свободных полиаминов в спермоплазме фертильных и субфертильных мужчин. *Проблемы репродукции*. 2010; 16(3): 80-2.
- Ворончихина Л.Д., Демьянова В.Т., Ситников С.А. Содержание полиаминов в крови здоровых людей. *Вопросы медицинской химии*. 1986; 2:43-5.
- Ковтунова М.Е., Беляков В.А., Тестоедова Т.А. Полиамины крови здоровых детей. *Лабораторное дело*. 1988; 1:12-4.
- Ворончихина Л.Д., Ковтунова М.Е. Полиамины мочи здоровых детей. *Лабораторное дело*. 1982; 8:49-51.
- Ворончихина Л.Д., Демьянова В.Т., Манжаров Н.В. Экскреция полиаминов с мочой у больных с термическими ожогами. *Вопросы медицинской химии*. 1987; 6:23-6.
- Плосконос М.В. Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(11):22-5.

REFERENCES

1. Agostinelli E., Marques M.P., Calheiros R. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*. 2010; 38:393-403.
2. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. Determination of polyamines in various biological media. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2011; 3:16-9. (in Russian)
3. Silachev D.N., Plotnikov E.Yu., Goryunov K.V., Romanov A.Yu., Ploskonos M.V., Dolgushina N.V., Nikolaev A.A., Torov D.B., Sukhikh G.T. The role of polyamines in functioning of reproductive system cells. *Tsitologiya*. 2018; 60:3:164-72. Doi:10.31116/tsitol.2018.03.02. (in Russian)
4. Kagramanova A.T., Tishchenko L.D., Berezov T.T. Ornithine decarboxylase activity of the epidermis in psoriasis as a biochemical indicator of the hyperproliferative process. *Byulleten' 'eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1993; 6:618-20. (in Russian)
5. Laube G., Bernstein H.G. Agmatine: multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience? *Biochem. J*. 2017; 26(474):2619-40.
6. Tetsushi Nakajima, Kenji Katsumata, Hiroshi Kuwabara, Ryoko Soya, Masanobu Enomoto, Tetsuo Ishizaki et al. Urinary Polyamine Biomarker Panels with Machine-Learning Differentiated Colorectal Cancers, Benign Disease, and Healthy Controls. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19:756. Doi:10.3390/ijms19030756 www.mdpi.
7. Hanfl E., Bollenbach A., Beckmann B., Brunner G., Tsikas D. GC-MS measurement of spermidine and putrescine in serum of elderly subjects: intriguing association between spermidine and homocysteine. *Amino Acids*. 2020; 52:225-34. Doi:10.1007/s00726-019-02786-3.
8. Pugin B., Barcik W., Westermann P., Heider A., Wawrzyniak M., Hellings P. et al. A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microb Ecol Health Dis*. 2017; 28:1353881.
9. Ramos-Molina B., Queipo-Ortuno M.I., Lambertos A., Tinahones F.J., Penafiel R. Dietary and gut microbiota polyamines in obesity and age-related diseases. *Front Nutr*. 2019; 6:24.
10. Mikelsaar M., Stsepelova J., Mikelsaar R-H., Truusalu K., Smidt I., Hütta P. et al. Polyamines of human strain *Lactobacillus plantarum* Inducia induce modulation of innate immune markers. *Journal of Functional Foods*. 2020; 72:104064. Doi:10.1016/j.jff.2020.104064.
11. Bekebrede A.F., Keijer J., Gerrits W.J., Boer V.C. The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. *Nutrients*. 2020. 12(1):197. Doi:10.3390/nu12010197.
12. Carriche G.M., Almeida L., Stuve P., Velasquez L., Dhillon-LaBrooy A. Regulating T-cell differentiation through the polyamine spermidine. *J Allergy Clin Immunol*. 2020; 1-25. Doi:10.1016/j.jaci.2020.04.037.
13. Velásquez R.D., Brunner G., Varrenttrapp M., Tsikas D., Frölich J.C. *Helicobacter pylori* produces histamine and spermidine. *Z. Gastroenterol*. 1996; 34:116-22.
14. Fernandez-del-Campo-Garcia M., Casas-Ferreira A.M., Rodriguez-Gonzalo E., Moreno-Cordero B., Perez-Pavon J.L. Development of a fast and reliable methodology for the determination of polyamines in urine by using a guard column as a low-resolution fractionation step prior to mass spectrometry. Comparison with flow injection-mass spectrometry analysis. *Microchemical Journal*. 2020; 158(105223):1-8. Doi:10.1016/j.microc.2020.105223.
15. Ploskonos M.V., Evdokimov V.V. Polyamines of urogenital tract men as factors of apoptosis regulation Spermatozooids. *Urologiya*. 2019; 4:74-9. Doi:10.18565/urology.2019.4.74-79. (in Russian)
16. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. Polyamine effect on human peripheral blood lymphocyte apoptosis in vitro. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2010; 55(4):16-9. (in Russian)
17. Hussain T., Tan B., Ren W., Rahu N., Dad R., Kalhor D.H., & Yin Y. Polyamines: Therapeutic perspectives in oxidative stress and inflammatory diseases. *Amino Acids*. 2017; 49:1457-68.
18. Zhang H., Alsaleh G., Feltham J., Sun Y., Napolitano G., Riffelmacher T. et al. Polyamines control eIF5A hypusination, TFEB translation, and autophagy to reverse B cell senescence. *Mol. Cell*. 2019;76:110-25.
19. Matsumoto M., Kurihara S. Probiotics-induced increase of large intestinal luminal polyamine concentration may promote longevity. *Medical Hypotheses*. 2011; 77:469-72.
20. Eisenberg T., Abdellatif M., Schroeder S. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat. Med*. 2016; 22:1428-38.
21. Soda K. Spermine and gene methylation: a mechanism of lifespan extension induced by polyamine-rich diet. *Amino Acids*. 2019; 52: 213-24. Doi:10.1007/s00726-019-02733-2.
22. Tsikas D., Erik H., Gorig B. Spermidine for a long, dementia-free life? *Glob. J. Pharm. Sci*. 2017; 2:555576. Doi:10.19080/GJPPS.2017.02.555576.
23. Minois N. Molecular Basis of the 'Anti-Aging' Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines – A Mini-Review. *Gerontology*. 2014; 60:319-26.
24. Kiechl S., Pechlaner R., Willeit P., Notdurfter M., Paulweber B., Willeit K. et al. Higher spermidine intake is linked to lower mortality: a prospective population based study. *Am. J. Clin. Nutr*. 2018;108:371-80.
25. Liu J.-H., Wang W., Wu H., Gong X., & Moriguchi T. Polyamines function in stress tolerance: From synthesis to regulation. *Frontiers in plant science*. 2015; 6:827-827.
26. Bae D.H., Lane D.J.R., Jansson P.J., Richardson D.R. The old and new biochemistry of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta Gen Subj*. 2018; 1862:2053-68.
27. Madeo F., Eisenberg T., Pietrocola F., Kroemer G. Spermidine in health and disease. *Science*. 2018. 359(6374):eaan2788.
28. Liu N., Dai Z.L., Jia H., Zhang Y.C., Chen J.Q., Sun S.Q. et al. Maternal L-proline supplementation during gestation alters amino acid and polyamine metabolism in the first generation female offspring of C57BL/6J mice. *Amino Acids*. 2019; 51:805-11.
29. Hiramatsu K., Takahashi K., Yamaguchi T., Matsumoto H., Miyamoto H., Tanaka S. et al. N1,N12-Diacetylspermine as a sensitive and specific novel marker for early- and late-stage colorectal and breast cancers. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11:2986-2990.
30. Muñoz-Esparza N.C., Latorre-Moratalla M.L., Comas-Basté O., Toro-Funes N., Veciana-Nogués M.T., & Vidal-Carou M. C. Polyamines in Food. *Frontiers in Nutrition*. 2019; 6:108.
31. Wang J., Tan BE., Li J., Kong X., Tan M., Wu G. Regulatory role of L-proline on fetal pig growth and intestinal epithelial cell proliferation in vivo and in vitro. *Animal Nutrition Journal*. 2020; 351:351-355. Doi:10.1016/j.aninu.2020.07.001.
32. Kawakita M., Hiramatsu K., Yanagiya M., Doi Y., Kosaka M. Determination of N1,N12-diacetylspermine in urine: A novel tumor marker. *Methods Mol. Biol*. 2011; 720: 367-78.
33. Ploskonos M.V. Phosphatidylserine externalization and functional-morphological impairment of sperm in men with long barren marriage. *Urologiya*. 2016; 4:87-91. (in Russian)
34. Cerrada-Gimenez M., Pietila M., Loimas S., Pirinen E., Hyvonen M.T., Keinanen T.A. et al. Continuous oxidative stress due to activation of polyamine catabolism accelerates aging and protects against hepatotoxic insults. *Transgenic Res*. 2011; 20:387-96.
35. Myung Hee Park, Kazuei Igarashi. Polyamines and Their Metabolites as Diagnostic Markers of Human Diseases. *Biomol Ther*. 2013; 21(1):1-9. Doi:10.4062/biomolther.2012.097.
36. Becciolini A., Porciani S., Lanini A., Santoni R., Cionini L. Urinary Polyamines in Patients with Advanced Cervical Cancer or Pelvic Cancer Recurrence During and After Radiotherapy. *Acta Oncologica*. 1992; 31(3):327-31.
37. Umemori Y., Ohe Y., Kuribayashi K., Tsuji N., Nishidate T., Kameshima H. et al. Evaluating the utility of N1,N12-diacetylspermine and N1,N8-diacetylspermidine in urine as tumor markers for breast and colorectal cancers. *Clin. Chim. Acta*. 2010; 411:1894-9.
38. Coni S., Di Magno L., Serrao S.M., Kanamori Y., Agostinelli E., Canettieri G. Polyamine metabolism as a therapeutic target in Hedgehog-driven basal cell carcinoma and medulloblastoma. *Cells*. 2019; 8(2):E150.
39. Gasperoni F., Turini P., Agostinelli E. A novel comprehensive paradigm for the etiopathogenesis of multiple sclerosis: therapeutic approaches and future perspectives on its treatment. *Amino Acids*. 2019; 51:745-59.

BIOCHEMISTRY

40. Tomitori H., Usui T., Saeki N., Ueda S., Kase H., Nishimura K. et al. Polyamine oxidase and acrolein as novel biochemical markers for diagnosis of cerebral stroke. *Stroke*. 2005; 200536:2609-13.
41. Igarashi K., Kashiwagi K. Use of polyamine metabolites as markers for stroke and renal failure. *Methods Mol. Biol.* 2011; 720: 395-408.
42. Naccarato A., Elliana R., Cavaliere B., Sindona G., Tagarella A. Development of a fast and simple gas chromatographic protocol based on the combined use of alkyl chloroformate and solid phase microextraction for the assay of polyamines in human urine. *Journal of Chromatography A*. 2018; 1549:1–13. Doi:10.1016/j.chroma.2018.03.034.
43. Zaletok S.P., Berdinskikh N.K., Draga N.V. Some aspects of the biological role of polyamines in normal and tumor growth. *Ekspierimental'naya onkologiya*. 1984; 4(6):10-7. (in Russian)
44. Kawakita M., Hiramatsu K. Diacetylated derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers. *J. Biochem.* 2006. 139:315-22.
45. Russell D.H., Levy C.C., Schimpft S.C., Hawk I.A. Urinary Polyamines in Cancer Patients. *Cancer Research*. 1971; 31:1555-8.
46. Fujita K., Nagatsu T., Maruta K., Ito M., Senba H., Miki K. Urinary Putrescine, Spermidine, and Spermine in Human Blood and Solid Cancers and in an Experimental Gastric Tumor of Rats. *Cancer Research*. 1976; 36:1320-4.
47. Ploskonos M.V., Nikolaev A.A. The maintenance of the free polyamines in the spermoplasm of the fertile and subfertile men. *Problemy reproduktivnoy*. 2010; 16(3): 80-2. (in Russian)
48. Voronchikhina L.D., Dem'yanova V.T., Sitnikov S.A. The content of polyamines in the blood of healthy people. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1986; 2:43-5. (in Russian)
49. Cohen L.F., Lundgren D.W., Farrell P.M. Distribution of spermidine and spermine in blood from cystic fibrosis patients and control subject. *Blood*. 1976; 48(2):469-75.
50. Cooper K.D., Shulka J.B., Rennert O.M. Polyamine distribution in cellular compartments of blood and in aging erythrocytes. *Clin. chim. acta*. 1976; 73(1):71-88.
51. Chun P.W., Rennert O.M., Saffen E.E., Taylor W.J. Effect of polyamines on the electrokinetic properties of red blood cells. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1976; 69(8):1095-1101.
52. Rennert O.M., Shukla J.B. Polyamines in health and disease. *Advances in polyamine research*. New York: Raven press. 1978; 2:195-211.
53. Khuhawara M.Y., Qureshi G.A. Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J. Chromatogr.* 2001; B 764:385–407.
54. Pucciarelli S., Moreschini B., Micozzi D., De Fronzo G.S., Carpi F.M., Polzonetti V. et al. Spermidine and spermine are enriched in whole blood of nona/centenarians. *Rejuvenation Res.* 2012; 15:590–5.
55. Magnes C., Fauland A., Gander E., Narath S., Ratzer M., Eisenberg T. et al. Polyamines in biological samples: rapid and robust quantification by solid-phase extraction online-coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr*. 2014; A 1331:44–51.
56. Kovtunova M.E., Belyakov V.A., Testoedova T.A. Blood polyamines of healthy children. *Laboratornoe delo*. 1988; 1:12-4. (in Russian)
57. Voronchikhina L.D., Kovtunova M.E. Urine polyamines of healthy children. *Laboratornoe delo*. 1982; 8:49-51. (in Russian)
58. Voronchikhina L.D., Dem'yanova V.T., Manzharov N.V. Excretion of polyamines in the urine in patients with thermal burns. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1987; 6:23-6. (in Russian)
59. Brooks W.H. Increased polyamines alter chromatin and stabilize autoantigens in autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2013; 4:91.
60. Ploskonos M.V. The application of eosin and propidium iodide in evaluation of vitality of human spermatozoa. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(11):22-5. (in Russian)

Поступила 28.03.21
Принята к печати 30.03.21

© МАКАРОВА Е.Л., ТЕРЕХИНА Н.А., 2021

Макарова Е.Л., Терехина Н.А.

ВЛИЯНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА И МЕДИ У ЖЕНЩИН С НОРМАЛЬНОЙ МАССОЙ ТЕЛА И ЖЕНЩИН С ОЖИРЕНИЕМ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614000, Пермь, Россия

Количество беременных с ожирением ежегодно увеличивается и достигает 20-30%. Метаболизм гормонов и минеральных веществ изменяется в условиях большого количества жировой ткани в организме беременной, что приводит к ряду акушерских и перинатальных проблем. Цель работы – изучить и сравнить влияние гестационного процесса на показатели обмена железа и меди в сыворотке крови женщин с нормальной массой тела и женщин с ожирением. В сыворотке крови 125 женщин репродуктивного возраста определяли содержание гемоглобина, железа, трансферрина, ферритина, меди и церулоплазмينا. Выявлено влияние беременности на показатели обмена железа и меди в сыворотке крови женщин. Беременность у женщин с нормальной массой тела способствует увеличению содержания трансферрина и церулоплазмينا. Выявлена корреляция содержания церулоплазмينا и ферритина с индексом массы тела беременных с ожирением. При беременности с сопутствующим ожирением формируется гиперферритинемия при сниженном содержании гемоглобина и сывороточного железа. Знание показателей обмена железа и меди необходимо для оптимизации наблюдения беременных, эффективной профилактики и прогнозирования акушерских и перинатальных осложнений.

Ключевые слова: беременность; ожирение; гемоглобин; железо; ферритин; трансферрин; медь; церулоплазмин.

Для цитирования: Макарова Е.Л., Терехина Н.А. Влияние беременности на показатели обмена железа и меди у женщин с нормальной массой тела и женщин с ожирением. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 205-209. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-205-209>

Makarova E.L., Terekhina N.A.

INFLUENCE OF PREGNANCY ON IRON AND COPPER EXCHANGE RATES IN WOMEN WITH NORMAL BODY WEIGHT AND WOMEN WITH OBESITY

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician Ye. A. Vagner Perm State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 614000, Perm, Russian Federation

The number of obese pregnant women increases annually and reaches 20-30%. The metabolism of hormones and minerals changes in the presence of a large amount of adipose tissue in the body of a pregnant woman, which leads to a number of obstetric and perinatal problems. The aim of the work is to study and compare the influence of the gestational process on the indicators of iron and copper metabolism in the blood serum of women with normal body weight and women with obesity. In the blood serum of 125 women of reproductive age, the content of hemoglobin, iron, transferrin, ferritin, copper and ceruloplasmin was determined. The influence of pregnancy on the indicators of iron and copper metabolism in the blood serum of women was revealed. Pregnancy in women with normal body weight increases the content of transferrin and ceruloplasmin. Correlation of ceruloplasmin and ferritin content with body mass index of obese pregnant women was revealed. In pregnancy with concomitant obesity, hyperferritinemia is formed with a reduced content of hemoglobin and serum iron. Knowledge of the indicators of iron and copper metabolism is necessary to optimize the observation of pregnant women, effective prevention and prediction of obstetric and perinatal complications.

Key words: pregnancy; obesity; hemoglobin; iron; ferritin; transferring; copper; ceruloplasmin.

For citation: Makarova E.L., Terekhina N.A. Influence of pregnancy on iron and copper exchange rates in women with normal body weight and women with obesity. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 205-209. (in Russ.) DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-205-209>

For correspondence: *Makarova E.L.*, PhD in Medicine, obstetrician-gynecologist; e-mail: makarova_803@mail.ru

Information about authors:

Makarova E.L., <https://orcid.org/0000-0002-1330-8341>;

Terekhina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0168-3785>.

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 27.10.2020
Accepted 27.11.2020

Введение. Ожирение вышло на лидирующие позиции из всей соматической патологии, как в России, так и во всем мире [1,2]. Лишняя жировая ткань отрицательно влияет на течение гестации у женщин и развитие плода [3]. Беременность представляет собой анаболический процесс, необходимый для формирования новых тканей

плода и плаценты. Стабильность химического состава является одним из важнейших и обязательных условий нормального функционирования материнского организма во время вынашивания плода. В условиях нормально протекающей беременности формируются физиологические адаптивные изменения обмена веществ [4]. От-

Для корреспонденции: Макарова Елена Леонидовна, канд. мед. наук, врач акушер-гинеколог; e-mail: makarova_803@mail.ru

клонения в содержании химических элементов, вызванные экологическими, климатогеографическими факторами или заболеваниями, приводят к широкому спектру нарушений в состоянии здоровья женщины и плода [5]. Значительные изменения показателей минерального обмена формируются при сочетании беременности с ожирением [6-10]. При ожирении развивается хроническое системное воспаление и тканевая гипоксия, что часто ассоциировано как с железodefицитом, так и с анемией хронического заболевания [11]. Изучение влияния гестации и ожирения на минеральный обмен у женщин является крайне актуальным в связи с высокой коморбидностью этих состояний. В период гестации и родов возрастает потребность в железе в 2 раза, а в период лактации – в 10 раз [12]. Увеличение содержания церулоплазмينا у беременных в третьем триместре считается нормальной реакцией организма женщины на гормональные сдвиги, предшествующие родам [7]. Антирадикальные свойства церулоплазмينا объясняются его способностью связывать катионы металлов и супероксидные радикалы, ингибировать активные кислородные метаболиты [7]. Церулоплазмин является одним из основных антиоксидантов плазмы крови [13]. Дисбаланс макро- и микроэлементов в сыворотке крови беременных провоцирует развитие серьезных акушерских и плодовых осложнений. Известно, что дефицит железа снижает кислородтранспортную функцию крови, формируя гипоксию у матери, фетоплацентарную недостаточность, гипотрофию у плода, риск инфекционных осложнений [14]. Такие акушерские осложнения, как преэклампсия, коррелируют с гипокальцеемией беременных [15], гипомagneмия с невынашиванием и недонашиванием беременности [16]. Знание показателей минерального обмена при беременности может оказаться полезным для прогнозирования и профилактики акушерских и перинатальных осложнений.

Цель – изучить и сравнить влияние гестационного процесса на показатели обмена железа и меди в сыворотке крови женщин с нормальной массой тела и женщин с ожирением.

Материал и методы. В сыворотке крови 125 женщин определяли содержание железа на автоматическом анализаторе «KONELAB-60» ThermoFisherScientific (США) по методу [17], трансферрина на анализаторе иммуноферментных реакций «АИФР-01 УНИПЛАН» (Россия) по [18], ферритина на автоматическом ИФА-анализаторе «SEAC» (Италия) методом твердофазного иммуноферментного анализа по [19], содержание церулоплазмينا определяли по методу [17], содержание меди колориметрическим методом по [20]. Все женщины были разделены на группы, сравнимые по возрасту. В группу сравнения (группа А) вошли 34 беременные женщины с нормальной массой тела. Критерии исключения в этой группе следующие: отказ пациентки от исследования, прием препаратов железа, воспалительный процесс любой локализации, тяжелая сопутствующая соматическая патология, установленный диагноз железodefицитной анемии, ИМТ более 25 кг/м². ИМТ рассчитывали как отношение веса (в килограммах) к росту в квадрате (в метрах). В основную группу (группа В) вошли 65 женщин с избыточной массой тела и ожирением с ИМТ > 25 кг/м². Критерии исключения в этой группе: отсутствие согласия пациентки, установленный диагноз железodefицитной анемии, прием препаратов железа, наличие острого инфекционного процесса. По

ИМТ в основной группе выделены 2 подгруппы: подгруппа В1 – 35 беременных с избыточной массой тела (ИМТ 25-29,9 кг/м²), подгруппа В2 – 30 беременных с ожирением (ИМТ 30 и более кг/м²). Группу контроля (группа К) составили 33 небеременные женщины с нормальной массой тела. Получено информированное персонализированное согласие всех женщин на участие в исследовании.

Статистический анализ выполняли с помощью программ «Microsoft Office Excel 2010» («Microsoft Corp.», США) и «Statistica 7.0» («StatSoft Inc.», США). Результаты представлены в виде: *n* – количество в группе; *Me* – медиана, 25 пц; 75 пц – межквартильный размах; *M* – среднее; *SD* – стандартное (среднеквадратичное) отклонение. При нормальном распределении выборки для сравнения средних величин использовали критерий Стьюдента, а при отличии от нормального – критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ при нормальном распределении выборки осуществляли с помощью коэффициента Пирсона, при несимметричном – с помощью коэффициента Спирмена. Проверку на нормальность распределения проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Статистически значимыми считали различия данных при *p* < 0,05.

Результаты. Содержание гемоглобина в сыворотке крови небеременных женщин составило 123,6 [131,2-116] г/л, здоровых беременных женщин – 116,5 [124,8-108,2] г/л, что соответствовало нормативным показателям. В группе беременных с избыточной массой тела и ожирением (группа В) медианное значение гемоглобина соответствовало диагнозу «Анемия I степени», и составило 100,5 [111, 7-90,1] г/л. Надо отметить, что содержание гемоглобина находилось в обратной корреляции с индексом массы тела (при увеличении степени ожирения содержание гемоглобина снижалось) и статистически отличалось от содержания гемоглобина в сыворотке крови женщин контрольной группы. При гестации у здоровых женщин (группа А) достоверных различий по содержанию гемоглобина в сравнении с небеременными пациентками (группа контроля) не найдено (рис. 1). Содержание железа в сыворотке крови женщин основной группы оказалось в 2 раза ниже, чем этот показатель у небеременных и здоровых беременных женщин 10,55 [9,00-11,2] мкмоль/л (см. рис. 1). Установлена корреляционная зависимость между ИМТ и содержанием сывороточного железа ($r = +0,061$, $p = 0,7282$).

Содержание переносчика железа трансферрина в сыворотке крови здоровых беременных составило 379,37 [369,1-406,4] мг/дл и оказалось выше, чем в группе контроля 289,03 [234,5 -344,90] мг/дл (рис. 2). Наиболее высокий показатель трансферрина обнаружен в группе женщин с ожирением 416,0 [389,5-459,8] мг/дл. Не установлено корреляции между уровнем трансферрина и индексом массы тела беременных ($r = +0,078$, $p = 0,8914$). Содержание трансферрина у беременных с избыточной массой тела статистически значимо не отличались от содержания этого белка в сыворотке крови беременных с ожирением.

Повышение ферритина статистически значимо коррелировало с ИМТ ($r = +0,656$ $p = 0,00005$) (рис. 3). Установлены достоверные групповые различия в содержании ферритина в сыворотке крови при делении беременных с избыточной массой тела и ожирением на подгруппы (В1 и В2) в сравнении с беременными с нормальной массой тела из группы А ($p_{a-b} = 0,001$; $p_{a-b1} = 0,001$; $p_{a-b2} = 0,001$).

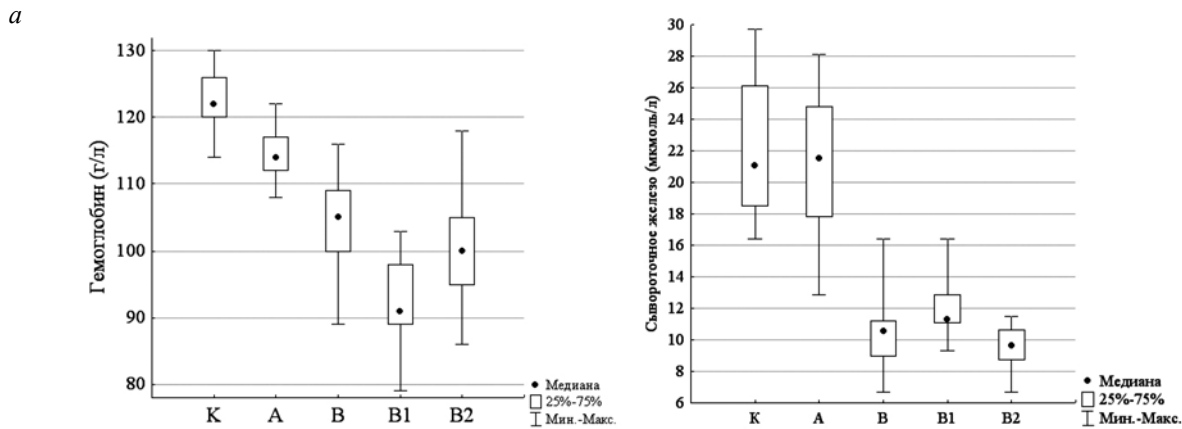


Рис. 1. Содержание гемоглобина (в г/л) (а) и сывороточного железа (в мкмоль/л) (б) в сыворотке крови беременных. Здесь и на рис. 2, 4: К-контроль; А - здоровые беременные (группа сравнения); В - беременные с избыточной массой тела и ожирением (основная группа); В1- подгруппа беременных с избыточной массой тела (ИМТ 25-29,9 кг/м²); В2- подгруппа беременных с ожирением (ИМТ 30 и более кг/м²).

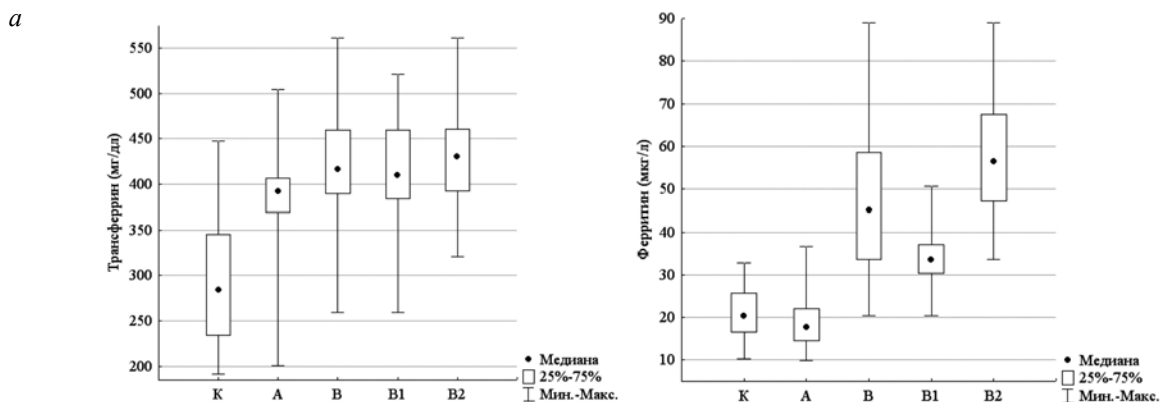


Рис. 2. Содержание трансферрина (в мг/дл) (а) и ферритина (в мкг/л) (б) в сыворотке крови беременных.

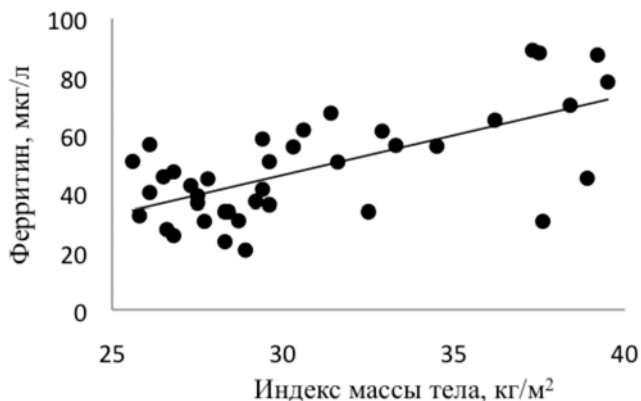


Рис. 3. Содержание ферритина (в мкг/л) в сыворотке крови беременных в зависимости от индекса массы тела.

В сыворотке крови беременных содержание меди было в 2 раза выше, чем у небеременных женщин (рис.4), а в группе пациенток с избыточной массой тела и ожирением содержание меди повышалось до 40,5 [32,6-45,8] мкмоль/л. Межгрупповые различия содержания меди при делении основной группы на подгруппы статистически не значимы ($p_{b-b1} = 0,9$; $p_{b-b2} = 0,88$).

Медианное значение содержания церулоплазмينا в сыворотке крови здоровых беременных оказалось повышенным и составило 677,0 [542,0-800,0] мг/л относительно небеременных женщин 398 [349,0-437,0] мг/л. При ИМТ более 30 кг/м² содержание церулоплазмينا оказалось почти в 2 раза выше, чем у небеременных женщин 763 [921,5-1015,0] мг/л и в 1,5 раза выше, чем у беременных с нормальной массой тела (рис.4). При вычислении коэффициента корреляции обнаружена прямая высокая сила связи содержания церулоплазмينا и ИМТ беременных ($r = +0,705$ при $p = 0,00002$). Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови беременных с ожирением статистически значимо отличалось от содержания его в группе контроля ($p_{a-b2} = 0,004$) (рис. 4).

Обсуждение. Изменения в организме женщины при гестации связаны с процессами интенсивного развития плода и проявляются ростом выработки гормонов, возникновением новых биологически активных веществ. Значительная перестройка жизнедеятельности организма беременной женщины сопровождается изменениями показателей минерального обмена. В процессе гестации значительно усиливается белоксинтезирующая функция печени. Со второй половины беременности увеличивается образование глобулинов – переносчиков металлов, что объясняет повышение содержания в сыворотке крови здоровых беременных трансферрина и церулоплазмينا. Интерпретация показателя сыво-

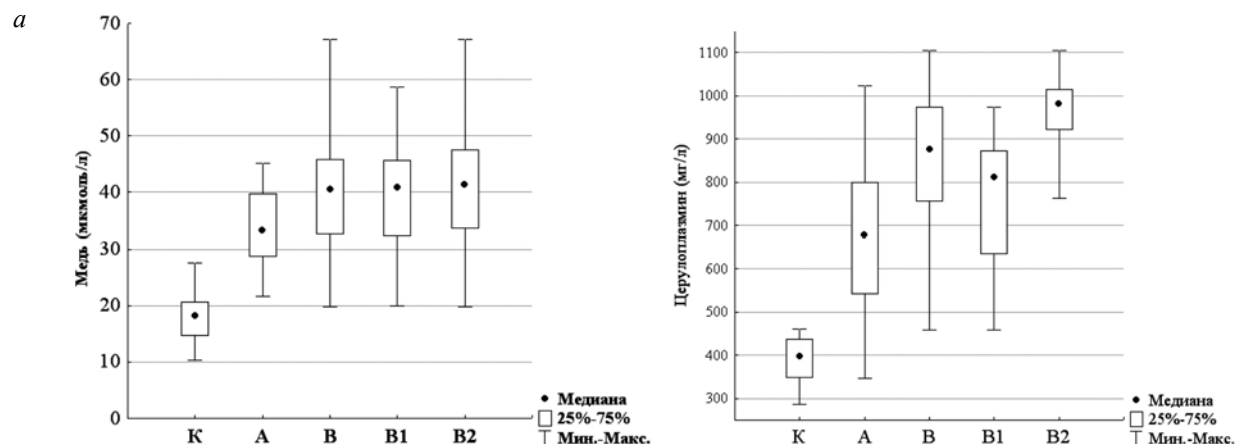


Рис. 4. Содержание меди (в мкмоль/л) (а) и церулоплазмينا (в мг/л) (б) в сыворотке крови беременных в группах.

роточного железа затруднена у пациенток с заболеваниями кишечника и печени, при особенностях диеты, при приеме некоторых лекарственных препаратов [21]. Более чем у половины беременных женщин выявлен железодефицит. Однако часть пациенток, страдающих инфекционной патологией, имеют функциональный дефицит железа и не всегда требуют ферротерапии [22]. С пищей в организм беременной поступает до 20% железа, остальные 80% возвращается в кровоток из клеток ретикулоэндотелиальной системы (печень, селезенка, костный мозг), используя повторно. Гомеостаз железа поддерживается комплексом белков. Основными железосвязывающими белками являются: трансферрин, ферритин, лактоферрин. Трансферрин способен переносить только трехвалентное железо, на поверхности его мембраны происходит окисление железа двухвалентного в трехвалентное с помощью церулоплазмينا [23]. Из-за положительного влияния эстрогенов увеличивается синтез печеночных белков, в том числе трансферрина. С увеличением срока беременности к третьему триместру нарастает содержание трансферрина [22]. Надо отметить, что трансферрин является негативным белком острой фазы воспаления, антиоксидантом, диагностическая ценность его как показателя ферростатуса в организме беременной при инфекционной патологии снижается [14]. Белок гепсидин регулирует поглощение железа кишечником и принимает участие в регулировании плацентарного транспорта железа. Повышенная продукция цитокинов жировой ткани стимулирует синтез этого белка. В свою очередь гепсидин блокирует работу белка переносчика железа из энтероцита в кровь ферропортина [23]. Абсорбция железа из кишечника замедляется или останавливается, железо накапливается в энтероцитах, макрофагах, гепатоцитах, не участвуя в синтезе гемоглобина. Формируется «железодефицитное» ожирение, при котором усугубляется окислительный стресс. Свободное железо связывается ферритином, уровень этого белка острой фазы воспаления возрастает в сыворотке крови беременных с ожирением. Установлена прямая сильная корреляция ИМТ и ферритина сыворотки крови беременных с ожирением. Выявленная ассоциация между ожирением и показателями обмена железа соответствует наличию хронического воспаления. В условиях системного воспаления запускаются механизмы

формирования акушерских осложнений: преэклампсия, невынашивание, фетоплацентарная недостаточность [3].

Медь повышает абсорбцию железа в кишечнике и обеспечивает связывание абсорбированного железа с железосвязывающим белком – трансферрином [21]. При гестации содержание меди двукратно увеличивалось как у женщин с нормальной массой тела, так и у беременных с ожирением. Церулоплазмин плазмы крови является белком острой фазы воспаления, антиоксидантом, главным транспортным белком – переносчиком меди в плазме крови. Выявленная нами прямая сильная корреляция содержания церулоплазмينا с ИМТ объясняется активацией антиоксидантной защиты организма беременной с ожирением в условиях системного воспаления. Определение показателей обмена железа и меди в сыворотке крови беременных могут быть использованы для динамического мониторинга с целью прогнозирования акушерских осложнений.

Выводы. Выявлено влияние гестационного процесса на показатели обмена железа и меди в сыворотке крови женщин. Гестационный процесс стимулирует увеличение церулоплазмينا и трансферрина в сыворотке крови женщин в 1,5 раза, при ожирении в 2 раза. Беременность в сочетании с ожирением формирует гиперферритинемию и анемию. Повышение в сыворотке крови беременных с ожирением содержания ферритина и церулоплазмينا статистически значимо коррелирует с индексом массы тела.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 4, 7, 11, 18-20, 22, 23 см. REFERENCES)

- Макарова Е.Л., Олина А.А., Падроль М.М. Оценка факторов риска развития избыточной массы тела и ожирения у женщин репродуктивного возраста. *Анализ риска*. 2020; 2:38-46.
- Скальный А.В. Микроэлементозы человека: гигиеническая диагностика и коррекция. *Микроэлементы в медицине*. 2000; 1: 83-4.
- Макарова Е.Л., Терехина Н.А. Показатели обмена железа в сыворотке крови беременных при экстрагенитальной патологии. *Уральский медицинский журнал*. 2020; 5 (188): 146 – 5.

8. Макарова Е.Л., Терехина Н. А., Падруль М.М. Статус железа в сыворотке крови беременных с анемиями. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. 2013;2: 58-9.
9. Макарова Е.Л., Терехина Н. А., Падруль М.М. Дисбаланс адипокинов в крови беременных при ожирении. *Пермский медицинский журнал*. 2016; 5(33): 38-42.
10. Макарова Е.Л., Терехина Н.А., Падруль М.М. Статус адипокинов в сыворотке крови беременных с ожирением. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 9(60): 61-2.
12. Тихомиров А.Л., Сарсания С.И. Рациональная терапия и современные принципы диагностики железодефицитных состояний в акушерско-гинекологической практике. *Фарматека*. 2009;1: 32-9.
13. Терехина Н.А., Падруль М.М., Макарова Е.Л. Влияние бактериофага на содержание железа и меди в сыворотке крови беременных с пиелонефритом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 6: 23-33.
14. Бурелев В.А., Орджоникидзе Н.В., Соколова М.Ю., Сулейманова И.Г., Ильясова Н.А. Возмещение дефицита железа у беременных с бактериально-вирусной инфекцией. *Журнал Российского общества акушеров-гинекологов*. 2006; 3: 11-4.
15. Шилин Д.Е. Применение кальция в первичной профилактике гестоза (с позиций доказательной медицины). *Русский медицинский журнал*. 2008; 16(25): 1689-95.
16. Серов В.Н., Блинов Д.В., Зимовина У.В., Джобава Э.М. Результаты исследования распространенности дефицита магния у беременных. *Акушерство и гинекология*. 2014;6: 23-7.
17. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: Интерпрессервис; 2003.
21. Громова О.А., Торшин И.Ю., Хаджидис А.К.. Анализ молекулярных механизмов воздействия железа (II), меди, марганца в патогенезе железодефицитной анемии. *Клиническая фармакология и фармакоэкономика*. 2010; 1: 20-9.
7. Gambling L., Danzeisen R., Fosset C., Andersen H.S., Dunford S., Srai S.K. et al Iron and Copper Interactions in Development and the Effect on Pregnancy Outcome. *J. Nutr*. 2003; 133(5):1554-6.
8. Makarova E.L., Terekhina N.A., Padrul'M.M. Serum iron status of pregnant women with anemia. *Meditinskiy alfavit. Sovremennaya laboratoriya*.2013;2:58-9. (in Russian)
9. Makarova E.L., Terekhina N.A., Padrul'M.M. Disbalans of adipokines in the blood of pregnant women with obesity. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*.2016; 5(33): 38-42. (in Russian)
10. Makarova E.L., Terekhina N.A., Padrul' M.M. Serum adipokine status in obese pregnant women. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 9(60): 61-2. (in Russian)
11. Ausk K.J., Ioannou G.N. Is obesity associated with anemia of chronic disease? A population-based study. *Obesity*. 2008; 16(10): 2356-61.
12. Tikhomirov A.L., Sarsaniya S.I. Rational therapy and modern principles of diagnostics of iron deficiency conditions in obstetric and gynecological practice. *Farmateka*. 2009; 1: 32-9. (in Russian)
13. Terekhina N.A., Padrul'M.M., Makarova E.L. Effect of bacteriophage on the content of iron and copper in the blood serum of pregnant women with pyelonephritis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 6: 23-33. (in Russian)
14. Burelev V.A., Ordgonikidze N.V., Sokolova M.U., Suleimanova I.G. Replacement of iron deficiency in pregnant women with bacterial viral infection. *Zhurnal Rossiyskogo obshchestva akusherov-ginekologov*.2006; 3: 11-4. (in Russian)
15. Shilin D.E. The use of calcium in primary prevention of gestosis (from the standpoint of evidence-based medicine). *Russkiy meditsinskiy zhurnal*.2008; 16(25):1689-95. (in Russian)
16. Serov V.N., Blinov D.V., Zimovina U.V. Results of a study on the prevalence of magnesium deficiency in pregnant women. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2014; 6: 23-7. (in Russian)
17. Kamyshnikov V.S. Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics [Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy laboratornoy diagnostike]. Минск: Interpresservis; 2003. (in Russian)
18. Dati F., Shumann G., Thomas L., Agnazi F., Baudner S., Bienvenu J. et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference range for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP reference material. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem*. 1996; 34: 517-20.
19. Burtis C., Ashwood E., Bruns D. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. *Elsevir Inc*. 2006; 2412.
20. Landers J.W., Zak B. Determination of serum copper and iron in a single small sample. *Am. J. Clin. Path*. 1958; 29(6): 590-2.
21. Gromova O.A., Torshin I.Y. Analysis of molecular mechanisms of influence of iron,copper, manganese in the pathogenesis of iron deficiency anemia. *Klinicheskaya farmakologiya I farmakoekonomika*. 2010; 1: 20-9. (in Russian)
22. Fleming R. Iron and inflammation: cross: talk between path: ways regulating hepcidin. *J.Mol.Med*. 2008; 86: 491-4.
23. Bekri S., Gual P., Anty R. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severy obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. 2006; 131:788-96.

REFERENCES

ИММУНОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Петрова О. В.^{1,2}, Твердохлебова Д. К.¹, Мурыгина О. И.¹, Смельцова Е. В.¹, Никулина Д. М.²

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СЛУЧАЕВ SARS-COV-2

¹ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава РФ, 414011, г. Астрахань, Россия;

²ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 414000, г. Астрахань, Россия

Цель – изучить диагностические характеристики тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2. Изучали диагностические характеристики двух тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2, зарегистрированных на территории Российской Федерации. Первая тест-система – набор для выявления суммарных антител к SARS-CoV-2 с помощью иммунохемилюминесцентного анализа на анализаторе «Cobas e 411» («Roche Diagnostics», Германия). Вторая тест-система – набор для выявления IgM и IgG к SARS-CoV-2 («Core Technology Co., Ltd», Китай) с помощью иммунохроматографического анализа. Биологическим материалом для исследования являлась сыворотка крови. Оценивали: диагностическую чувствительность, диагностическую специфичность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов.

У тест-систем для выявления суммарных антител к SARS-CoV-2 с помощью ИХЛА, диагностическая чувствительность и специфичность составили 100%; предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов – 100%. У тест-систем для выявления IgM и IgG к SARS-CoV-2 с помощью ИХА, диагностическая чувствительность для IgM и IgG составила 100%; диагностическая специфичность для IgM – 60%, IgG – 72%; предсказательная ценность положительного результата для IgM – 60%, IgG – 68,18%; предсказательная ценность отрицательного результата для IgM и IgG – 100%. Наилучшие диагностические характеристики были обнаружены у тест-систем для выявления суммарных антител к SARS-CoV-2, что необходимо учитывать при решении вопроса о приобретении тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2.

Ключевые слова: *коронавирусная инфекция; тест-системы; антитела.*

Для цитирования: Петрова О. В., Твердохлебова Д. К., Мурыгина О. И., Смельцова Е. В., Никулина Д. М. Диагностические характеристики серологических тестов для выявления случаев SARS-CoV-2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 210-212. DOI:<http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-212>

Petrova O. V.^{1,2}, Tverdokhlebova D. K.¹, Murygina O. I.¹, Smeltsova E. V.¹, Nikulina D. M.²

DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS OF SEROLOGICAL TESTS FOR THE DETECTION OF SARS-COV-2 CASES

¹Federal state budgetary establishment «Federal center cardiovascular surgery» (Astrakhan) Russia, Astrakhan, 414011, Russia;

²Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414000, Russia

To study the diagnostic characteristics of test systems for detecting antibodies to SARS-CoV-2.

We studied the diagnostic characteristics of two test systems for detecting antibodies to SARS-CoV-2, registered in the Russian Federation. The first test system is a kit for detecting total antibodies to SARS-Cov-2 using immunochemiluminescence analysis on the «Cobas e 411» analyzer («Roche Diagnostics», Germany). The second test system is a kit for detecting IgM and IgG to SARS-CoV-2 («Core Technology Co., Ltd», China) by immunochromatographic analysis. The biological material for the study was blood serum.

We assessed: diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, and predictive value of positive and negative results. In the test system for detecting total antibodies to SARS-CoV-2, using an IHLA, the diagnostic sensitivity and specificity were 100%; the predictive value of positive and negative results was 100%. In the test system for the detection of IgM and IgG to Sars-CoV-2, using IHA, diagnostic sensitivity for IgM and IgG were 100%; diagnostic specificity for IgM – 60%, for IgG – 72%; predictive value of a positive result for IgM – 60%, IgG – 68,18%; predictive value of negative results for IgM and IgG – 100%. The best diagnostic characteristics were found in the test system for the detection of total antibodies to SARS-CoV-2, which must be taken into account when deciding whether to purchase test systems for the detection of antibodies to SARS-CoV-2.

Key words: *coronavirus infection; test systems; antibodies.*

For citation: Petrova O. V., Tverdokhlebova D. K., Murygina O. I., Smeltsova E. V., Nikulina D. M. Diagnostic characteristics of serological tests for the detection of SARS-CoV-2 cases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 210-212 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-212>

For correspondence: *Petrova O.V.*, Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory, e-mail: students_asma@mail.ru

Information about authors:

Petrova O. V., <http://orcid.org/0000-0003-3544-2266>;

Tverdokhlebova D. K., <http://orcid.org/0000-0001-6754-6348>;

Murygina O. I., <http://orcid.org/0000-0002-0359-8664>;

Smeltsova E. V., <http://orcid.org/0000-0001-5661-3306>;
 Nikulina D.M., <http://orcid.org/0000-0002-7401-8671>.

Conflict of interests. The author declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 29.01.2021
 Accepted 20.02.2021

В декабре 2019 года мир столкнулся с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 (coronavirus disease 2019), вызванной severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) [1, 2]. В январе 2020 г. расшифрован геном SARS-CoV-2, благодаря чему разработаны серологические тест-системы для диагностики COVID-19 [3]. В мае 2020 г. на отечественном рынке появились первые иммунохроматографические тест-системы, в июне этого же года иммунохемилюминесцентные. Внедрение в практику серологических тест-систем позволило изучить кинетику появления антител при COVID-19 [4–6]. На сегодняшний день в литературе имеются единичные данные об диагностических характеристиках серологических тест-систем на COVID-19, в связи с чем, представляется интерес их изучить.

Цель исследования – изучить диагностические характеристики тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2.

Материал и методы. Изучили диагностические характеристики тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2.

Первая тест-система – набор для выявления суммарных антител к SARS-CoV-2 («Roche Diagnostics», Германия). Выявление суммарных антител к SARS-CoV-2 осуществляли с помощью иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) на анализаторе «Cobas e 411» («Roche Diagnostics», Германия) согласно инструкции производителя. Чувствительность – 100%, специфичность – 99,81%.

Вторая тест-система – набор для выявления IgM и IgG к SARS-CoV-2 («Core Technology Co.,Ltd», Китай). Выявление IgM и IgG к SARS-CoV-2 осуществляли с помощью иммунохроматографического анализа (ИХА) согласно инструкции производителя. Чувствительность – 100%, специфичность – 100%.

Обе тест-системы зарегистрированы на территории Российской Федерации, в них в качестве антигена использован нуклеокапсидный белок. Биологическим материалом для исследования являлась сыворотка крови, для получения которой требовалась предварительная пробоподготовка: центрифугирование в течение 10 мин при 1500 об/мин.

Наборы для ИХА состояли из кассет, каждая кассета упакована в индивидуальную упаковку. Определение IgM и IgG производили одновременно на одной диагностической кассете. Оценка результатов исследования проводилась визуально через 10 мин после внесения биологического материала и буфера.

В исследовании приняли участие 40 человек, из них 25 условно здоровых лиц и 15 человек с COVID-19, у которых диагноз был верифицирован на основании эпидемиологического анамнеза, клинической картины и результатов ПЦР. Все участники исследования дали информированное согласие на участие в исследовании.

Рассчитывали диагностические характеристики тест-систем: диагностическую чувствительность (ДЧ)

и специфичность (ДС), предсказательную ценность положительного результата (ПЦПР) и отрицательного (ПЦОР) результатов.

ДЧ рассчитывали по формуле: $ДЧ = a / (a + c) \times 100\%$;

ДС рассчитывали по формуле $ДС = d / (b + d) \times 100\%$;

ПЦПР рассчитывали по формуле $ПЦПР = a / (a + b) \times 100\%$;

ПЦОР рассчитывали по формуле $ПЦОР = d / (c + d) \times 100\%$,

где а – больные, выявленные с помощью теста (истинно положительные), b – здоровые, имеющие положительный результат теста (ложно положительные), с – больные, не выявленные с помощью теста (ложно отрицательные), d – здоровые, имеющие отрицательный результат теста (подлинно отрицательные) [7].

Результаты. Учитывая данные в литературе о сероконверсии АТ у больных COVID-19 [6,8 -11], тестирование пациентов проводили на 9-10-е сутки от момента появления первых симптомов ОРВИ. Результаты ПЦР, ИХЛА, ИХА условно-здоровых лиц и пациентов COVID-19 представлены в табл. 1.

Из представленных данных в табл. 1 следует, что у всех пациентов с COVID-19 результаты исследования на суммарные АТ к SARS-CoV-2 были положительные (табл. 2).

ИХА позволил обнаружить IgM у 25 человек, из них у 10 условно здоровых лиц и 15 пациентов с COVID-19; IgG – у 22 человек, из них у 7 условно-здоровых лиц и 15 пациентов с COVID-19 (табл. 2). Полученные результаты указывают на то, что при использовании ИХА для диагностики COVID-19, возможно получение ложноположительных результатов, вероятно за счёт перекрёстных реакций. Изучить причину перекрёстных реакций не представилось возможным.

Ложноотрицательных результатов в нашем наблюдении не выявлено (см. табл. 1).

Все случаи инфицирования COVID-19 внешние, пациенты имели контакт с больными COVID-19. У 12 пациентов из 15 заболевание протекало в лёгкой форме в виде ОРВИ, у 3 – с поражением лёгких. У пациентов с лёгкой формой COVID-19 в 100% случаях отмечалась лихорадка, 100% – боль в горле, 100% – слабость, 100% – нарушение обоняния.

Таблица 1

Результаты ПЦР, ИХЛА, ИХА

Метод исследования	Результат	
	положительный	отрицательный
ПЦР	15	25
ИХЛА, суммарные АТ к SARS-CoV-2	15	25
ИХА, IgM	25	15
IgG	22	18

Таблица 2

Результаты информативности тест-систем

Тест-система	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР
ИХЛА, суммарные АТ к SARS-CoV-2	100%	100%	100%	100%
ИХА, IgM	100%	60%	60%	100%
IgG	100%	72%	68,18%	100%

У пациентов с поражением лёгких в 100% случаях отмечалась лихорадка, 100% – боль в горле, 100% – слабость, 100% – нарушение обоняния, 100% – кашель, 100% – одышка, 20% случаев – энтерит. Пациенты с лёгкой формой COVID-19 лечились амбулаторно, выписаны в среднем на 15,2±0,4 сут. Пациенты с поражением лёгких лечились в стационаре, в среднем выписаны на 24,33±0,9 сут.

Для оценки информативности тест-систем с позиций доказательной медицины рассчитаны ДЧ, ДС, ПЦПР, ПЦОР результатов. Результаты информативности тест-систем представлены в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2, показано, что тест-система для выявления суммарных АТ имеет 100% ДЧ, ДС, ПЦПР и ПЦОР. У иммунохроматографической тест-системы ДЧ для IgM и IgG составила 100%; ДС для IgM – 60%, IgG – 72%; ПЦПР для IgM – 60%, IgG – 68,18%; ПЦОР – 100%.

Обсуждение. В настоящее время на отечественном рынке представлено большое количество серологических тест-систем различных производителей для выявления антител к SARS-CoV-2.

Внедрение в практику серологических тест-систем позволило изучить сроки появления и динамику изменения антител к SARS-CoV-2 [4,5]. В среднем сроки появления антител к SARS-CoV-2 составляют 8-10 дней от начала появления клинической симптоматики заболевания [8 – 10]. В литературе имеются данные об одновременном появлении в крови антител IgM и IgG у больных COVID-19 [8 – 10]. Установлено, что IgM, IgG могут длительное время (более 60 сут) персистировать в крови у пациентов, переболевших COVID-19 [8]. Вышеперечисленные особенности гуморального иммунитета указывают на преимущества определения суммарных антител над определением отдельных антител или группы антител к SARS-CoV-2 [8,9,11].

В литературе мало данных о диагностических характеристиках (диагностической чувствительности и специфичности, положительной и отрицательной прогностической значимости) тест-систем на COVID-19. В связи с этим мы попытались их изучить.

Результаты нашего предварительного исследования позволили определить следующие диагностические характеристики тест-систем (см.табл. 2).

У тест-систем для выявления суммарных антител к SARS-CoV-2 с помощью ИХЛА, диагностическая чувствительность и специфичность составили 100%; предсказательная ценность положительного и отрицательно-го результатов – 100%.

У тест-систем для выявления IgM и IgG к SARS-CoV-2 с помощью ИХА, диагностическая чувствительность для IgM и IgG составили 100%; диагностическая специфичность для IgM – 60%, IgG – 72%; предсказа-

тельная ценность положительного результата для IgM – 60%, IgG – 68,18%; предсказательная ценность отрицательного результата для антител IgM и IgG – 100%.

Наилучшие диагностические характеристики обнаружены у тест-систем для выявления суммарных антител к SARS-CoV-2. Несмотря на малое количество наблюдений, полученные нами результаты исследования можно использовать при решении вопроса о приобретении тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2 с учётом цели исследования (исследования с целью скрининга или для определения наличия иммунитета).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 6, 8 – 11 см. REFERENCES)

7. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. М.: Геотар-Медиа; 2007.

REFERENCES

1. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J. et al. Novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8):727–33. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
2. Cheng V.C., Lau S.K., Woo P.C., Yuen K.Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20(4):660–94. doi: 10.1128/CMR.00023-07.
3. Huang Y., Lau S.K., Woo P.C., Yuen K.Y. CoVDB: a comprehensive database for comparative analysis of coronavirus genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: D504–D511. doi: 10.1093/nar/gkm754.
4. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F. et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am* 2020. doi:10.1093/cid/ciaa310j
5. Haveri A., Smura T., Kuivanen S., Osterlund P., Hepojoki J., Ikonen N. et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 2020; 25. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.2000266/
6. Li Y., Yao L., Li J., Chen L., Song Y., Cai Z. et al. Stability Issues of RT-PCR Testing of SARS-CoV-2 for Hospitalized Patients Clinically Diagnosed with COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020. doi:10.1002/jmv.25786.
7. Kishkun A.A. Guide to laboratory diagnostic methods [Руководство по лабораторным методам диагностики]. Moscow: «Geotar-Media»; 2007. (in Russian)
8. Li Z., Yi Y., Luo X., Xiong N., Liu Y., Li S. et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J. Med. Virol.* 2020. doi:10.1002/jmv.25727 .
9. Linton N.M., Kobayashi T., Yang Y., Hayashi K., Akhmetzhanov A.R., Jung S-M. et al. Incubation Period and Other Epidemiological Characteristics of 2019 Novel Coronavirus Infections with Right Truncation: A Statistical Analysis of Publicly Available Case Data. *J. Clin. Med.* 2020; 9. doi:10.3390/jcm9020538.
10. Tian X., Li C., Huang A., Xia S., Lu S., Shi Z. et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. *Emerg. Microbes Infect.* 2020;9 /382-5. doi:10.1080/22221751.2020.1729069.
11. Zhao J., Yuan Q Wang H., Liu W., Liao X., Su Y., Wang X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 2020. doi:10.1093/cid/ciaa344.

ЦИТОЛОГИЯ

© ПОЖАРСКАЯ В.В., 2021

Пожарская В.В.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ ДЕЛЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У ШКОЛЬНИКОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ В СРЕДНИХ И ВЫСОКИХ ШИРОТАХ

ФГБУН ФИЦ Кольский научный центр РАН, 184209, Апатиты, Россия

Интенсивное промышленное развитие северных регионов РФ прежде всего связано с добычей и переработкой природных ресурсов, что приводит к загрязнению окружающей среды и делает актуальным задачи санитарно-гигиенического мониторинга. Для быстрой диагностики генетического благополучия среды удобны экспресс-методы, одним из которых является микроядерный тест в сочетании с цитокинетическим блоком цитохалазином В. Ценность данного метода, несмотря на его трудоемкость, заключается в том, что в результате представляется возможность оценить различные цитогенетические параметры на разных стадиях митоза. На данный момент имеются скудные данные по межширотному сравнению результатов цитогенетических исследований на клетках различных тканей человека, что в значительной мере затрудняет сопоставление получаемых в Арктической зоне РФ результатов с данными из более южных районов. Цель данного исследования состоит в выявлении и сравнении аномалий деления в клетках лимфоцитов периферической крови у двух групп школьников старшего возраста, проживающих в средних и высоких широтах. Исследование проводилось в г. Серпухов Московской области (54° 54' 56" с.ш., 37° 24' 40" в.д.) и г. Апатиты Мурманской области (67° 34' 03" с. ш., 33° 23' 36" в. д.). Всего обследовано 40 детей в возрасте 16-18 лет – по 20 детей из г. Серпухова и из г. Апатиты. Микроядерный тест проводился согласно международному протоколу. Цитогенетический анализ лимфоцитов периферической крови школьников с использованием микроядерного теста показал, что спонтанное число клеток с микроядром сопоставимо в средних и в высоких широтах, и приближаются к верхней границе значений среднепопуляционной нормы. Следовательно, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках лимфоцитов периферической крови исследуемых групп допустимо не учитывать широту проживания.

Ключевые слова: микроядра; лимфоциты; микроядерный тест; нарушения деления; высокие широты; Арктика.

Для цитирования: Пожарская В.В. Цитогенетические аномалии деления лимфоцитов крови у школьников, проживающих в средних и высоких широтах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 213-216.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-212>

Pozharskaya V.V.

CYTOGENETIC STATUS OF BLOOD LYMPHOCYTES IN SCHOOLCHILDREN LIVING MIDDLE AND HIGH LATITUDES

Federal Research Centre «Kola Science Centre of the Russian Academy of Sciences», Apatity, 184209, Russia

Intensive industrial development of the northern regions of the Russian Federation is primarily associated with the extraction and processing of natural resources, which leads to environmental pollution and makes the tasks of sanitary and hygienic monitoring urgent. Rapid methods are convenient for the rapid diagnosis of the genetic well-being of the environment, one of which is the micronucleus test in combination with the cytokinetic block cytochalasin B. mitosis. At the moment, there are scanty data on the inter-latitudinal comparison of the results of cytogenetic studies on cells of various human tissues, which greatly complicates the comparison of the results obtained in the Arctic zone of the Russian Federation with data from more southern regions. The purpose of this study is to identify and compare division abnormalities in cells of peripheral blood lymphocytes in two groups of older schoolchildren living in middle and high latitudes. The study was carried out in the city of Serpukhov, Moscow region (54° 54' 56" N, 37° 24' 40" E) and the city of Apatity, Murmansk region (67° 34' 03" N, 33° 23' 36" E). A total of 40 children aged 16-18 were examined – 20 children each from the city of Serpukhov and from the city of Apatity. The micronucleus test was carried out in accordance with the international protocol. Cytogenetic analysis of schoolchildren's peripheral blood lymphocytes using the micronucleus test showed that the spontaneous number of cells with micronuclei is comparable in middle and high latitudes, and approaches the upper limit of the mean population norm. Therefore, when comparing the data of the micronucleus test on the cells of peripheral blood lymphocytes of the studied groups, it is permissible not to take into account the latitude of residence.

Key words: micronucleus; human lymphocytes; micronucleus assay high latitude, Arctic.

For citation: Pozharskaya V.V. Cytogenetic status of blood lymphocytes in schoolchildren living middle and high latitudes.

Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2021; 66 (4): 210-212 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-212>

For correspondence: *Pozharskaya Victoria Victorovna*, Candidate of Biological Sciences, Research Officer; e-mail: vika_pozharskaja@mail.ru

Information about author:

Pozharskaya V.V., <http://orcid.org/0000-0002-5172-9446>.

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 11.11.2020

Accepted 16.11.2020

Введение. Согласно имеющимся данным в высоких широтах отмечается повышенная заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований [1-3]. В последние годы было показано, что в заболеваемость жителей арктического региона вносят высокоширотные космо- и гелиофизические агенты, ассоциированные с солнечной активностью [4], повышающие чувствительность к воздействию высокоширотных факторов среды и, приводящие к снижению адаптационных возможностей организма. При этом интенсивное промышленное развитие северных регионов Российской Федерации, прежде всего связанное с добычей и переработкой природных ресурсов, приводит к загрязнению окружающей среды и делает актуальным эколого-гигиенический мониторинг и поиск новых методов оценки генетического благополучия среды. Для диагностики благополучия среды и оценки мутагенного эффекта отдельных ее факторов удобны экспресс-методы, одним из которых является цитогенетический тест на лимфоцитах периферической крови человека. Ценность данного метода, несмотря на его трудоемкость, заключается в том, что в результате представляется возможность оценить различные цитогенетические параметры на разных стадиях митоза, и помимо микроядерного теста, возможно получить более объективную картину состояния различных характеристик хромосомного аппарата. Данный метод получил довольно широкое распространение, но несмотря на это, на данный момент отсутствуют данные по межширотному сравнению результатов цитогенетических исследований на клетках различных тканей детей, что в значительной мере затрудняет сопоставление получаемых в Арктической зоне РФ результатов с данными из более южных районов.

Цель данного исследования состоит в выявлении и сравнении цитогенетических нарушений в клетках лимфоцитов периферической крови у двух групп школьников старшего возраста, проживающих в средних и высоких широтах. Выбор детей старшего школьного возраста для исследования обусловлен следующими фактами. Во-первых, дети более чувствительны к генотоксическим агентам, чем взрослые. Во-вторых, они в течение всей своей жизни проживают чаще всего на рассматриваемой территории, тогда как взрослые могут не единожды менять место своего проживания. Кроме того, возможно интервьюирование их по широкому спектру вопросов [5].

Исследование проводилось в г. Серпухов Московской области (54° 54' 56" с.ш., 37° 24' 40" в.д.) и г. Апатиты Мурманской области (67°34'03" с. ш., 33°23'36" в. д.). Всего обследованы 40 детей в возрасте 16-18 лет: по 20 детей из г. Серпухова и из г. Апатиты. Микроядерный тест проводился согласно международному протоколу.

Материал и методы. Выбор исследуемых территорий. Для проведения межширотного сравнения были выбраны населенные пункты, расположенные в разных широтах, сопоставимые по социально-экономическому развитию, транспортной доступности, доступности и качеству медицинской помощи, общим сетям поступления продуктов питания, половозрастной и этнической структуре населения и т.д.

В средних широтах был выбран г. Серпухов Московской области (54° 54' 56" с.ш., 37° 24' 40" в.д.), поскольку он соответствовал описанным выше критериям. В качестве города-сравнения для проведения межширотного сравнения рассматривались города, расположенные за полярным

кругом Европейской части РФ, в связи с их наилучшей транспортной доступностью, промышленной развитостью и наибольшей плотностью населения и сходности представленного этнического населения. Наиболее развитой транспортной доступностью в данном регионе отличается Мурманская область, большая часть которой расположена за Полярным кругом. Среди крупных городов области г. Апатиты (67°34'03" с. ш., 33°23'36" в. д.) отличается отсутствием градообразующего предприятия, развитостью промышленного производства, сельского хозяйства, строительства, торговли, транспорта (в городе имеется своя железнодорожная станция и аэропорт), научной сферы.

Исследуемые группы. Всего для исследования цитогенетических параметров на лимфоцитах периферической крови были выбраны 40 детей – по 20 детей из каждого города. Исследование проводилось в среднеобразовательных школах среди учеников 10-11 классов, в возрасте 16-18 лет. Перед началом исследования были получены информированные согласия от родителей или опекунов детей на участие.

Перед взятием образцов венозной крови проводилось интервьюирование по специально разработанному опросному листу, позволяющее оценить степень подверженности вредным привычкам. Опросник включал в себя вопросы относительно места рождения, длительности проживания в данном населенном пункте, питания, роста, веса, вакцинации, употребления витаминов и медикаментозных препаратов, хронических и острых заболеваний, прохождения рентгенологических обследований, семейной истории относительно онкологических заболеваний, образа жизни, т.к. данные факторы могут иметь серьезное влияние на результаты, получаемые при оценке нестабильности генома человека с помощью микроядерного теста [6-9]. Также проводилось психологическое тестирование с помощью общепринятых тестов, среди которых – шкала тревожности Спилберга-Ханнина, Тест САН и др.

Критерии исключения: онкологические заболевания в семейной истории, наличие хронических заболеваний, диабет и ожирение, курение, употребление алкоголя, простудные заболевания в течение двух месяцев до исследований, прохождение рентгенологических исследований в течение полугода, использование в питании продуктов с приусадебного хозяйства, вегетарианство, высокий уровень тревожности подростка.

Цитогенетический тест на периферических лимфоцитах проводили на ФГА-стимулированных лимфоцитах цельной периферической крови человека в соответствии с методикой [10, 11]. Долю двуядерных клеток с микроядрами оценивали относительно 1000 двуядерных клеток, цитокinesis которых был остановлен цитохалазином В (ЦХВ), т.е. в клетках, проходивших первый митоз между 48 и 72 ч после стимуляции ФГА [12]. Оценку частоты встречаемости клеток с генетическими и цитологическими нарушениями проводили на основе анализа не менее 1000 клеток на каждом препарате. На препаратах идентифицировали: одноядерные клетки, все клетки без нарушений (1-, 2-, 3- и 4-ядерные клетки), все клетки с микроядром или несколькими микроядрами. Микроядра идентифицировали как хроматиновые округлые тела с гладким непрерывным краем, размером не более 1/3 ядра, лежащие отдельно от основного ядра, не преломляющие свет, с интенсивностью окрашивания и рисунком хроматина, как у основного ядра, и находящиеся в одной плоскости с ядром.

Анализ препаратов проводили с помощью микроскопа AXIOSTAR PLUS (Karl Zeiss, Германия) (об. 15 x ок. 40, 100), оснащенного камерой CoolSNAPes (Photometrics) с цифровой системой регистрации и обработки изображения на базе ПЗС (Media Cybernetics, Inc.).

Частота встречаемости клеток представлена как средняя частота на 1000 клеток с ошибкой. Достоверность различий между группами определялась согласно критерию Манна-Уитни. Критический уровень для подтверждения нулевой гипотезы принимался в 5% ($p < 0,05$). Статистический анализ был выполнен с использованием пакета программ Statistica 10.0.

Результаты. Средние арифметические значения спонтанной частоты лимфоцитов периферической крови с микроядрами в исследуемых группах, оцененные с помощью микроядерного теста в сочетании с цитокинетическим блоком цитохалазином В, в рассматриваемых группах школьников достоверно не отличалось (см. таблицу) и не превышали показатели, характерные для среднепопуляционной нормы [11].

Обсуждение. Микроядра являются признанными биомаркерами генотоксического действия различных факторов. Они представляют собой отдельную часть генетического материала вне основного ядра, которая является либо фрагментом хромосомы, образованной в результате повреждения ДНК, либо одной или несколькими целыми хромосомами, отстающими в анафазе и не включенными в основное ядро [13]. По сравнению с хромосомным анализом лимфоцитов, подсчет микроядер более прост и дешев, но при этом, по чувствительности не уступает метафазному анализу [14]. При этом, в ряде исследований показано, что микроядерный тест может быть более чувствительным, чем тест хромосомных аберраций [10], но позволяет выявлять только часть мутационного спектра [15]. На данный момент имеются доказательства наличия разных механизмов возникновения двуядерных клеток, но при этом до сих пор остается неисследованной связь между спонтанной частотой встречаемости двуядерных лимфоцитов в культуре периферической крови и одноядерными клетками, содержащими микроядра. Поэтому в данных исследованиях, несмотря на общий учет всех лимфоцитов вне зависимости от их плоидности, при оценке цитогенетической нестабильности одноядерные клетки не рассматривались.

Несмотря на распространенность метода оценки генотоксических свойств среды с помощью микроядерного теста на протяжении нескольких последних десятилетий, на данный момент отсутствуют данные о возможности сопоставления полученных результатов разных авторов даже в пределах одного региона. Имеются лишь отрывочные данные, характеризующие вариативность пролиферативного пула, полученного от одного донора, также отмечены вариации при подсчете препаратов разными исследователями [11]. Данное исследование проводилось в один сезон, с минимально возможной временной разницей в заборе крови у школьников разных широт, культивирование клеток и анализ препаратов проводился одним человеком для избегания вариативности в идентификации аномалий деления.

При оценке частоты встречаемости полиядерных лимфоцитов у подростков, проживающих в средних и высоких широтах, установлено, что в Московской области (г. Серпухов) спонтанная частота встречаемости среди лимфоцитов крови полиядерных клеток без микроядер ниже, чем в крови подростков, проживающих

Частота встречаемости полиядерных лимфоцитов у подростков (16-18 лет), проживающих в различных регионах, на 1000 клеток, %

Показатели	Средние широты г. Серпухов (n=20)	Высокие широты г. Апатиты (n=20)
Число бинуклеарных лимфоцитов без микроядра	921,1±5,5	932,4±4,8
Число бинуклеарных лимфоцитов с микроядром	17,0±1,1	17,3±1,2
Число клеток содержащих микроядра, без учета двуядерных лимфоцитов	12,5±1,3	10,8±1,4
Всего лимфоцитов с микроядром	29,5±2,2	29,1±2,0
Общее число полиядерных лимфоцитов	948,5±3,6	956,2±2,4
Общее число полиядерных лимфоцитов, без учета бинуклеарных лимфоцитов	27,4±3,9	22,6±3,1

на территории Мурманской области (г. Апатиты). Однако, меньшее число 3 и 4-ядерных лимфоцитов в пуле культивированных лимфоцитов у подростков, проживающих в г. Апатиты (22,6±3,1 против 27,4±3,9 у подростков, проживающих в Московской области), на фоне большего общего числа многоядерных лимфоцитов (956,2±2,4 против 948,5±3,6) позволяет предположить, что влияние региональных условий проживания проявляется в различной скорости деления клеток. При этом, общее число как всех полиядерных клеток с микроядром (29,5±2,2 в средних широтах и 29,1±2,0 в высоких широтах), так и только бинуклеарных лимфоцитов с микроядром (17,0±1,1 и 17,3±1,2, соответственно) сопоставимо и приближаются к верхней границе значений среднепопуляционной нормы. Следовательно, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках лимфоцитов периферической крови вполне допустимо не учитывать широту проживания исследуемых групп.

Заключение. В ходе проведенных исследований не выявлено значимых различий в частоте встречаемости микроядер в лимфоцитах периферической крови подростков, проживающих в различных широтах, и, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках лимфоцитов периферической крови вполне допустимо не учитывать широту проживания исследуемых групп старших школьников. Но, имеющаяся тенденция к снижению частоты встречаемости спонтанных 3- и 4-ядерных лимфоцитов в пуле культивированных лимфоцитов у подростков, проживающих в Мурманской области (22,6±3,1) против 27,4±3,9 у подростков, проживающих в Московской области, на фоне большего общего числа многоядерных лимфоцитов (956,2±2,4 против 948,5±3,6) позволяет предположить, что влияние региональных условий проживания есть, и проявляется в различной скорости деления клеток.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность канд. биол. наук Петрову Владимиру Николаевичу за помощь в организации исследования в г. Серпухов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5, 7, 8, 10, 11
см. REFERENCES)

1. Гундаров И.А., Зильберт Н.Л. Изучение региональных различий в заболеваемости и смертности населения с позиций синдрома географической широты. *Вестник академии медицинских наук СССР*. 1991;11:52-6.
2. Белишева Н.К., Петров В.Н. Проблема здоровья населения в свете реализации стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации. *Труды Кольского научного центра*. 2013; 6 (19):20.
4. Белишева Н. К., Талыкова Л. В., Мельник Н. А. Популяционные эффекты воздействия космических лучей в высоких широтах. *Медико-биологические эффекты действия радиации: материалы международной конференции (10-11 апреля 2012 г.)*. Москва: ФГУ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России; 2012.
6. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 2. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе оценки нестабильности генома человека. Дополнительные возможности теста. Методика проведения экспериментов и цитогенетического анализа. *Экологическая генетика*. 2006; 4(4): 38-54.
9. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток. *Экологическая генетика*. 2006; 3(4): 7-19.
12. Пелевина И. И., Афанасьев Г. Г., Алещенко А. В., Антошина М. М., Готлиб В. Я., Конрадов А. А. и др. Молекулярно-клеточные последствия аварии на ЧАЭС. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2011; 1 (51): 154-61.
13. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. *Медицинская генетика*. 2007; 6 (11):3-12.
14. Горова А.И., Климкина И.И. Использование цитогенетического тестирования для оценки экологической ситуации и эффективности оздоровления детей и взрослых природными адаптогенами. *Цитология и генетика*. 2002; 5 (36): 21-5.
15. Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Красавин Е.А. Действие малых доз облучения на клетки китайского хомячка. *Радиационная биология*. 1998; 6 (38): 841-7.

REFERENCES

1. Gundarov I.A., Zil'bert N.L. Study of regional differences in the population morbidity and mortality from the standpoint of geographical latitude syndrome. *Vestnik akademii meditsinskikh nauk SSSR*. 1991;11: 52-6. (in Russian)
2. Belisheva N.K., Petrov V.N. The Murmansk region's population health when implementing the strategy of the development of the Russian Federation's Arctic zone. *Trudy Kol'skogo nauchnogo tsentra*. 2013; 6 (19): 20. (in Russian)

3. Young T.K., Kelly J.J., Friborg J., Soininen L., Wong K.O. Cancer among circumpolar populations: an emerging public health concern. *International Journal of Circumpolar Health*. 2016;75:12.
4. Belisheva N. K., Talykova L. V., Mel'nik N. A. [Population effects of cosmic rays in high latitudes. Biomedical effects of radiation *Mediko-biologicheskie jeffekty dejstvija radiacii: materialy mezhdunar. konf.* (10-11/04/2012)]. Moscow: FGU FMBC im. A. I. Burnazyana FMBA Rossii; 2012. (in Russian)
5. Neri M., Ceppi M., Knudsen L.E., Merlo D.F., Barale R., Puntoni R. et al. Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environmental Health Perspectives*. 2005; 113: 1226-9.
6. Ingel' F.I. Prospects for the use of the micronucleus test on human blood lymphocytes cultivated under conditions of a cytokinetic block. Part 2. Environmental factors and individual characteristics in the system for assessing the instability of the human genome. Additional test capabilities. Experimental technique and cytogenetic analysis. *Ekologicheskaya genetika*. 2006; 4(4): 38-54. (in Russian)
7. Bukvic N., Gentile M., Susca F. et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat. Res*. 2001; 12 (498): 159-67.
8. Venkatachalam P., Solomon F. D., Prabhu B. K. et al. Estimation of dose in cancer patients treated with fractionated radiotherapy using translocation, dicentric and micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res*. 1999; 1 (429): 1-12.
9. Ingel' F.I. Prospects for the use of the micronucleus test on human blood lymphocytes cultivated under conditions of a cytokinetic block. Part 1. Cell proliferation. *Ekologicheskaya genetika*. 2006; 3(4): 7-19. (in Russian)
10. Fenech M., Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*. 1985; 43 (172): 233-46.
11. Fenech M., Bonassi S., Turner J., Lando C., Ceppi M., Chang W. P. et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003; 1-2 (534): 45-64.
12. Pelevina I. I., Afanas'ev G. G., Aleshchenko A. V., Antoshina M. M., Gotlib V. Ja., Konradov A. A. et al. Molecular-cellular consequences of the Chernobyl accident. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2011; 1 (51): 154-61.
13. Sycheva L.P. Biological significance, criteria for determination and limits of variation of the full spectrum of karyological parameters in assessing the cytogenetic status of a person. *Meditsinskaya genetika*. 2007;6 (11):3-12. (in Russian)
14. Gorovaya A.I., Klimkina I.I. The use of cytogenetic testing to assess the ecological situation and the effectiveness of the rehabilitation of children and adults with natural adaptogens. *Tsitologiya i genetika*. 2002; 5 (36): 21-5. (in Russian)
15. Shmakova N.L., Fadeeva T.A., Krasavin E.A. The effect of low doses of radiation on Chinese hamster cells. *Radiatsionnaya biologiya*. 1998; 6 (38): 841-7. (in Russian)

Поступила 11.11.20
Принята к печати 16.11.20

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Савелькаева М.В., Кунгурцева Е.А., Воропаева Н.М.

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ, К ПРЕПАРАТАМ БАКТЕРИОФАГОВ

ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, 664003, Иркутск, Россия

Оценён уровень чувствительности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей первого полугодия жизни с функциональными гастроинтестинальными расстройствами (ФГИР), к коммерческим препаратам бактериофагов. Материалом служили фекалии 67 детей первого полугодия жизни с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании. Культуры *K. pneumoniae*, выделенные из фекалий детей, составили две группы сравнения в зависимости от возраста пациентов. В первую группу включены 43 штамма *K. pneumoniae*, изолированных из толстой кишки детей в возрасте от рождения до трёх мес., во вторую группу – 24 штамма, от детей в возрасте от трёх до шести мес. Изучение состава микробиоты толстой кишки осуществляли стандартными методами, результаты оценены в соответствии с отраслевым стандартом 91500.11.0004-2003. Идентификацию *K. pneumoniae* проводили бактериологическим методом. Определение уровня литической активности бактериофагов клебсиелл пневмонии, клебсиелл поливалентного, секстафага к штаммам *K. pneumoniae* вели капельным методом (spot-test) согласно клиническим рекомендациям. Формирование симптомов ФГИР у детей коррелирует с возрастом – частота срыгиваний уменьшалась у детей до шести месяцев (с 23,3% до 4,2%) на фоне формирования симптомокомплекса, связанного с расстройством дефекации. Бактериологический анализ показал, что фаги проявляют низкий уровень литической активности, чувствительность к ним *K. pneumoniae* коррелирует с возрастом и выше у детей трёх-шести мес. В первой группе сравнения в три раза чаще регистрировали отсутствие лизиса *K. pneumoniae* по отношению к бактериофагу клебсиелл пневмонии (30,2%, $p < 0,05$) и в два раза реже (30,2%, $p < 0,05$) низкий уровень лизиса штаммов *K. pneumoniae* к фагу клебсиелл поливалентному по сравнению со второй группой. Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* к секстафагу сопоставима в группах сравнения и варьировала от 2 до 10%. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* наблюдается низкий уровень чувствительности к специфическим препаратам – бактериофагу клебсиелл пневмонии, клебсиелл поливалентному, секстафагу. Данный факт отражает недостаточную активность фагов и прогнозирует низкую эффективность эмпирической фаготерапии без элиминации из кишечного биоценоза *K. pneumoniae* у детей с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании.

Ключевые слова: бактериофаги; *Klebsiella pneumoniae*; дети первого полугодия жизни; функциональные гастроинтестинальные расстройства; грудное вскармливание.

Для цитирования: Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Савелькаева М.В., Кунгурцева Е.А., Воропаева Н.М. Оценка чувствительности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты толстой кишки у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами, к препаратам бактериофагов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (4): 217-222. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-217-222>

Grigorova E.V., Rychkova L.V., Belkova N.L., Nemchenko U.M., Savelkaeva M.V., Kungurtseva E.A., Voropaeva N.M.

EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF BACTERIOPHAGE PREPARATIONS TO *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM THE COLON MICROBIOTA IN CHILDREN WITH FUNCTIONAL GASTROINTESTINAL DISORDERS

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

The level of sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children of the first half of life with functional gastrointestinal disorders (FGID) to commercial bacteriophage preparations was assessed. The material was the feces of 67 children of the first half of life with FGID who are breastfed. Culture of *K. pneumoniae* isolated from faeces of children, amounted to two comparison groups, depending on the age of the patients. The first group included 43 *K. pneumoniae* strains isolated from the colon of children aged from birth to three months, in the second group – 24 strains, from children aged three to six months. The composition of the colon microbiota was studied using standard methods, and the results were evaluated in accordance with Industry Standard 91500.11.0004-2003. Identification of *K. pneumoniae* was performed by bacteriological methods. Determination of the level of lytic activity of *K. pneumoniae*, *Klebsiella* polyvalent and sextaphage bacteriophages to *K. pneumoniae* strains was conducted by the drip method (spot-test) according to clinical recommendations. It is shown that the formation of FGID symptoms in children correlates with age – the frequency of regurgitation decreased in children up to six months (from 23.3% to 4.2%) against the background of the formation of a symptom complex associated with defecation disorder. Bacteriological analysis showed that in General, phages show a low level of lytic activity, sensitivity to them *Klebsiella* also correlated with age and was higher in children of three to six months. Thus, in the first comparison group, the absence of *Klebsiella* lysis in relation to the *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage was registered three times more often (30.2%, $p < 0.05$) and twice less often (30.2%, $p < 0.05$), the low level of lysis of *K. pneumoniae* strains to the *Klebsiella* polyvalent phage compared to the second group. The sensitivity of *K. pneumoniae* strains to sextaphage was comparable in comparison groups and varied from 2 to 10%. Thus, among the studied *K. pneumoniae* observed

Для корреспонденции: Григорова Екатерина Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. микробиома и микроэкологии;
e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru

a low level of sensitivity to specific drugs – bacteriophage Klebsiella pneumoniae, Klebsiella polyvalent and sextaphage. This fact reflects the insufficient activity of phages and predicts low effectiveness of empirical phage therapy without elimination from the intestinal biocenosis of K. pneumoniae in children with FGID who are breastfed.

Key words: *bacteriophages; Klebsiella pneumoniae; children of the first half of life; functional gastrointestinal disorders; breastfeeding.*

For citation: Grigorova E.V., Rychkova L.V., Belkova N.L., Nemchenko U.M., Savelkaeva M.V., Kungurtseva E.A., Voropaeva N.M. Evaluation of the sensitivity of bacteriophage preparations to *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the colon microbiota in children with functional gastrointestinal disorders. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 217-222 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-217-222>

For correspondence: Grigorova E. V., PhD of biological Sciences, researcher of the laboratory of the microbiome and microecology; e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru

Information about authors:

Grigorova E.V., ORCID iD: 0000-0001-6588-2591;
Rychkova L.V., ORCID iD: 0000-0003-2910-0737;
Belkova N. L., ORCID iD: 0000-0001-9720-068X;
Nemchenko U.M., ORCID iD: 0000-0002-7656-342X;
Savelkaeva M.V., ORCID iD: 0000-0001-6793-6493;
Kungurtseva E.A., ORCID iD: 0000-0002-4535-9397;
Voropaeva N.M., ORCID iD: 0000-0001-7026-2522 X.

Acknowledgment. *The study was performed within the framework of the budget theme № AAAA-A18-118051190033-0.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 15.07.2020
Accepted 01.09.2020

Введение. В последние годы возросло количество функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ). Доминирующее место среди УПМ занимают бактерии рода *Klebsiella*, сем. *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* – клинически значимый вид, в норме колонизирующий носоглотку, кишечник и другие биотопы организма человека. При дисбалансе видовых и количественных характеристик ассоциативной микробиоты толстой кишки [1] этот патоген может вызывать поражения различных органов, приводя к летальным исходам у почти 30% детей [2]. По данным Роспотребнадзора, во все сезоны года дети становятся наиболее часто поражаемым контингентом (более 60%) [3]. Формирование ФГИР у детей первых месяцев жизни может быть ассоциировано с микрофлорой матери, грудным видом вскармливания, активностью генетически детерминированных механизмов, особенностями главной системы антигенной гистосовместимости и степенью активности пассивного иммунитета [4].

В кишечной микробиоте детей первых месяцев жизни сдерживающим фактором распространения клинически значимых штаммов *K. pneumoniae* могут являться бактериофаги, продуцирующие специфические ферменты, разрушающие клеточные полисахариды бактерий [5]. Бактериофаги обладают высокоспецифичным действием, направленным против определённых видов целевых микроорганизмов, в том числе резистентных к лекарственным препаратам [6]. Экспериментальные исследования показывают, что применение бактериофагов даёт положительные результаты при лечении заболеваний, вызванных УПМ, в том числе у новорожденных и детей первого года жизни [3]. Важным условием эффективности фаготерапии необходимо считать оценку фагочувствительности, выделенной из клинического материала пациента культуры УПМ, с целью индивидуального подбора препарата для элиминации возбудителя [7]. Использование бактериофагов может стать альтернативой применения антибиотиков и проводиться как моно-, так и комбинированной терапией [8, 9].

Цель исследования – оценить чувствительность штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у детей первого полугодия жизни с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании, к коммерческим препаратам бактериофагов.

Материал и методы. Объектом исследования являлись дети в возрасте от рождения до 6 месяцев ($n=67$), обращавшиеся к гастроэнтерологу клиники ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск. В работе с пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, в редакции Бразилия, октябрь 2013) и «Правилами надлежащей клинической практики», утверждёнными приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 200Н. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ.

Критерии включения в исследование. Дети с ФГИР, находящиеся на грудном вскармливании (согласно МКБ-10, 2003; Римским критериям IV, 2016 г.; Рабочего протокола диагностики и лечения функциональных заболеваний органов пищеварения у детей, 2010), индикация в фекалиях клинически значимого вида *K. pneumoniae* в титре более 10^4 КОЕ/г (согласно Отраслевому стандарту «Протокол ведения больных дисбактериоз кишечника», 2003¹).

Критерии исключения. Дети, имеющие в анамнезе органические заболевания желудочно-кишечного тракта и перенесшие инфекции различной локализации, принимавшие антибактериальные, пробиотические препараты и лечебные бактериофаги в предшествующие три месяца до обследования; дети, находящиеся на искусственном и смешанном вскармливании.

Материалом исследования служили фекалии 67 детей первого полугодия жизни с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании. Изучение состава микробиоты

¹Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ №231 от 09.06.2003:7.

Клиническая характеристика обследуемых детей

Симптомы	Дети от рождения до трёх месяцев (n=43)	Дети от трёх до шести месяцев (n=24)	Значение критерия Фишера ($\varphi_{эмп}$)	Уровень значимости, p
Расстройства дефекации	18 / 41,9*	15 / 62,5	1,633	>0,05
Колики	1 / 2,3	1 / 4,2	0,412	>0,05
Вздутие, повышенное газообразование	11 / 25,6	4 / 16,7	0,861	>0,05
Срыгивания	10 / 23,3	1 / 4,2	2,336	<0,01
Симптомокомплекс (от общего количества обследованных):				
Вздутие, повышенное газообразование и срыгивания	3 / 6,9	0	2,098	<0,05 (принята гипотеза H1)
Расстройства дефекации с пигментированной слизью	0	2 / 8,3	2,299	<0,01
Расстройства дефекации, повышенное газообразование	0	1 / 4,2	1,614	>0,05

Примечание. * – абсолютные значения / частота выявления симптома, %.

толстой кишки осуществляли стандартным бактериологическим методом, результаты оценены в соответствии с ОСТ, 2003¹. Идентификацию *K. pneumoniae* проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим свойствам с использованием АРІ-систем «bioMérieux» (Франция). Культуры *K. pneumoniae* разделили на две группы сравнения в зависимости от возраста пациентов. В 1-ю группу включили 43 штамма *K. pneumoniae* (64,2% от общей выборки), выделенных от детей в возрасте от рождения до 3-х месяцев, во 2-ю – 24 штамма (35,8%), выделенных от детей в возрасте от трёх до шести месяцев. Для выявления капсульных штаммов использован метод окраски по Бурри-Гинсу.

Для оценки чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к фагам использованы коммерческие препараты бактериофагов производства НПО «Микроген», г. Пермь (Россия) с заявленной активностью против клебсиелл – бактериофаг клебсиелл пневмонии (флаконы по 20 мл, серия П259 06.2020 г., г. Пермь), бактериофаг клебсиелл поливалентный (флаконы по 20 мл, серия У387 02.2020 г., г. Уфа), секстафаг (флаконы по 20 мл, серия П3 01.2021 г., г. Пермь).

Определение уровня литической активности (УЛА) бактериофагов к штаммам *K. pneumoniae* проводили капельным методом (spot-test) согласно Федеральным клиническим рекомендациям². Для тестирования использован приготовленный из суточных культур *K. pneumoniae* инокулюм. По стандартной методике готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 по Макфарланду (контроль с помощью денситометра). Хлопковым тампоном проводили инокуляцию на поверхность среды в трёх направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Чашки подсушивали 30-60 мин при комнатной температуре, накрыв их стерильными бумажными фильтрами. На подсушенную поверхность стерильной пипеткой наносили препараты бактериофагов в объёме 20 мкл. Чашки повторно подсушивали 15-30 мин, закрывали, переворачивали, инкубировали 18-20 ч при температуре 37° С. Оценку УЛА выполняли по четырёхкратной

системе: «-» – отсутствие литической активности, «+» – низкая активность, «++» – образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерии, «+++» – зона лизиса с единичными колониями вторичного роста, «++++» – прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста. Исследование проводили в трёх повторах. Для исследуемой выборки штаммов *K. pneumoniae* ставили контроли: положительный – бульон с культурой без фага и контроль стерильности.

Для анализа клинической характеристики обследуемых детей и оценки УЛА, выделенных из фекалий детей, статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета лицензионных прикладных программ «MS Office Excel 2007 for Windows 7» по методу Фишера. При определении значения критерия Фишера ориентировались на два положения: если значение точного критерия Фишера больше критического принималась нулевая гипотеза (H0) и делали вывод об отсутствии статистически значимых различий частоты исхода в зависимости от фактора риска; если значение точного критерия Фишера меньше критического принималась альтернативная гипотеза (H1) и делали вывод о наличии статистически значимых различий частоты исхода в зависимости от воздействия фактора риска. При уровне $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Результаты. По результатам клинического обследования врачом-гастроэнтерологом диагноз ФГИР подтвержден у всех пациентов (табл. 1).

Клиническая картина ФГИР представлена расстройствами дефекации, вздутием, коликами, повышенным газообразованием, обильным срыгиванием продолжительностью не менее 12 нед за период наблюдения. Срыгивание после кормления в объёме более 1 чайной ложки (5 мл) и повторяющееся до 5-8 раз в день наблюдали у четверти младенцев в возрасте до трёх месяцев – 10 детей (23,3%), что статистически значимо чаще по сравнению с группой детей трёх-шести месяцев – 4,2% ($p < 0,01$). У обследуемых установлены сочетания симптомов: у детей до трёх мес – вздутие, повышенное газообразование ассоциировано со срыгиванием (6,9%, $p < 0,05$), у детей трёх-шести мес – расстройства дефекации сопряжены с появлением в фекалиях слизи жёлтого и жёлто-зелёного цвета – 8,3% ($p < 0,01$).

²Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоземической практике. Федеральные клинические рекомендации. Москва; 2014.

Следующим этапом работы было выделение чистых культур *K. pneumoniae*. Морфологически бактерии представлены грамотрицательными палочковидными (окраска по Граму), неподвижными формами, не образующими спор. При окраске по Бурри-Гинсу капсулы регистрировались у половины исследуемых культур *K. pneumoniae*: у 21 культуры (48,8%) 1-й группы и у 10 культур (41,7%) 2-й группы сравнения. На агаризованных питательных средах колонии *K. pneumoniae* имели гладкую поверхность со слизистой оболочкой. По биохимическим характеристикам все штаммы ферментировали глюкозу с образованием газа, лактозу, маннит, сахарозу, лизин-декарбоксилазу, инозит, сорбит, утилизировали цитрат, восстанавливали нитраты в нитриты, гидролизировали мочевины, не ферментировали орнитиндекарбоксилазу, фенилаланиндезаминазу, не образовывали индола и сероводорода, реакция с метиловым красным отрицательна, Фогеса-Проскауэра положительна.

Заключительным этапом исследования стало тестирование бактериофагов на штаммы клебсиелл. УЛА тестируемых бактериофагов на клетки *K. pneumoniae* в группах сравнения различался (табл. 2).

При воздействии бактериофага клебсиелл пневмонии на *K. pneumoniae* в 1-й группе сравнения лизис не наблюдался в 30,2% случаев, что в три раза чаще, чем во второй – 8,3% ($p < 0,05$) (табл. 2). Низкий УЛА и формирование вторичного роста *K. pneumoniae* сопостави-

мы по частоте встречаемости в группах сравнения. При применении бактериофага клебсиелл поливалентного на бактерии в 1-й группе сравнения в два раза реже выявлен низкий УЛА – 30,2% ($p < 0,05$), лизис со вторичным ростом наблюдали в три раза чаще – в 25,6% случаев ($p < 0,05$), чем во 2-й группе. При тестировании секстафага на клетки клебсиелл УЛА сопоставимы в группах сравнения ($p > 0,05$). Все три бактериофага не лизировали *K. pneumoniae* на четыре креста (++++) (табл. 2).

Обсуждение. По мнению многих учёных, внутриутробный, неонатальный, грудной периоды являются критическими этапами формирования кишечного микробиома ребёнка, от которых во многом зависит состояние его здоровья в течение всей жизни [10]. По нашим данным ФГИР грудного периода характеризуются расстройствами дефекации, коликами, срыгиваниями, вероятно ассоциированными с незрелостью иммунной системы, слабостью нижнего пищеводного сфинктера и аномальной моторикой пищевода, которые приводят к самопроизвольному забросу желудочного содержимого в пищевод [11].

Развитие многих заболеваний кишечника может быть опосредовано угнетением индигенной и активизацией условно-патогенной микробиоты (клебсиеллы, золотистый стафилококк, клостридии) [12 – 14]. Присутствие *K. pneumoniae* в микробиоте толстой кишки у детей может быть обусловлено несколькими причинами: несо-

Таблица 2

Уровни литической активности препаратов бактериофагов в отношении штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у детей с ФГИР

Литическая активность препарата бактериофага клебсиелл пневмонии				
Уровень литической активности фага (по количеству крестов)	Группа 1 (штаммы <i>K. pneumoniae</i> , выделенные у детей в возрасте от рождения до 3-х мес ($n=43$))	Группа 2 (штаммы <i>K. pneumoniae</i> , выделенные у детей в возрасте от 3-х до 6 мес ($n=24$))	Значение критерия Фишера ($\Phi_{эмп}$)	Уровень значимости, p
-	13 / 30,2	2 / 8,3	2,271	<0,05 (Принята гипотеза Н1)
+	11 / 25,6	10 / 41,7	1,345	>0,05
++	13 / 30,2	8 / 33,3	0,261	>0,05
+++	6 / 14,0	4 / 16,7	0,296	>0,05
++++	0	0	0	0
Литическая активность препарата бактериофага клебсиелл поливалентного				
-	16 / 37,2	6 / 25,0	1,040	>0,05
+	13 / 30,2	13 / 54,2	1,923	<0,05 (Принята гипотеза Н1)
++	11 / 25,6	2 / 8,3	1,864	<0,05 (Принята гипотеза Н1)
+++	3 / 7,0	3 / 12,5	0,738	>0,05
++++	0	0	0	0
Литическая активность препарата секстафага				
-	7 / 16,3	2 / 8,3	0,961	>0,05
+	24 / 55,8	11 / 45,8	0,785	>0,05
++	10 / 23,3	7 / 29,2	0,528	>0,05
+++	2 / 4,7	4 / 16,7	1,595	>0,05
++++	0	0	0	0

Примечание. «-» – отсутствие литической активности, «+» – низкая активность, «++» – образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерии, «+++» – зона лизиса с единичными колониями вторичного роста, «++++» – прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста; абсолютные значения / частота регистрации, %.

зрелой иммунной системой ребёнка, несформированной постоянной микрофлорой, высокой агрессивностью патогена, связанной с маркерами вирулентности, низкой способностью защитных факторов грудного молока, высокой обсеменённостью УПМ матери (вагинальная микрофлора, грудное вскармливание) или госпитальной среды [4, 15]. Разнообразие симптоматики ФГИР, в частности, формирование стула с пигментированной слизью, может быть детерминировано не только высоким титром, но и способностью *K. pneumoniae* продуцировать слизь.

При правильном применении бактериофаги помогают справиться с разными видами патологии. Они могут оказывать огромное влияние на иммунитет детей грудного возраста. При использовании бактериофагов стимулируются факторы специфического и неспецифического иммунитета [2,16,17]. Отмечают позитивное воздействие ряда факторов иммунной системы на исход фаготерапии и, соответственно, большую литическую активность бактериофагов *in vivo* [18,19].

По результатам исследований последних лет установлен переменный уровень фагочувствительности культур *K. pneumoniae* у детей с ФГИР [5,20]. Наши данные показывают, что все три бактериофага, используемые в исследовании, обладали низким УЛА. Суммарно показатели отсутствия лизиса «-» и низкой литической активности «+» составили от 50 до 75% независимо от вида фага. Бактериофаг клебсиелл пневмонии и секстафаг характеризовались более выраженной литической активностью (суммарно показатели образования зон лизиса с колониями вторичного роста бактерии (++ и +++)) в отношении штаммов второй группы сравнения (50 и 45,9% фагочувствительных изолятов) по сравнению с бактериофагом клебсиелл поливалентным (20,8%). Поддержание длительности ФГИР у конкретного ребёнка, очевидно, может быть обусловлено непрерывной циркулирующей устойчивых к фагам штаммов в микробиоте кишечника. Исследователи из разных регионов России отмечают в качестве причины проявления высокого уровня резистентности штаммов *K. pneumoniae* (до 80% и выше) к фагам не только наличие специфических структур защиты бактерий (например, капсул) [21], но и смену доминирующего штамма (клона) или малое представительство (или полное отсутствие) штаммов бактерий, изолированных от региональных пациентов, в процессе изготовления бактериофагов [22]. Нормализация микрофлоры, возможное участие бактериофага в поддержании колонизационной резистентности и оральной толерантности поможет обеспечить стабилизацию гуморального и клеточного звеньев иммунитета у детей грудного возраста [3]. Наиболее выраженной литической активностью фага клебсиелл пневмонии в отношении исследуемых культур указывает на возможность его перспективного использования для коррекции и лечения ФГИР, ассоциированных с *K. pneumoniae* у детей. Обязательным условием должно являться предварительное определение фагочувствительности выделенных штаммов. Так же для восстановления индигенной микробиоты толстой кишки и, как следствие, элиминации клинически значимого патогена *K. pneumoniae* дополнительно может быть рекомендовано применение пробиотических препаратов [11, 23].

Заключение. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* наблюдается низкий уровень чувствительности к специфическим препаратам – бактериофагу

клебсиелл пневмонии, клебсиелл поливалентному, секстафагу. Данный факт отражает недостаточную активность фагов и прогнозирует низкую эффективность эмпирической фаготерапии без элиминации из кишечного биоценоза *K. pneumoniae* у детей с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании.

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетной темы № АААА-А18-118051190033-0.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 9, 14, 16-20, 23
см. REFERENCES)

1. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б., Немченко У.М., Рычкова Л.В. Выявление шигатоксинпродуцирующих штаммов *Escherichia coli* в популяциях нормальной кишечной микрофлоры у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (11): 56-60.
2. Акимкин В.Г., Дарбева О.С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. *Клиническая практика*. 2010; 4: 48-54.
3. Топчий Н.В., Топорков А.С. Бактериофаги в лечении острых кишечных инфекций. *Медицинский совет*. 2015;8: 74-81.
4. Алёшкин В.А., Алёшкин А.В., Афанасьев С.С., Караулов А.В., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Рубальский Е.О. Микробиоценоз кишечника. *Вопросы диетологии*. 2015; 5(4): 15-52.
5. Козлова А.И., Топальский Д.В. Чувствительность к антибиотикам и бактериофагам клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с классическим и гипермукоидным фенотипами. *Военная медицина*. 2019; 1: 45-8.
7. Тапальский Д.В., Козлова А.И. Чувствительность к препаратам бактериофагов клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности. *Проблемы здоровья и экологии*. 2018; 56-62.
8. Вакарина А.А., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. Влияние бактериофагов на чувствительность условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам. *Журнал микробиологии*. 2019; (2): 3-7.
10. Николаева И.В., Царегородцев А.Д., Шайхиева Г.С. Формирование кишечной микробиоты ребёнка и факторы, влияющие на этот процесс. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2018; 63: 13-8. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>
11. Ардатская М.Д., Бельмер С.В., Добрица В.П., Захаренко С.М., Лабезник Л.Б., Минушкин О.Н. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 117(5): 13-50.
12. Корниенко Е.А. Антибиотикоассоциированная диарея у детей. *Consilium Medicum. Педиатрия*. 2015; (1): 59-62. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>.
13. Григорова Е. В., Иванова Е. И., Немченко У. М., Савелькаева М. В., Рычкова Л. В., Шолохов Л. Ф., Колесникова Л. И. Особенности микробиоты толстой кишки в зависимости от вида вскармливания у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2019; 36: 85-90.
15. Урсова Н.И. Значение грудного вскармливания для роста и развития младенца. *Альманах клинической медицины*. 2015; (42): 23-37. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2015-42-23-37>.
21. Григорова Е.В., Немченко У.М., Ракова Е.Б., Савелькаева М.В., Сердюк Л.В. Капсулообразование как фактор селекции фагорезистентных штаммов *Klebsiella* spp. у детей с функциональными нарушениями пищеварения. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016;12: 9-12.
22. Завгородняя Е.Ф., Сташкевич Л.А. Динамические наблюдения за условно-патогенными бактериями при нарушениях кишечной микробиоты у взрослого населения г. Хабаровска. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2016; 31:80-5.

REFERENCES

1. Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Iu.P., Rakova E.B., Nemchenko U.M., Rychkova L.V. The detection of strains of *Escherichia coli* producing Shiga toxin in populations of normal intestinal microbiota in children with functional disorders of gastrointestinal tract. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (11): 56-60. (in Russian)
2. Akimkin V.G., Darbeeva O.S., Kolkov V.F. Bacteriophages: historical and modern aspects of their application: experience and prospects. *Klinicheskaya praktika*. 2010; 4: 48-54. (in Russian)
3. Topchiy N.V., Toporkov A.S. Bacteriophages in the treatment of acute intestinal infections. *Meditsinskiy sovet*. 2015;8: 74-81. (in Russian)
4. Aleshkin V.A., Aleshkin A.V., Afanas'ev S. S., Karaulov A. V., Voropaeva E. A., Afanas'ev M. S., Nesvizhskiy Yu. V., Rubal'skiy E. O. The intestinal microbiota. *Voprosy dietologii*. 2015; 5(4): 15-52. (in Russian)
5. Kozlova A.I., Tapal'skiy D. V. Sensitivity to antibiotics and bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with classical and hypermucoid phenotypes. *Voennaya meditsina*. 2019; 1: 45-8. (in Russian)
6. Ganeshan S.D., Hosseinidoust Z. Phage Therapy with a Focus on the Human Microbiota. *Antibiotics (Basel)*. 2019; 8(3): 131. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030131>.
7. Tapal'skiy D. V., Kozlova A. I. Sensitivity to bacteriophage preparations of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with different levels of antibiotic resistance. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2018; 56-62. (in Russian)
8. Vakarina A.A., Kataeva L.V., Stepanova T.F. Influence of bacteriophages on the sensitivity of opportunistic bacteria to antibacterial drugs. *Zhurnal mikrobiologii*. 2019; (2): 3-7. (in Russian)
9. Adebayo O.S., Rao G.A., O T. M., Sunday K.J. Phage therapy: a potential alternative in the treatment of multidrug-resistant bacterial infections. *Journal of microbiology and Experimentation*. 2017; 5: 1-4. <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00173>.
10. Nikolaeva I.V., Tsaregorodtsev A. D., Shaykhieva G. S. Formation of the child's intestinal microbiota and factors affecting this process. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2018; 63: 13-8. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>. (in Russian)
11. Ardatskaya M. D., Bel'mer S. V., Dobritsa V. P., Zakharenko S. M., Labeznik L. B., Minushkin O. N. Intestinal dysbiosis (dysbacteriosis): current state of the problem, comprehensive diagnostics and therapeutic correction. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2015; 117(5): 13-50. (in Russian)
12. Kornienko E.A. Antibiotic-associated diarrhea in children. *Consilium Medicum. Pediatriya*. 2015; 1: 59-62. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>. (in Russian)
13. Grigorova E.V., Ivanova E.I., Nemchenko U.M., Savel'kaeva M.V., Rychkova L.V., Sholokhov L.F., Kolesnikova L.I. Features of succession in colon microbiota in children with functional gastrointestinal disorders depending on the type of feeding. *Dal'nevostochnyi zhurnal infeksionnoy patologii*. 2019; 36: 85-90. (in Russian)
14. Ivanova E.I., Rychkova L.V., Nemchenko U.M., Bukharova E.V., Savelkaeva M.V., Dzhioev Y.P. The structure of the intestinal microbiota of the intestine and the frequency of detection of pathogenicity genes (stx1, stx2, bfp) in *Escherichia coli* with normal enzymatic activity isolated from children during the first year of life. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017; 32(1): 42-8. <https://doi.org/10.3103/S0891416817010062>.
15. Ursova N. I. The significance of breastfeeding for the infant growth and development. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2015; 42: 23-37. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2015-42-23-37>. (in Russian)
16. Lopetuso L.R., Giorgio M.E., Saviano A., Scaldaferrri F., Gasbarrini A., Cammarota G. Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 183. <https://doi.org/10.3390/ijms20010183>.
17. Sinha A., Maurice C. F. Bacteriophages: Uncharacterized and Dynamic Regulators of the Immune System. *Mediators Inflamm.* 2019: 3730519. <https://doi.org/10.1155/2019/3730519>.
18. Furfaro L.L., Chang B.J., Payne M.S. Applications for Bacteriophage Therapy during Pregnancy and the Perinatal Period. *Front Microbiol.* 2017; 8: 2660. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02660>.
19. Roach D.R. Leung C.Y., Henry M., Morello E., Singh D., P Di Santo J., Weitz J. S., Debarbieux L. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe*. 2017; 22: 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.018>.
20. Romero-Calle D., Benevides R. G., Góes-Neto A., Billington C. Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics (Basel)*. 2019; 8(3): 138. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030138>.
21. Grigorova E.V., Nemchenko U.M., Rakova E.B., Savel'kaeva M.V., Serdyuk L.V. Capsule formation as a factor of selection of phage-resistant strains of *Klebsiella* spp. in children with functional digestive disorders. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2016; 12: 9-12. (in Russian)
22. Zavgorodnyaya E.F., Stashkevich L.A. Dynamic observations of opportunistic bacteria in disorders of the intestinal microbiota in the adult population of Khabarovsk. *Dal'nevostochnyi zhurnal infeksionnoy patologii*. 2016; 31: 80-5. (in Russian)
23. Roshni Amalaradjou M.A., Bhunia A.K. Modern Approaches in Probiotics Research to Control Foodborne Pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 2012; 67: 185-239.

Поступила 15.07.20
Принята к печати 01.09.20

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Герасимова Е. Н., Исмагуллин Д. Д., Лямин А. В., Жестков А. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *MYCOBACTERIUM FORTUITUM* GROUP (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО Самарский ГМУ Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

*Нетуберкулёзным микобактериям в последнее время посвящается всё больше научных работ отечественными и зарубежными исследователями. Одной из главных причин этого является увеличение числа пациентов с иммуносупрессиями различного генеза, усовершенствованием качества лабораторной и инструментальной диагностики микобактериозов. В статье внимание уделяется представителям *M. fortuitum* group, как основным патогенам среди группы быстрорастущих микобактерий. Приведены данные о современной классификации микобактерий на основании использования молекулярно-генетических исследований. *M. fortuitum* group включает в себя: *Mycobacterium fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. porcinum*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. boenickei*, *M. conceptionense*, *M. septicum*, *M. alvei*. Согласно новым данным микобактерии разделены на 5 клад (*Abscessus-Chelonae*, *Fortuitum-Vaccae*, *Terrae*, *Triviale*, *Tuberculosis-Simiae*), выделены новые роды в семействе *Mycobacteriaceae*: *Mycolicibacter* spp., *Mycolicibacillus* spp., *Mycobacteroides* spp., *Mycolicibacterium* spp. В соответствии с новой классификацией представители *Mycobacterium fortuitum* group относятся к роду *Mycolicibacterium*. Обозначены основные эпидемиологические особенности о главных источниках распространения микобактерий, факторах и путях их передачи. Благодаря широкому распространению в окружающей среде представители *M. fortuitum* group способны вызывать заболевания лёгочной и внелёгочной локализации. Отмечены отличительные черты факторов патогенности, за счёт которых определяется течение заболевания. Указаны основные трудности и особенности определения чувствительности к антимикробным химиопрепаратам, приведены данные об основных особенностях антибиотикорезистентности *M. fortuitum* group. Использованы источники литературы, полученные из международных и отечественных баз данных: Scopus, Web of Science, Springer, PИИЦ.*

Ключевые слова: нетуберкулёзные микобактерии; микобактериозы; *M. fortuitum* group.

Для цитирования: Герасимова Е. Н., Исмагуллин Д. Д., Лямин А. В., Жестков А. В. Общая характеристика, особенности культивирования и антибиотикорезистентности представителей *Mycobacterium fortuitum* group (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 223-228. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-223-228>

Gerasimova E. N., Ismatullin D. D., Lyamin A. V., Zhestkov A. V.

GENERAL CHARACTERISTICS, FEATURES OF CULTIVATION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE REPRESENTATIVES OF *MYCOBACTERIUM FORTUITUM* GROUP REPRESENTATIVES (REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University 443099, Samara, Russia

*Recently, more and more scientific works have been devoted to non-tuberculous mycobacteria, both by domestic and foreign researchers. One of the main reasons for this is the increase in patients with immunosuppression of various origins, improvement of the quality of laboratory and instrumental diagnostics of mycobacteriosis. This article focuses on the representatives of the *M. fortuitum* group, as the main pathogens among the group of fast-growing mycobacteria. The data on the modern classification based on the use of molecular genetic studies are indicated. The *M. fortuitum* group includes: *Mycobacterium fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. porcinum*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. boenickei*, *M. conceptionense*, *M. septicum*, *M. alvei*. According to the new data, mycobacteria were divided into 5 clades (*Abscessus-Chelonae*, *Fortuitum-Vaccae*, *Terrae*, *Triviale*, *Tuberculosis-Simiae*), and based on molecular genetic studies, new genera in the *Mycobacteriaceae* family were isolated: *Mycolicibacter* spp., *Mycolicibacillus* spp., *Mycobacteroides* spp., *Mycolicibacterium* spp. In accordance with the new classification, representatives of the *Mycobacterium fortuitum* group belong to the genus *Mycolicibacterium*. The main epidemiological features of the main sources of the spread of mycobacteria, factors and ways of their transmission are indicated. Due to their wide distribution in the environment, representatives of the *M. fortuitum* group are capable of causing diseases of the pulmonary and extrapulmonary localization. The distinctive features of pathogenicity factors, due to which the course of the disease is determined, are noted. The article also indicates the main difficulties and features of determining the sensitivity to antimicrobial chemotherapy drugs, provides data on the main features of antibiotic resistance of *M. fortuitum* group. In preparing the review, literature sources obtained from international and domestic databases were used: Scopus, Web of Science, Springer, RSCI.*

Key words: non-tuberculous mycobacteria; mycobacteriosis; *M. fortuitum* group.

For citation: Gerasimova E.N., Ismatullin D.D., Lyamin A. V., Zhestkov A. V. General characteristics, features of cultivation and antibiotic resistance representatives of *mycobacterium fortuitum* group representatives (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 223-228 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-223-228>

For correspondence: *Ismatullin Danir Damirovich*, assistant of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology; e-mail: danirhalitov@mail.ru

Information about authors:

Gerasimova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-3446-0892>;
Ismatullin D.D., <https://orcid.org/0000-0002-4283-907X>;

Lyamin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>;
Zhestkov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3960-830X>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 27.01.2021
Accepted 27.02.2021

Таксономическое положение и характеристика представителей вида *Mycobacterium fortuitum* group. Представители рода *Mycobacterium* относятся к типу *Actinobacteria*, классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, подпорядку *Corynebacterineae*, семейству *Mycobacteriaceae*.

Первые сообщения о микобактериях, не относящихся к туберкулёзным, но вызывающих заболевания человека, стали появляться в середине XX века. В 1954 г. А. Тимре и Е. Рунуон, собрав значительную коллекцию нетуберкулёзных микобактерий (НТМ), выделенных из патологического материала от больных, и обобщив имеющиеся к тому времени данные о проблеме, опубликовали статью «Отношение атипичных кислотоустойчивых бактерий к заболеваниям человека». С этого периода в классификации болезней человека появилась новая нозологическая единица – микобактериоз (код по МКБ10 – А31 для лиц без ВИЧ инфекции и В20.0, куда относятся пациенты с болезнью, вызванной ВИЧ, «с проявлениями микобактериальной инфекции», т. е. как с туберкулёзом, так и с микобактериозом) [1].

Mycobacterium fortuitum group включает: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. senegalense*, *M. porcinum*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. boenickei*, *M. conceptionense*, *M. septicum*, *M. alvei*, большинство из которых относительно редко вызывают заболевания у людей. В 2018 г. опубликована статья, посвящённая новой классификации НТМ. Согласно новым данным микобактерии разделены на 5 клад (*Abscessus-Chelonae*, *Fortuitum-Vaccae*, *Terraе*, *Triviale*, *Tuberculosis-Simiae*), на основании молекулярно-генетических исследований выделены новые роды в семействе *Mycobacteriaceae*: *Mycolicibacter* spp., *Mycolicibacillus* spp., *Mycobacteroides* spp., *Mycolicibacterium* spp. [2]. В соответствии с новой классификацией представители *Mycobacterium fortuitum* group относятся к роду *Mycolicibacterium*.

Все представители рода грамположительны, морфологически представляют тонкие и длинные гиофоподобные клетки, в некоторых случаях могут давать не примыкающие друг к другу цепочки кокков (*M. septicum*, *M. alvei*). В мазках могут быть обнаружены ветвящиеся нити, которые формируются в результате разрушения мицелия микобактерий [3-11].

Культуральные свойства нетуберкулёзных микобактерий имеют как общие, так и отличительные черты. Представители *Mycobacterium fortuitum* group образуют нефотохромогенные колонии, диаметром 1-3 мм. Морфология колоний различна. *M. boenickei*, *M. brisbanense*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. peregrinum*, *M. septicum* образуют бежевые, *M. conceptionense*, *M. senegalense*, *M. alvei* непигментированные колонии, среди них *M. brisbanense*, *M. houstonense*, *M. senegalense* растут в виде гладких, круглых сплошных колоний, *M. alvei*, *M. boenickei*, *M. neworleansense*, *M. septicum* в виде грубых мозговидных колоний с зубчатыми краями. *M. peregrinum* – единственный представитель *M. fortuitum* group, форма роста которого характеризуется как проме-

жуточная между ровными гладкими и морщинистыми грубыми [3-4, 6-10].

Эпидемиология и клиническое значение представителей вида *Mycobacterium fortuitum* group. Представители *Mycobacterium fortuitum* group имеют широкое распространение в окружающей среде, некоторые авторы предполагают, основным местом обитания нетуберкулёзных микобактерий является почва и вода [12]. Не зафиксировано случаев передачи инфекции, вызванной *M. fortuitum* group непосредственно от пациента к пациенту.

Инфицирование чаще всего происходит через повреждённые кожные покровы при попадании инфицированной воды из окружающей среды. Другими возможными источниками инфекции *M. fortuitum* могут быть имплантированные устройства, такие как катетеры, и контаминированные эндоскопы. Наиболее подвержены микобактериозам, вызванным *Mycobacterium fortuitum* group, пациенты с медикаментозной иммуносупрессией и иммуносупрессией, не связанной с приёмом лекарственных препаратов (ВИЧ-инфекция, хроническая алкогольная интоксикация, сахарный диабет, метастатическая гепатобластома, пневмония, ХОБЛ, бронхоэктатическая болезнь, лимфаденит) [9, 13]. Кроме раневых инфекций представители *Mycobacterium fortuitum* group вызывают поражения в бронхолёгочной системе, однако возможно развитие патологии и других локализаций.

Описано этиологическое значение *M. boenickei*, *M. brisbanense*, *M. houstonense*, *M. neworleansense* при развитии абсцессов кожи и мягких тканей с ассоциированным остеомиелитом, бактериемии, эндокардита, кератита, лимфаденита, перитонита, послеоперационных инфекций. Вовлечение центральной нервной системы в патологический процесс встречается редко, но менингит может развиваться после травмы или операции. У пациентов с иммунодефицитом повышенный риск развития тяжёлых заболеваний, особенно связанных с бактериемией, обусловленной катетер-ассоциированными инфекциями [9]. *M. conceptionense* вызывают посттравматический остеоит, послеоперационный септический артрит, подкожный абсцесс, раневые инфекции после пластических операций, инфекцию послеоперационной раны и мочевыводящих путей [4, 14, 15]. *M. fortuitum* описана как причина инфекции кожи и мягких тканей; локализованные посттравматические раневые инфекции; хирургические раневые инфекции, особенно после маммопластики; кератит, лимфаденит, артрит, остеомиелит, редко менингит, эндокардит, гепатит, в основном у пациентов с ВИЧ-ассоциированным СПИДом или иммуносупрессией другой этиологии. Описаны случаи перитонита у пациентов, которым проводились процедуры диализа, пациентов с катетер-ассоциированным сепсисом, эмпиемой плевры [16-28].

M. peregrinum может вызывать инфекцию кожи и мягких тканей, бактериемию имплантируемого автоматического кардиовертера-дефибриллятора, инфицирование в результате хирургического вмешательства [29, 30].

M. senegalense является причиной катетер-ассоциированной бактериемии, раневой инфекции мягких тканей после контакта с загрязнённой аквариумной водой [31, 32]. *M. septicum* описана в качестве этиологической причины сепсиса, особенно у пациентов с онкогематологической заболеваемостью [11]. *M. porcinum* может вызывать постхирургические, посттравматические инфекции; катетер-ассоциированную бактериемию; острую раневую инфекцию, целлюлит, остеомиелит, паховый лимфаденит, септический артрит, абсцессы брюшной стенки [33]. *M. alvei* вызывает инфекции после протезирования колленного сустава [13].

Представителей *Mycobacterium fortuitum* group можно разделить на 2 группы: патогенные и низкопатогенные. Такая условная классификация НТМ имеет важное значение не только для клиницистов, но и для врачей-бактериологов, особенно в случае выделения близкородственных видов НТМ, относящихся к разным группам по клиническому значению. Перечень представителей *M. fortuitum* group, распределённых по клиническому значению, представлен в табл. 1.

Факторы патогенности. Взаимодействие микобактерий с клетками организма многообразный и длительный процесс с точки зрения патофизиологии. Процесс обнаружения и захвата макрофагальными клетками микобактерий возбудителей туберкулёза и нетуберкулёзных микобактерий в целом схож, однако имеет определённые отличительные признаки. Проведено исследование в отношении реакции макрофагов и быстро растущих (*M. abscessus*, *M. fortuitum*) и медленно растущих микобактерий (*M. celatum*, *M. tuberculosis*) [34]. Основной вопрос исследования заключался в возможном влиянии скорости роста и других морфологических особенностей на развитие патологического процесса при использовании клеточной линии моноцитов человека THP-1 (АТСС TIB 202). Процесс распознавания и проникновения *M. tuberculosis* в клетки THP-1 менее длительный и реализуется быстрее по сравнению с быстрорастущими микобактериями. Во многом процесс распознавания связан с наличием и непосредственным участием липидов из семейства липоарабиноманнаны (ЛЯМ), влияние которых на врождённый иммунитет организма зависит от особенностей химического строения их дистальных остатков арабинозы. Терминальные фрагменты липоарабиноманнана, конкретно их маннозные радикалы, неспецифически подавляют активацию Т-лимфоцитов и лейкоцитов периферической крови [35]. Это ведёт к нарушению иммунного ответа на микобактерии *M. tuberculosis*, содержащие маннозилированные ЛЯМ, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* и другие быстрорастущие микобактерии имеют липоарабиноманнаны с фосфатидилинозитолом и *M. chelonae* имеет немодифицированные ЛЯМ [36]. Возможно, благодаря этим отличиям в строении клеточной стенки и связаны различия в скорости иммунного ответа.

После инфицирования макрофагов THP-1 группой быстрорастущих микобактерий происходит стремительное окисление среды внутри клетки за счёт стимуляции синтеза активных форм кислорода, в результате чего окислительная среда ведёт к усиленному росту внутри макрофагов и повреждению различных клеточных элементов. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что быстрорастущие микобактерии вызывают иммунный ответ более стремительный и прогрессирующий в сравнении с типичными микобактериями такими как, например, *M. tuberculosis* [37].

Отмечено замедленное проникновение быстрорастущих микобактерий в макрофаги, благодаря продукции гликопептидной биоплёнки, которая способствует маскировке антигенных детерминант в ответ на компоненты клеток врождённого иммунитета. Благодаря образованию биоплёнок имеется определённая устойчивость к дезинфицирующим средствам, в частности, хлорсодержащим дезинфектантам. Эта способность является одним из факторов, ответственных за устойчивость и последующую колонизацию, в системах распределения питьевой воды [14]. Образование биоплёнки затрудняет эрадикацию НТМ с помощью обычных методов химической обработки и типичными веществами, таким как хлор, ртутьорганические соединения, щелочные глутаральдегиды [38]. Устойчивость к дезинфицирующим веществам биоплёнок зависит от сродства бактерий к поверхности и условий окружающей среды. *M. fortuitum* имеет более высокое сродство к образованию биоплёнок на нержавеющей стали, поливинилхлориде, поликарбонате, чем на меди и стекле [39]. Немаловажным фактором увеличения вирулентности нетуберкулёзных микобактерий является их устойчивость внутри биоплёнок к антимикробным химиопрепаратам, во многом за счёт горизонтального обмена генами между максимально близкорасположенными микобактериями, что способствует повышению вероятности мутаций ответственных за резистентность [40].

M. fortuitum способны запускать апоптоз у разных хозяев путём активации каспаз, вклад гибели клеток в патогенетическом действии микобактерий отмечен во многих публикациях. Апоптоз, опосредованный каспазой 8 и каспазой 3/7, способствует внутриклеточной персистенции *M. fortuitum* и *M. avium*, по крайней мере, на ранних стадиях инфекции [41].

Не стоит исключать наличия у *M. fortuitum* group потенциальных факторов вирулентности схожих с *M. tuberculosis*, таких как предотвращение слияния фагосома-лизосома, задержка секреции фактора некроза опухоли инфицированными клетками-хозяевами и активность каталазы [42].

Методы выделения. При диагностике микобактериозов клиническим материалом, чаще всего являются промывные воды бронхов, мокрота, пунктаты абсцессов, содержимое ран и раневых дренажей, биоптаты, кровь, ликвор. Средами для первичного посева являются среда Левенштейна-Йенсена, бульон Миддлбука, среда Огава, агар Саутона, среда МакКонки, которые поддерживают рост микобактерий. В России наибольшей популярностью пользуются среды, на которых культивируют представителей *M. tuberculosis* complex: среда Левенштейна-Йенсена, Финн II, бульон Миддлбука.

Таблица 1

Представители *Mycobacterium fortuitum* group, распределённые по клиническому значению

Нетуберкулёзные микобактерии с доказанным клиническим значением	Нетуберкулёзные микобактерии, для которых описаны единичные случаи выделения из клинического материала
<i>M. boenickei</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. houstonense</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. conceptionense</i>	<i>M. septicum</i> <i>M. alvei</i> <i>M. brisbanense</i> <i>M. neworleansense</i>

Видимый рост представителей *M. fortuitum* на питательных средах при температуре 25°C происходит за 3-7 дней, но при температуре выше 40°C рост колоний прекращается. На среде Левенштейна-Йенсена пигментобразование не происходит. Для *M. boenickei*, *M. houstonense*, *M. neworleansense*, *M. brisbanense*, *M. septicum* характерен рост на среде Левенштейна-Йенсена при температуре 35°C менее чем за 7 дней. Рост возможен на 5% солевом агаре и на среде МакКонки без кристаллического фиолетового при 28°C. *M. peregrinum* растёт в течение 7 дней на яичных средах при 28°C и 37°C, в качестве исключения возможен рост при температуре до 43°C. На агаре МакКонки рост происходит при 28°C, но до 37°C. Рост *M. alvei* при культивировании на среде Левенштейна-Йенсена при температуре 30°C появляется через 5 сут, при 37°C бактерии растут медленнее (рост появляется в течение 10-15 дней) [3, 7, 8, 43, 44].

Антибиотикорезистентность. Проблемы изучения антибиотикорезистентности НТМ можно разделить на две группы: трудности, связанные с преодолением врождённых генетических и физиологических механизмов резистентности и трудности лабораторной оценки восприимчивости к антимикробным препаратам (АМП).

Основой природной устойчивости НТМ является их богатая липидами наружная мембрана, которая обладает свойством гидрофобности, является непроницаемой для ряда АМП, сохраняет НТМ в фагоцитирующих клетках, обеспечивая их медленный рост [45]. Неполлярная клеточная поверхность микобактерий предотвращает связывание АМП, которые несут положительные и отрицательные заряды. Наряду со сниженной адгезией заряженных соединений, микобактерии обладают очень низкой скоростью транспорта веществ через наружную мембрану [46]. Гидрофобность НТМ обуславливает важные особенности их роста, отражающие трудности определения резистентности *in vitro* [47]. Эти особенности заключаются в пристеночном прикреплении и спонтанной агрегации микобактерий. НТМ не находятся во взвешенном состоянии в водной суспензии, а адгезируются на стенки лунок планшетов, в результате чего рутинное исследование антибиотикорезистентности не определяет последующую терапевтическую эффективность АМП. Рост НТМ сопровождается увеличением мутности инокулома, но при достижении средней экспоненциальной фазы роста мутность исчезает, и появляются видимые агрегаты различных размеров. Существует единственный механизм уменьшения агрегации колоний – применение детергентов [48]. Но использование детергента снижает гидрофобность мембран микобактерий, увеличивает их проницаемость и, следовательно, восприимчивость к АМП. Выбор неагрегирующих колоний не является решением проблемы, поскольку у клеток таких колоний понижена гидрофобность мембраны и изменен её состав. Микроорганизмы, выделенные из таких колоний, не являются репрезентативными по сравнению с микроорганизмами, выделенными от пациентов.

Основой антибиотикотолерантности к значительному числу АМП у НТМ является формирование биоплёнки. Поверхностное прикрепление микобактерий снижает их взаимодействие с дезинфицирующими средствами и АМП [38]. Как только клетки НТМ «прилипают», происходит их рост и образование биоплёнки совместно с другими микроорганизмами в полимерной матрице, состоящей из полисахаридов, липидов, ДНК,

белков. Важной особенностью является то, что микобактерии, растущие в биоплёнке, отличаются от тех, которые выращены искусственно в суспензии с повышенной устойчивостью к АМП. Микобактерии, выделенные из биоплёнки и посеянные на свежую питательную среду, теряют свою приобретённую устойчивость.

Важной особенностью физиологической резистентности НТМ является их способность персистировать в фагоцитирующих клетках и в гранулёмах инфицированных очагов [34]. В этом случае у микобактерий для обеспечения резистентности имеется не только клеточная стенка, но и мембрана фагоцитирующих клеток и слой клеток хозяина, составляющих гранулёму.

Важной составляющей резистентности НТМ является взаимосвязь скорости роста и эффективности антибактериальной терапии. Поскольку НТМ обладают медленным ростом, по сравнению с другими бактериями, воздействие на них АМП не вызывает гибели из-за нарушения роста. Поскольку АМП имеет единственную мишень (например, ДНК-полимеразу), его воздействие будет ингибировать активность ДНК-полимеразы, что приведёт к «неуравновешенному» состоянию, при котором увеличение ДНК непропорционально увеличению клеточной массы. «Несбалансированный» рост клеток бактерий ведёт их к гибели, особенно быстро это происходит в быстро делящихся клетках (например, *E. coli*). В отличие от *E. coli*, клетки НТМ могут реагировать на антибиотический стресс, синтезируя белки и другие компоненты клетки, способные защитить клетки до того, как их «заставят» делиться. Эта особенность объясняет способность НТМ расти при высокой температуре. У некоторых микобактерий, выращенных при температуре 42°C концентрация трегалозы в 10 раз выше, чем у НТМ, выращенных при температуре 25°C [43].

НТМ обладают выраженными физиологическими и врождёнными факторами резистентности, главным из которых является наличие гидрофобной наружной мембраны [14]. Антимикробная терапия должна учитывать данный фактор.

Одним из успешных путей разработки АМП в отношении НТМ является синтез гидрофобных производных существующих АМП. Синтезированы гидрофобные производные эритромицина, такие как кларитромицин и азитромицин, которые оказались эффективными при лечении пациентов, инфицированных НТМ, независимо от формы инфекционного процесса.

Другим успешным подходом к преодолению гидрофобного барьера наружной мембраны НТМ является применение комбинаций АМП. Наиболее эффективными являются комбинации, действующие на разные мишени микобактериальной клетки. Например, этамбутол уменьшает гидрофобный и непроницаемый барьер наружной мембраны, что ведёт к увеличению транспорта второго лекарственного средства. Принятие этой точки зрения, свидетельствует о том, что необходим скрининг всех возможных комбинаций АМП с целью выбора наиболее эффективных [43].

Антибиотикорезистентность *Mycobacterium fortuitum* group представлены в табл. 2 [9, 10, 12, 24, 33].

Заключение. Кислотоустойчивые представители порядка *Actinomycetales* всё чаще становятся объектами научного и практического интереса среди специалистов различных специальностей. Увеличение количества пациентов из групп риска неизбежно влечёт значительное расширение этиологически значимой микрофлоры, ко-

Таблица 2

Особенности антибиотикорезистентности представителей *Mycobacterium fortuitum* group

Препараты	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. boenickei</i>	<i>M. brisbanense</i>	<i>M. neworleansense</i>	<i>M. houstonense</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. conceptionense</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. septicum</i>	<i>M. alvei</i>	<i>M. senegalense</i>
Азитромицин	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
Амикацин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S
Амоксициллин	S	S	S	S	S	-	R	-	S	-	-
Ампициллин	S	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-
Ванкомицин	-	R	R	S	S	-	R	-	S	-	-
Гатифлоксацин	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-
Гентамицин	-	S	S	-	-	-	-	-	S	-	-
Доксициклин	S	R	R	S	S	R	S	-	S	-	S
Изониазид	R	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-
Имипенем	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S
Интермедиаг	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-
Канамицин	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	-
Кларитромицин	S	-	-	-	-	S	S	R	-	-	S
Левифлоксацин	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-
Линезолид	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-
Меропенем	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Миноциклин	-	R	R	S	S	-	S	R	S	-	-
Моксифлоксацин	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Неомицин	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-
Офлоксацин	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
Пенициллин	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
Пиразинамид	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Рифампицин	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-
Спарфлоксацин	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-
Стрептомицин	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-
Сульфаметоксазол	-	S	S	S	S	S	-	-	S	-	S
Сульфонамиды	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Тетрациклин	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Тобрамицин	R	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-
Триметоприм	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-	S
Цефокситин	R	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-
Цефотаксим	-	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-
Цефтриаксон	-	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-
Ципрофлоксацин	S	S	S	S	S	S	S	-	S	-	S
Эритромицин	-	R	R	R	R	-	S	-	S	-	-
Этамбутол	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: S-чувствителен, R – устойчив.

торая требует от врачей-бактериологов и клиницистов разработки и внедрения в практику новых подходов к культивированию и идентификации «новых» микроорганизмов [45, 46]. Разработка методов культивирования и идентификации представителей вида *M. fortuitum* group позволит получить необходимые данные о распространённости этих групп микроорганизмов среди пациентов из групп риска, оптимизировать схемы терапии инфекционных процессов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-44 см. REFERENCES)

1. Зими́на В.Н., Дегтярева С.Ю., Белобородова Е.Н., Кулабухова Е.И., Русакова Л.И., Фасенко О.В. Микобактериозы: современное состояние проблемы. *Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия*. 2017; 19(4): 276-82.
45. Воробьев А.А., ред. Микробиология и иммунология. 2-е изд. М.: Медицина; 2005.
46. Зверев В.В., Бойченко М.Н., ред. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.

REFERENCES

1. Zimina V.N., Degtyareva S.Yu., Beloborodova E.N., Kulabukhova E.I., Rusakova L.I., Fasenko O.V. Mycobacteriosis: current state of the problem. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19 (4): 276-82. (in Russian)
2. Choueiry M.A., Scurto P.L., Flynn P.M., Rao B.N., Hughes W.T. Disseminated infection due to *Mycobacterium fortuitum* in a patient with desmoid tumor. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26(1): 237-8. doi: 10.1086/517076.
3. Adékambi T., Stein A., Carvajal J., Raoult D., Drancourt M. Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(4): 1268-73. doi:10.1128/JCM.44.4.1268-1273.2006.
4. Ausina V., Luquin M., García Barceló M., Lanéelle M.A., Lévy-Frébault V., Belda F. et al. *Mycobacterium alvei* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992 Oct;42(4): 529-35. doi: 10.1099/00207713-42-4-529.
5. Gupta R.S., Lo B., Son J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. *Front. Microbiol.* 2018; 13(9): 67. doi: 10.3389/fmicb.2018.00067.
6. Hamid M. E. Current Perspectives on *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense*, the causal agents of bovine farcy. *Vet. Med. Int.* 2014; 2014: 247906. doi: 10.1155/2014/247906.
7. Kusunoki S., Ezaki T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. abscessus to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992; 42:240-5. doi:10.1099/00207713-42-2-240.
8. Lamy B., Marchandin H., Hamitouché K., Laurent F. *Mycobacterium setense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum*-group organism isolated from a patient with soft tissue infection and osteitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008; 58(2): 486-90. doi: 10.1099/ijs.0.65222-0.
9. Schinsky M. F., McNeil M. M., Whitney A. M., Steigerwalt A. G., Lasker B. A., Floyd M. M. et al. *Mycobacterium septicum* sp. nov., a new rapidly growing species associated with catheter-related bacteraemia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000; 50(2): 575-81. doi: 10.1099/00207713-50-2-575.
10. Wallace R. J. Jr, Brown-Elliott B. A., Wilson R. W., Mann L., Hall L., Zhang Y. et al. Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12): 5689-97. doi: 10.1128/JCM.42.12.5689-5697.2004.
11. Wallace R.Jr., Brown-Elliott B.A., Brown J., Steigerwalt A.G., Hall L., Woods G. et al. Polyphasic characterization reveals that the human pathogen *Mycobacterium peregrinum* type II belongs to the bovine pathogen species *Mycobacterium senegalense*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(12): 5925-35. doi:10.1128/JCM.43.12.5925-5935.2005.
12. Schinsky M. F., Morey R. E., Steigerwalt A. G., Douglas M. P., Wilson R. W., Floyd M. M. et al. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004; 54(5): 1653-67. doi: 10.1099/ijs.0.02743-0.
13. Pinheiro M., Ramos A., Carvalho T., Costa S. *Mycobacterium fortuitum* spontaneous breast abscess: is there a laterality effect? *J. Med. Microbiol.* 2016; 3(2): 1-3.

14. Falkinham J. O. III Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.* 2009; 107(2): 356-67. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04161.x.
15. Yang H. J., Yim H. W., Lee M. Y., Ko K. S., Yoon H. J. *Mycobacterium conceptionense* infection complicating face rejuvenation with fat grafting. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60(3): 371-4. doi: 10.1099/jmm.0.024554-0.
16. Cooke F. J., Friedland J. S. Spontaneous breast abscess due to *Mycobacterium fortuitum*. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26: 760-1. doi: 10.1086/517117.
17. Fabbian F., De Giorgi A., Pala M., Fratti D., Contini, C. Pleural effusion in an immunocompetent woman caused by *Mycobacterium fortuitum*. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60(9): 1375-8.
18. Gebo K. A., Srinivasan A., Perl T. M., Ross T., Groth A., Merz W. G. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* on a human immunodeficiency virus ward: transient respiratory tract colonization from a contaminated ice machine. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35(1): 32-8. doi: 10.1086/340741.
19. Lee C. H., You H. L., Wang J. W., Tang Y. F., Liu J. W. Prosthetic joint infection caused by *Mycobacterium alvei* in an elderly patient. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(8): 3096-8. doi:10.1128/JCM.00603-11
20. Lian L., Deng J., Zhao X., Dong H., Zhang J, Li G. et al. The first case of pulmonary disease caused by *Mycobacterium septicum* in China. *Int. J. Infect. Dis.* 2013; 17(5): e352-4. doi: 10.1016/j.ijid.2012.12.011.
21. Park S., Suh G. Y., Chung M. P., Kim H., Kwon O. J., Lee K. S. et al. Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* isolated from respiratory specimens. *Respir. Med.* 2008; 102(3): 437-42. doi: 10.1016/j.rmed.2007.10.005.
22. Plemmons, R. M., McAllister, C. K., Liening, D. A., Garces, M. C. Otitis media and mastoiditis due to *Mycobacterium fortuitum*: case report, review of four cases, and a cautionary note. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 22(6): 1105-6.
23. Schlarb D., Idelevich E. A., Krause-Bergmann A., Stollwerck P. Successful interdisciplinary radical treatment of *Mycobacterium fortuitum* infection in a lipotourist from Germany after abdominoplasty in Turkey. *New. Microbes. New. Infect.* 2015; 10(8): 21-3. doi: 10.1016/j.nmni.2015.09.003.
24. Serra C., Loi G., Saddi B., Pautasso M., Manzin A. Unusual clinical presentation of *Mycobacterium fortuitum* infection in an immunocompetent woman. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(5): 1663-5. doi:10.1128/JCM.00119-07.
25. Smith M. B., Boyars M. C., Woods G. L. Fatal *Mycobacterium fortuitum* meningitis in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1996; 23(6): 1327-8. doi: 10.1093/clinids/23.6.1327.
26. Vail G., Kohler R., Steiner F., Donepudi R. Successful treatment of *Mycobacterium fortuitum* prosthetic valve endocarditis: case report. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30(3): 629-30. doi: 10.1086/313720.
27. Winthrop K. L., Albridge K., South D., Albrecht P., Abrams M., Samuel M. C. et al. The clinical management and outcome of nail salon-acquired *Mycobacterium fortuitum* skin infection. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38 (1): 38-44. doi: 10.1086/380459.
28. Yu-Bun, Y., Pang-Hei, L., Qunn-Jid, L., Yiu-Chung, W., Yuk-Leung, W. Treatment of *Mycobacterium fortuitum* Infection of Total Knee Arthroplasty: A Case Report. *J. of Orthopaedics, Trauma and Rehabilitation.* 2012; 16(2): 82-5.
29. Lee K.H., Heo S.T., Choi S.W., Park D.H., Kim Y.R., Yoo S.J. Three cases of postoperative septic arthritis caused by *Mycobacterium conceptionense* in the shoulder joints of immunocompetent patients. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(3): 1013-5. doi:10.1128/JCM.02652-13.
30. Sakai T., Kobayashi C., Shinohara M. *Mycobacterium peregrinum* infection in a patient with AIDS. *Int. Med.* 2005; 44(3): 266-9. doi: 10.2169/internalmedicine.44.266.
31. Aghajani J., Rajaei E., Farnia P., Malekshahian D., Seif S. *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense* as new environmental threats. *Biomed. and Biotechn.* 2018; 2(3): 184-90.
32. Brown-Elliott B. A., Wallace R. J. Jr, Tichindelean C., Sarria J. C., McNulty S., Vasireddy R. et al. Five-year outbreak of community- and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(12): 4231-8. doi: 10.1128/JCM.05122-11.
33. Nagao M., Sonobe M., Bando T., Saito T., Shirano M., Matsushima A. et al. Surgical site infection due to *Mycobacterium peregrinum*: a case report and literature review. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(2): 209-11. doi: 10.1016/j.ijid.2008.06.018.
34. Helguera-Repetto A. C., Chacon-Salinas R., Cerna-Cortes J. F., Rivera-Gutierrez S., Ortiz-Navarrete V., Estrada-Garcia I. et al. Differential macrophage response to slow- and fast-growing pathogenic mycobacteria. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 916521. doi: 10.1155/2014/916521.
35. Richmond J. M., Lee J., Green D. S., Kornfeld H., Cruikshank W. W. Mannose-capped lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* preferentially inhibits sphingosine-1-phosphate-induced migration of Th1 cells. *J. Immunol.* 2012; 189(12): 5886-95. doi:10.4049/jimmunol.1103092
36. Torrelles J. B., Schlesinger L. S. Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannose-capped cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2010; 90(2): 84-93. doi: 10.1016/j.tube.2010.02.003
37. Oberley-Deegan R.E., Rebits B.W., Weaver M.R., Tollefson A.K., Bai X., McGibney M. et al. An oxidative environment promotes growth of *Mycobacterium abscessus*. *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 1; 49(11): 1666-73. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.026.
38. De Groote M.A., Huit G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 42: 1756-63. doi:10.1086/504381.
39. Williams M.M., Yakrus M.A., Arduino M.J., Cooksey R.C., Crane C.B., Banerjee S.N. et al. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(7):2091-8. doi: 10.1128/AEM.00166-09.
40. Casadevall A., Pirofski L. A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J. Water. Health.* 2009; 7(1): 2-18. doi: 10.2166/wh.2009.036.
41. Sousa S., Borges V., Joao I., Gomes J. P., Jordao L. Nontuberculous mycobacteria persistence in a cell model mimicking alveolar macrophages. *Microorganisms.* 2019; 7(5): 113. doi: 10.3390/microorganisms7050113.
42. Zhai W., Wu F., Zhang Y., Fu Y., Liu Z. The Immune Escape Mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(2): 340. doi:10.3390/ijms20020340.
43. Joseph O. Challenges of NTM Drug Development. *Front. Microbiol.* 2018; 18(9): 1-7.
44. Kim S.Y., Kim M.S., Chang H.E., Yim J.J., Lee J.H., Song S.H. et al. Pulmonary infection caused by *Mycobacterium conceptionense*. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(1): 174-6. doi: 10.3201/eid1801.110251.
45. Vorob'yov A.A., ed. Microbiology and immunology: a textbook. [Mikrobiologiya i immunologiya: uchebnik]. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
46. Zverev V.V., Boychenko M.N. Medical microbiology, virology and immunology. [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Бондаренко Е.И.¹, Филимонова Е.С.^{2,3}, Краснова Е.И.^{2,3}, Криницина Э.В.¹, Ткачев С.Е.^{4,5}

СЛУЧАИ ЗАБОЛЕВАНИЯ КУ-ЛИХОРАДКОЙ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ЖИТЕЛЕЙ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ, ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ С ПОДОЗРЕНИЕМ НА ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАВАЕМЫЕ КЛЕЩАМИ

¹АО «Вектор-Бест», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская обл., Россия;

²Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 630091, Новосибирск, Россия

³Городская инфекционная клиническая больница №1, 630099, г.Новосибирск, Россия;

⁴Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск, Россия;

⁵Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, 420012, индекс, г. Казань, Россия

Coxiella burnetii является возбудителем Ку-лихорадки (коксиеллёза), которая помимо острых проявлений часто протекает в латентной форме, склонна к хроническому течению и при отсутствии антибиотикотерапии имеет высокий риск инвалидизации или смертельного исхода. В результате наличия широкого спектра клинических проявлений, характерных для других инфекционных заболеваний, для постановки диагноза требуется применение лабораторных методов исследования (ЛМИ). Наличие антропоургических очагов Ку-лихорадки в Новосибирской области установлено еще в 90-х годах прошлого столетия, но должного внимания к ее лабораторной диагностике в этом регионе не уделяется. Целью исследования явилось выявление генетических и серологических маркеров возбудителя *C. burnetii* у больных в Новосибирской области, поступивших на лечение в лихорадочном состоянии с подозрением на заболевания, вызванные инфекциями, передаваемые клещами (ИПК). В результате исследования методом ПЦР-РВ у 9 из 325 больных в образцах крови выявлен ДНК-маркер возбудителя Ку-лихорадки. У трех больных наличие ДНК *C. burnetii* было подтверждено с помощью секвенирования фрагментов генов *IS1111* и *htpB*. С помощью ИФА-тестов в образцах сыворотки крови четырех больных с положительными результатами ПЦР обнаружены антитела к возбудителю коксиеллёза. Контакт с клещом отмечен у 7 из 9 пациентов, у которых выявлена ДНК *C. burnetii* и отсутствовали маркеры других ИПК. Шесть человек были заражены на территории Новосибирской области, двое пострадали от присасывания клеща на Алтае, один случай – из Республики Киргизия. Таким образом, комплексный подход с применением как ПЦР-анализа, так и ИФА обеспечил выявление маркеров возбудителя Ку-лихорадки у больных, поступивших с подозрением на заболевание ИПК, тем самым дифференцируя ее от других инфекций. Контакт с клещом у большинства заболевших дает основание предполагать, что инфицирование возбудителем *C. burnetii* произошло трансмиссивным путем.

Ключевые слова: Ку-лихорадка; коксиеллёз; *Coxiella burnetii*; ПЦР-РВ; Новосибирская область.

Для цитирования: Бондаренко Е.И., Филимонова Е.С., Краснова Е.И., Криницина Э.В., Ткачев С.Е. Случаи заболевания Ку-лихорадкой, выявленные у жителей Новосибирской области, госпитализированных с подозрением на инфекции, передаваемые клещами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 229-236.
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-229-236>

Bondarenko E.I.¹, Filimonova E.S.^{2,3}, Krasnova E.I.^{2,3}, Krinitsina E.V.¹, Tkachev S.E.^{4,5}

CASES OF Q FEVER DETECTED IN RESIDENTS OF THE NOVOSIBIRSK REGION HOSPITALIZED WITH SUSPECTION OF INFECTIONS TRANSMITTED BY TICKS

¹АО «Vector-Best», « 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

²Novosibirsk State Medical University of MH of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia;

³City Infectious Clinical Hospital No.1, Novosibirsk, Russia;

⁴Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia;

⁵Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan Federal University, Kazan, Russia

Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever (coxiellosis), which, in addition to acute manifestations, often occurs in a latent form, is prone to chronic course and, in the absence of antibiotic therapy, has a high risk of disability or death. As a result of the presence of a wide range of clinical manifestations specific to other infectious diseases, the use of laboratory test methods (LTM) is required to make a diagnosis. The presence of Q fever anthropurgic foci in the Novosibirsk region was described in the 90s of the last century, but due attention to its laboratory diagnostics is not paid in this region. The aim of the study was to identify genetic and serological markers of the causative agent, *C. burnetii*, in patients of the Novosibirsk region who were admitted for treatment with fever with suspected tick-borne infections (TBIs). DNA marker of the causative agent of Q fever was detected in blood samples by real time PCR in 9 out of 325 patients. In three patients, the presence of *C. burnetii* DNA was confirmed by sequencing of the *IS1111* and *htpB* gene fragments. In ELISA tests, antibodies against the causative agent of coxiellosis were detected in the blood sera of 4 patients with positive results of PCR analysis. Contact with tick was registered in 7 out of 9 patients who had *C. burnetii* DNA and lacked markers of other TBIs. Six people were infected in the Novosibirsk region, two suffered from tick's bite in Altai, and one case was from the Republic of Kyrgyzstan. Thus, a complex approach using both PCR analysis and ELISA provided the identification of markers of the Q fever causative agent in patients admitted with suspected TBIs, thereby differentiating it from other infections. Contact with ticks in most cases suggests that infection with *C. burnetii* had a transmissible pathway.

Key words: Q-fever; coxiellosis; *Coxiella burnetii*; PCR; Novosibirsk region.

For citation: Bondarenko E.I., Filimonova E.S., Krasnova E.I., Krinitsina E.V., Tkachev S.E. Cases of Q fever detected in residents of the novosibirsk region hospitalized with suspicion of infections transmitted by ticks. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 229-236 (in Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-229-236>

Information about authors:

Bondarenko E.I.: ORCID: <https://0000-0002-4699-9548>;
Filimonova E.S.: ORCID: <https://0000-0002-7711-2188>;
Krasnova E.I.: ORCID: <https://0000-0003-2625-5442>;
Krinitsina E.V. ORCID: <https://0000-0003-3979-6619>;
Tkachev S.E.: ORCID: <https://0000-0001-7767-380X>.

For correspondence: Bondarenko E.I., Ph.d., researcher of PCR laboratory, AO «Vector-Best»; e-mail: ebondarenko@ngs.ru

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.11.2020
Accepted 28.12.2020

Ку-лихорадка (Ку-риккетсиоз, Балканский грипп, коксиделлез, лихорадка Ку и др.) является зоонозной инфекцией, впервые описанной в 1935 г. в Австралии Е.Н.Деррик [1], который выделил это заболевание в самостоятельную нозологическую форму. Два года спустя, Ф.М.Бернет [2] и С.В.Филип [3] доказали риккетсиозную природу изолированного возбудителя заболевания, впоследствии получившего название *Coxiella burnetii*. Исходя из современной классификации микроорганизмов, которая основывается на сопоставлении нуклеотидных последовательности генов, полученных в результате их секвенирования, возбудитель Ку-лихорадки отнесен к роду *Coxiella*, семейству *Coxiellaceae*, порядку *Legionellales*, классу *Gammaproteobacteria* [4]. Таким образом, единственный представитель рода *Coxiella*, вид *C. burnetii* выделен из семейства *Rickettsiaceae*. Являясь внутриклеточным облигатным паразитом, *C. burnetii* в организме теплокровных в качестве клеток-мишеней использует мононуклеарные фагоциты. С эпидемической точки зрения выделяют первичные и вторичные очаги Ку-лихорадки. Первичные – природные очаги, образованные вследствие вовлечения в циркуляцию коксиделл около 100 видов диких млекопитающих, десятков видов птиц и более 70 видов клещей. Последние являются природным резервуаром инфекции, а также выступают в качестве вектора, передавая возбудитель во время присасывания от одних видов животных другим, тем самым обеспечивая его циркуляцию в природных очагах [5]. Вторичные очаги лихорадки Ку – антропоургические, или как их называют сельскохозяйственные, связаны с поражением сельскохозяйственных животных, в первую очередь, крупного и мелкого скота (коровы, лошади, верблюды, овцы, козы), комнатных питомцев (собак и кошек), домашней птицы [6, 7]. Заболевание коксиделлезом у животных часто протекает как скрытая, латентная инфекция, которая обостряется в периоды беременности и во время родов [8]. Именно сельскохозяйственные и домашние животные являются доминирующим источником инфицирования человека. В связи с этим, основными путями заражения Ку-лихорадкой являются аэрогенный (в результате вдыхания диспергированных частиц, которые образуются в результате высыхания испражнений животных, содержащих возбудитель), контактный (при уходе за животными, обработке мяса, шерсти и пуха), а также алиментарный (вследствие употребления в пищу сырых, термически не обработанных молочных продуктов). Именно контактный и аэрогенный пути заражения в 2008-2016 гг. привели к массовым эпидемиям Ку-лихорадки среди жи-

телей европейских стран, возникших как следствие эпизоотии мелкого рогатого скота на животноводческих фермах, где до 70% поголовья было заражено коксиделлезом. В результате десятки тысяч жителей развитых стран, таких как Нидерланды, Германия, Франция, Испания, Англия, Португалия и др., были инфицированы, отмечены смертельные случаи, нанесен серьезный экономический ущерб [9]. Исследования, проведенные в африканских странах, свидетельствуют о наличии стойких антропоургических очагов коксиделлеза, где процент скота, содержащего в крови антитела к возбудителю Ку-лихорадки, варьирует от 4 до 80% [8, 10]. В Чаде и Египте 70-80% поголовья верблюдов являются серопозитивными к возбудителю коксиделлеза. Данные ПЦР-анализа показали наличие ДНК возбудителя Ку-лихорадки в 22% образцах молока, полученных от коров в Египте, и в 63% образцов молока в Нигерии. В сельских регионах жилищные постройки размещаются, как правило, в непосредственной близости к местам содержания скота, что способствует передаче инфекции от животных к людям. Так, в Алжире у 15-24% жителей сельскохозяйственных районов выявлены антитела к возбудителю коксиделлеза, а в Намибии – у 26% обследованных доноров. В Сенегале более чем у 1% больных с лихорадкой в крови выявлена ДНК *C. burnetii* [8]. Эти данные свидетельствуют о возможности завозных случаев коксиделлеза в РФ и подводят к необходимости обследования ее граждан, посещающих Африканские страны.

В первичных очагах вероятен и трансмиссивный путь заражения коксиделлезом, как для человека, так и домашних животных в результате контакта с такими видами клещей, как *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. silvarum*, *H. punctata*, *Rh. sanguineus*, *H. concinna*, *H. japonica* и др., которые встречаются на территории РФ, и для которых доказана причастность к циркуляции *C. burnetii* и других возбудителей инфекций [8, 11 – 13]. Для лихорадки Ку не характерна типичная форма заболевания, отсутствуют патогномоничные признаки, при этом ей присущ широкий спектр клинических проявлений, характерных для многих инфекционных заболеваний различной этиологии. В 60% случаев болезнь протекает бессимптомно, больные переносят ее на ногах, не обращаясь за медицинской помощью. По-видимому, данный факт и является причиной гиподиагностики этой инфекции. При острой манифестной форме Ку-лихорадка протекает в виде гриппоподобного состояния, лихорадки, атипичной пневмонии, бронхита, трахеита, менингоэнцефалита, гепатита, могут наблю-

даться поражения сердца. Смертность составляет около 1%. При отсутствии медикаментозного лечения переход в хроническую форму отмечается у 5-10% заболевших, возможным проявлением которой может быть эндокардит и васкулит [7, 8, 14]. В случае наличия у больного до инфицирования кокциеллезом сердечно-сосудистой патологии и иммунодефицитного состояния, развитие эндокардита может развиваться без острой фазы заболевания. Отсутствие должного лечения, требующего длительного применения антибиотикотерапии, сроком от нескольких месяцев до года и более, при эндокардите и васкулите, имеющих кокциеллезную этиологию, приводит к повышению смертности с 5 до 25-60%. Особую опасность Ку-лихорадка представляет для беременных, у которых осложнения (спонтанные аборт, смерть и задержка роста плода, преждевременные роды) составляют более 80% [15].

В Российской Федерации официальные показатели заболеваемости Ку-лихорадкой не высоки и в период 1957-2014 гг. варьировали в пределах от 0,01 до 1,0 на 100 тыс. населения. Так, среднее число заболевших с 2007 по 2015 гг. составило 102 человека в год, пик заболевших отмечен в 2009 г. с максимальным количеством 205 случаев [14, 16]. При этом, несмотря на официальную регистрацию лишь sporadических случаев заболевания, контакт населения с возбудителем в нашей стране, по-видимому, является высоким. Так, в крови 1,5-4,3% доноров из разных регионов страны выявлены антитела к возбудителю Ку-лихорадки, причем среди различных слоев населения этот показатель варьирует в пределах от 2 до 40% [16]. Серологические маркеры кокциеллеза активно выявляются у собак, поступающих в ветеринарные лечебницы (2,6% обследованных), а у сельскохозяйственных животных (2-29%), что сопоставимо с уровнем заражения скота в странах Африки [13]. Опубликованные данные дают основание предполагать о наличии стойких очагов в регионах России и о гиподиагностике Ку-лихорадки. Циркуляция кокциелл зафиксирована в 50 субъектах РФ, в том числе в Западной Сибири (в Омской и Новосибирской областях, Республике Алтай), Восточной Сибири (Республика Бурятия) и на Дальнем Востоке (Приморский край) [12, 17, 18, 19]. В период с 1957 г. до начала 2000-х годов sporadических случаев заболевания Ку-лихорадкой регистрировались у пациентов Новосибирской области [16, 20]. Далее, на протяжении 18 лет диагностика Ку-лихорадки не проводилась в связи с отсутствием диагностикумов для подтверждения данной нозологической формы.

Целью исследования явилось выявление генетических и серологических маркеров возбудителя *C. burnetii* у больных в Новосибирской области, поступивших на лечение в лихорадящем состоянии с подозрением на заболевание, вызванные инфекциями, передаваемые клещами.

Материал и методы. Обследованы 325 пациентов, поступивших в весенне-летний период 2018 г. на лечение в ГИКБ №1 г. Новосибирска с подозрением на заболевание инфекциями, передаваемыми клещами (ИПК). Критерием отбора для обследования пациентов явилось обязательное наличие лихорадящего состояния у больных, факт присасывания, наполнение клеща или посещение лесопарковой зоны. Для проведения анализа с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) образцы крови у пациентов забирали в период лихорадки натощак в пробирки S-Monovette, содержащие ЭДТА (SARSTEDT, Германия). Образцы цельной крови (ЦКР) каждого больного были использованы для ПЦР-анализа

непосредственно, а также для получения образцов лейкоцитарной фракции крови (ЛФК) по следующей схеме. Вакуумную пробирку с кровью центрифугировали 10 мин при 800 g. Отобранный верхний слой плазмы отбирали в отдельные пробирки вместе с лейкоцитарным кольцом, находящимся на границе двух фаз (плазма/эритроциты), и центрифугировали повторно 10 минут при 11000 g. Далее верхнюю часть плазмы удаляли, оставляя осадок и 200 мкл надосадочной жидкости, содержащей ЛФК. Полученный осадок ресуспендировали и использовали для выделения суммарной фракции нуклеиновых кислот (НК) с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя. Параллельно от каждого обследуемого больного образцы НК выделяли тем же методом из 250 мкл ЦКР, предварительно обработанной раствором для гемолиза из набора «РеалБест Гемолитик» («Вектор-Бест», Новосибирск). Элюция выделяемых образцов НК проводилась в объеме 350 мкл. Для постановки ПЦР-РВ в реакции использовали по 10 мкл выделенного образца НК. Комплексное исследование с помощью ПЦР-РВ по выявлению генетических маркеров возбудителей ИПК проводили с применением коммерческих тестов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l./PHK ВКЭ», «РеалБест ДНК *Borrelia miyamotoi*», «РеалБест ДНК *Rickettsia species*», «РеалБест ДНК *Anaplasma phagocytophilum/Ehrlichia muris, Ehrlichia chaffeensis*», «РеалБест ДНК *Babesia species*» («Вектор-Бест», Новосибирск). Дополнительное исследование выделенных проб НК проводили с помощью экспериментальной лабораторной версии тест-системы «Сохбург-1», разработанной в АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), представляющей набор реагентов для обнаружения ДНК-мишени *Coxiella burnetii* (фрагмент гена транспозазы *IS1111*) методом ПЦР с гибридационной-флуоресцентной регистрацией данных. В состав диагностического набора реагентов «Сохбург-1» входят пробирки, содержащие лиофильно высушенные ПЦР-смеси, в которых обеспечивалась амплификация и детекция участка гена *C. burnetii* длиной 70 п.н. с помощью специфических праймеров Cbur-IS-F5, Cbur-IS-R2 и зонда Cbur-IS-Z2, конечная концентрация которых в реакции составила 0,5 мкМ и 0,25 мкМ соответственно. Последовательности используемых олигонуклеотидов и протокол амплификации ДНК-маркера описаны ранее [12]. Все постановки реакции сопровождалась отрицательными и положительными контролями. Дополнительную амплификацию с положительных образцов, содержащих ДНК *C. burnetii*, по фрагментам генов *IS1111* и гена белка теплового шока В (heat shock protein В, *hspB*) с последующим секвенированием проводили с использованием праймеров, представленных в табл. 1.

Методология дизайна и анализа синтезированных праймеров и зондов, применяемых в данной работе, опубликованы ранее [21]. Олигонуклеотиды получены в лаборатории химического синтеза АО «Вектор-Бест». Для амплификации ДНК кокциеллы с целью дальнейшего секвенирования использовали 45 мкл выделенной из образца суммарной НК при концентрации праймеров 0,5 мкМ. Используемая программа амплификации: 1 стадия: 94°C – 1 мин; 2 стадия, 5 циклов: 94°C – 15 с, 62°C – 20 с, 72°C – 20 с; 3 стадия 45 циклов: 94°C – 15 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 секунд. Постановка ПЦР-РВ осуществлялась на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Для проведения электрофоретического анализа

Олигонуклеотидные праймеры, применяемые для амплификации и секвенирования участков генов *Coxiella burnetii*

Ген	Название праймеров	Структура праймера (5'→3')	Длина ампликона (п.н.)
IS1111	PKO-Cbur-F4	GTTGGTCCCTCGACAACA	390
	PKO-Cbur-R2	ACCGTATGAATCAGCTTAATCA	
<i>hspB</i>	P-CB-gro-F3	ATCATAGTCCGACGAGCTA	770
	P-CB-gro-R4	TCAAAGCCGTTATTGCTGGA	

полученных ампликонов применяли 1,5 % агарозный гель. Секвенирование *продуктов ПЦР, очищенных с помощью колонок GFX (Amersham Biosciences, США),* проводили по методу Сэнгера на секвенаторе ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Сборка последовательностей ПЦР-фрагментов выполнена с помощью программы MEGA 6.0 [22]. Исследование уровней сходства проводили с помощью программного обеспечения BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Выравнивание последовательностей методом ClustalW и построение дендрограмм методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) выполняли с использованием программного обеспечения MEGA 6.0 [22]. Достоверность дендрограмм оценивали с помощью бутстреп-анализа с 1000 репликациями. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК *C. burnetii* депонированы в международной базе данных NCBI под следующими номерами: гена транспозазы IS1111 – MK064571 (Novosibirsk-2018/161), MK064572 (Novosibirsk-2018/180), MK064573 (Novosibirsk-2018/286); гена *hspB* – MK335931 (Novosibirsk-2018/161), MK335932 (Novosibirsk-2018/180), MK335933 (Novosibirsk-2018/286).

Для проведения серологических исследований забор крови производили в пробирки S-Monovette Z-Gel (SARSTEDT, Германия), которые центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин и далее отделяли полученные образцы сыворотки. Проверку на наличие антител класса М к ВКЭ, а также IgM и IgG к возбудителям ИКБ осуществляли с помощью ИФА-тестов производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Наличие специфических антител класса G к *C. burnetii* в образцах сыворотки крови больных проводили с использованием двух тестов: «Coxiella burnetii ELISA IgG» («Viracell», Spain) и «Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса IgG к антигенам коксиелл Бернета» (ИФА-анти-Ку-Г) (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург). Проведенное исследование одобрено этическим комитетом больницы, и все вовлеченные в него пациенты дали письменное согласие.

Результаты и обсуждение. В мае – июле 2018 г. в ГИКБ № 1 г. Новосибирска с подозрением на заболевание ИПК поступило 325 больных в лихорадящем состоянии. Согласно данным эпиданамнеза, развитие лихорадки у заболевших было сопряжено с присасыванием или наползанием клеща, либо развилось после посещения лесопарковой зоны. Применение комплексного подхода с использованием коммерческих ПЦР-тестов по выявлению генетических маркеров целого спектра возбудителей ИПК, циркулирующих в Западной Сибири (Новосибирской области), обеспечило выявление в образцах ЛФК

и ЦКР у обследованных больных РНК ВКЭ, ДНК боррелий, возбудителей ИКБ, ДНК *Borrelia miyamotoi*, возбудителя клещевой возвратной лихорадки (КВЛ), а так же ДНК *Rickettsia sibirica*, возбудителя сибирского клещевого тифа. Циркуляция перечисленных возбудителей ИПК в Новосибирской области отмечена ранее [23 – 26]. Дополнительно, выделенные образцы ДНК параллельно анализированы на наличие генетического маркера *C. burnetii*, возбудителя Ку-лихорадки с помощью экспериментальной лабораторной версии ПЦР-теста в режиме реального времени «Coxbur-1». В качестве ДНК-мишени в этом диагностическом тесте выбран участок генома IS1111 коксиеллы длиной 70 п.н., детектируемый с помощью комбинации олигонуклеотидов Cbur-IS-F5, Cbur-IS-R2 и Cbur-IS-Z2, которая успешно апробирована ранее [12]. Фрагмент этого генома выбран на основании анализа базы данных NCBI, который свидетельствовал о наличии консервативной нуклеотидной последовательности IS1111 в геномах известных на сегодняшний день штаммов и изолятов возбудителя Ку-лихорадки и отсутствия таковой в депонированных последовательностях других микроорганизмов. Ранее с помощью разработанного экспериментального лабораторного ПЦР-теста были получены положительные результаты при анализе клещей, ветеринарных образцов и клинического материала, полученного от больных, инфицированных возбудителем Ку-лихорадки, у которых наличие ДНК *C. burnetii* подтверждено данными секвенирования [12, 18, 19].

Таким образом, данные, полученные в результате использования ПЦР-теста «Coxbur-1», показали наличие у 9 из 325 (2,8%) обследованных лихорадящих больных в Новосибирской области ДНК-маркера *C. burnetii* в пробах суммарных НК, выделенных из клинических образцов. ДНК возбудителя коксиеллы выявлена как в образцах ЦКР, так и в образцах ЛФК у 4 из 9 положительных: №8, 161, 180 и 286 (табл. 2), причем у 3 из них отмечалась ощутимая нагрузка ДНК-маркера *C. burnetii* (Ct от 28 до 34 цикла в ПЦР-РВ). Полученные результаты ПЦР-анализа воспроизведены в повторах. В качестве положительного контроля (ПКО) использованы ампликоны, ранее разработанные по участку гена IS1111 с помощью праймеров, представленных в табл. 1, с использованием ДНК *C. burnetii*, выделенной из клещей [18]. Генетический маркер возбудителя дополнительно детектирован и в анализированных образцах сыворотки крови от больных № 161 и 286. Однако, у пяти пациентов (№ 3, 24, 40, 75 и 102) ДНК коксиеллы удалось выявить только в одном из двух видов анализируемого клинического материала, либо в образцах ЦКР, либо в образцах ЛФК с высокими значениями Ct (Ct=35–37), что свидетельствовало о низкой нагрузке возбудителя и затрудняло воспроизведение полученных положительных результатов в повторных постановках ПЦР-РВ. Тем не менее, кривые разгорания специфического зонда, подобранного к ДНК-мишени *C. burnetii* (участка гена IS1111), во всех реакциях исследуемых образцов были однотипны, имели сигмообразный (S-образный) профиль, уровень разгорания сопоставим с ПКО (рис. 1).

Присасывание (наползание) клеща отмечено в анамнезе 7 из 9 пациентов, у которых выявлен маркер возбудителя Ку-лихорадки. Шесть человек были заражены на территории г. Новосибирска или Новосибирской области, двое пострадали от присасывания клеща во время отдыха на Алтае, один – во время поездки в г. Бишкек (Республика Киргизия). Один из жителей Новосибир-

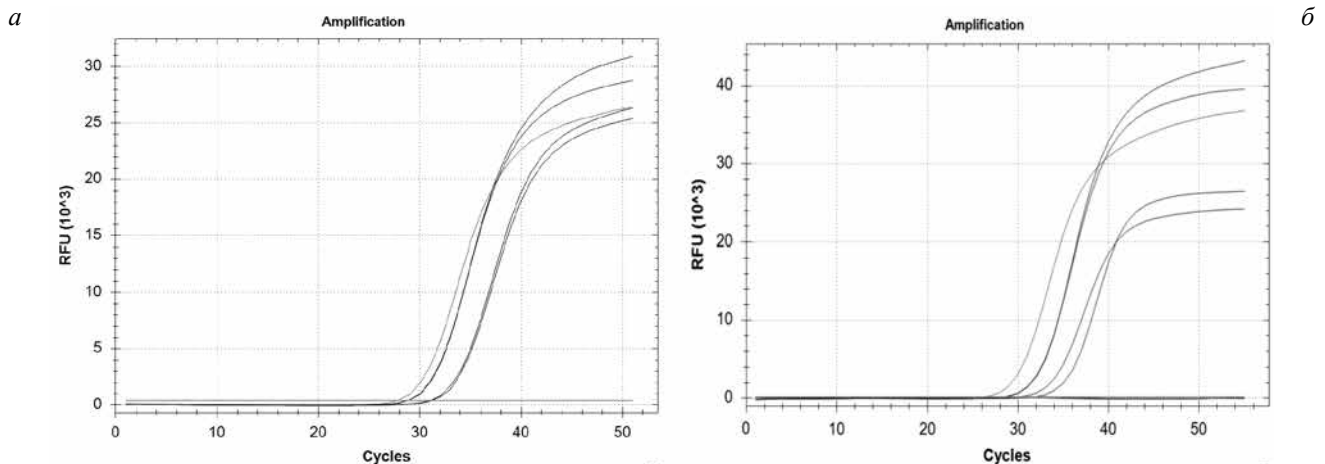


Рис. 1. Детекция в ПЦР-РВ ДНК-маркера *C. burnetii*, участка гена *IS1111*, в образцах суммарной НК, выделенной из ЦКР (а) и ЛФК (б) больных №161 и 180 (в двух повторах) со значениями $St=28-32$, для ПКО значения $St=27$.

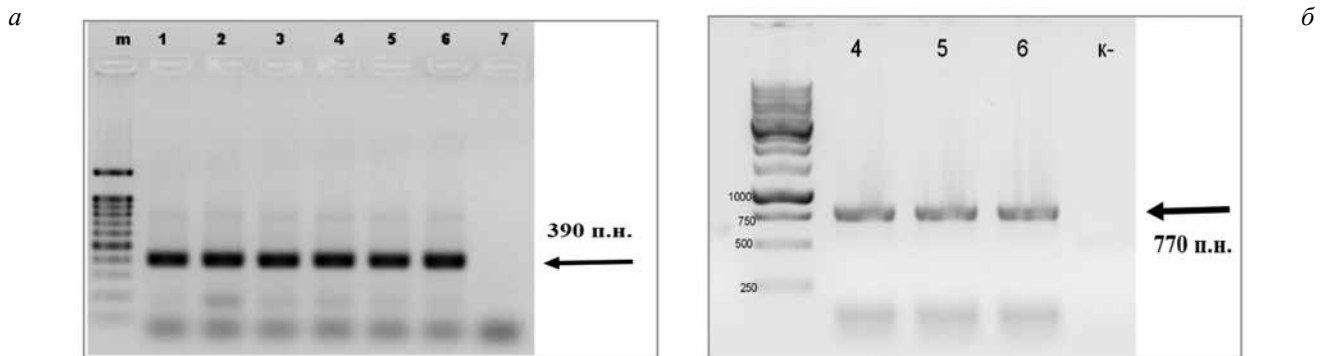


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК *C. burnetii*, выделенной из образцов крови лихорадящих больных №161, 180 и 286. а – амплификация по участку гена *IS1111* длиной 390 п.н. (в двух повторах); б – гена *htpB* длиной 770 п.н.

ска контакт с клещом отрицал, но до начала заболевания посещал дачу и был укушен собакой. Контакты с домашними и сельскохозяйственными животными, а также употребление в пищу сырого молока у других заболевших не фигурировали в анамнезе.

У всех обследованных заболевание протекало остро, с повышением температуры тела до 39-40 °С. Продолжительность лихорадки составила от 7 до 10 дней (в условиях лечения антибактериальными препаратами). Клинические проявления представлены умеренно выраженными интоксикационным синдромом (слабость, утомляемость) и головной болью. У некоторых пациентов отмечались фарингит, тошнота, рвота, диарея, гепатит либо гепатомегалия. При поступлении в ГИКБ №1 шести заболевшим был поставлен диагноз «клещевой энцефалит» (лихорадочная форма), трем другим – «сибирский клещевой тиф», ИКБ и ОРВИ (табл. 2). Однако, так как у пациентов в образцах крови детектирована ДНК *C. burnetii*, и не выявлены ДНК-маркеры к возбудителям других ИПК, циркулирующих в Западной Сибири, а также отсутствовали серологические маркеры к ВКЭ (IgM) и к возбудителям ИКБ (IgM, IgG), сделано предположение, что лихорадочные состояния у этих больных обусловлены именно наличием в крови возбудителя Ку-лихорадки. Поэтому с целью подтверждения положительных результатов ПЦР-анализа, которые получены с помощью теста «Сохbur-1», были предприняты попытки амплифицировать ДНК *C. burnetii* по участкам генов *IS1111* и *htpB* длиной 390 и

770 п.н., соответственно, с использованием комбинаций праймеров (см.табл. 1). Амплификаты обоих участков генов соответствующей длины получены с проб ДНК, повторно выделенных из крови трех больных: №161, 180 и 286 (рис. 2). Попытка амплифицировать ДНК *C. burnetii*, полученную из образцов от 6 других положительных больных, оказалась безуспешной, возможно из-за низкой нагрузки возбудителя в крови, низкой нагрузки его ДНК в полученных пробах, что описано выше.

Наработанные ампликоны по участкам генов *IS1111* и *htpB*, ДНК которых выделена из крови трех больных (№161, 180, 286), успешно секвенированы и депонированы в базе данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Результаты проведенного молекулярно-генетического анализа свидетельствовали, что полученные по *IS1111* и *htpB* нуклеотидные последовательности трех изолятов Novosibirsk-2018/161 (МК064571 и МК335931), Novosibirsk-2018/180 (МК064572 и МК335932) и Novosibirsk-2018/286 (МК064573 и МК335933) полностью аналогичны между собой. Анализ последовательностей с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) показал, что последовательности этих трех изолятов 100% идентичны последовательностям двух штаммов *C. burnetii* «CbuK Q154» (CP001020) и «MSU Goat Q177» (CP018150), полноразмерные геномы которых представлены в базе данных GenBank. Следует отметить, что именно для *C. burnetii* последовательность *IS1111* является высококонсервативной, и в настоящее время для конкрет-

ного используемого нами локуса в базе данных GenBank отсутствуют аналогичные последовательности, полученные для *Coxiella*-подобных эндосимбионтов, выявленные в клещах. Согласно опубликованным данным, ген транспозазы *IS1111* является многокопийным геном, и его использование в качестве мишени в ПЦР позволяет повысить чувствительность анализа, что является причиной частого использования последовательностей его ДНК в качестве мишеней в диагностике возбудителя Ку-лихорадки [27]. Поэтому, для детекции *C. burnetii* в клинических образцах использован разработанный нами ПЦР-тест в режиме реального времени с праймерами, направленными к данному локусу. Тем не менее, хотя и считается, что последовательность *IS1111* присутствует только в геномах *C. burnetii*, для *Coxiella*-подобных эндосимбионтов описаны *IS1111*-подобные мобильные элементы, демонстрирующие 90% уровень сходства нуклеотидных последовательностей с последовательностями *IS1111 C. burnetii* [28], для которых может существовать широкий спектр вариантов, различающихся по последовательностям и длинам [29]. Таким образом, вследствие малой изученности данного вопроса и отсутствия соответствующих последовательностей в базе данных GenBank гипотетически допускали возможность, что последовательность *IS1111* для *C. burnetii* могла и не быть высокоспецифичной. Поэтому, для исключения ложноположительных результатов наряду с секвенированием полученных фрагментов *IS1111*, для подтверждения выявления участка ДНК *C. burnetii* использовали комбинацию праймеров Р-СВ-*gro-F3* и Р-СВ-*gro-R4* (см. табл. 1) для выявления другого локуса, соответствующего гену *htpB*. Дополнительно амплифицированные с образцов ДНК возбудителя, выделенные из трех изолятов (№161, 180, 286), фрагменты гена *htpB* длиной 770 п.н. были так же успешно

секвенированы (МК335931, МК335932, МК335933). Построенная дендрограмма по фрагменту гена *htpB* (рис. 3) наглядно свидетельствует о том, что полученные последовательности изолятов *C. burnetii* аналогичны последовательностям штаммов СbO1 (EU888864), СbC1 (EU888862) и Xinqiao (AY251297), две из которых описаны при получении рекомбинантного белка теплового шока В, используемого в качестве антигена для иммунодиагностики Ку-лихорадки [30]. При этом у секвенированных фрагментов отмечаются серьезные отличия от последовательностей *htpB Coxiella-like* бактерий, выделенных из таких клещей как, *I. ricinus*, *D. silvarum*, *D. marginatus* и других иксодид неустановленного вида. Таким образом, по результатам, полученным на основании последовательностей двух локусов *IS1111* и *htpB*, можно судить о том, что последовательности ДНК, выявленные из трех изолятов, действительно соответствуют возбудителю *C. burnetii*.

Для дополнительной оценки правильности результатов, полученных в ПЦР-РВ с помощью разработанного экспериментального диагностического теста «Сохbug-1» использовали серологический метод для подтверждения возможного инфицирования больных возбудителем Ку-лихорадки. У всех пациентов, у которых в ПЦР-РВ выявлен ДНК-маркер *C. burnetii*, дополнительно проведен анализ образцов сыворотки крови с помощью иммуноферментных наборов реагентов испанского и российского производства, предназначенных для определения антител класса G к антигенам II фазы («*Coxiella burnetii* ELISA IgG» «Vircell») или к I и II фазам («ИФА-анти-Ку комплект №1» (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург). Взятие первой партии крови для проведения ИФА у обследованных больных произведено в первые дни острой фазы заболевания (начало кли-

Таблица 2

Данные эпиданамнеза, предварительный диагноз, результаты молекулярно-генетического анализа и ИФА клинических образцов, полученных от больных, госпитализированных с подозрением на ИПК

№ больного	Эпиданамнез	Регион заражения	Первичный диагноз	ПЦР-РВ, выявление ДНК <i>C. burnetii</i> (значения Ct) в образцах:		Результаты секвенирования ДНК <i>C. burnetii</i> по участкам генов:		Выявление специфических антител класса G к <i>C. burnetii</i> (значения образцов в единицах ОП)	
				ЦКР	ЛФР	<i>IS1111</i>	<i>groEL</i>	« <i>Coxiella burnetii</i> ELISA IgG» «Vircell»	«ИФА-анти-Ку комплект №1» НИИ им. Пастера
3	Наползание клеща	Новосибирская обл.	КР	35, отриц	отриц., отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
8	Присасывание клеща	г. Бишкек, Киргизия	КЭ	36, отриц.	35, отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
24	Присасывание клеща	Республика Алтай	КЭ	отриц., отриц.	37, отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
40	Присасывание клеща	Республика Алтай	ИКБ	38, отриц.	отриц., отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
75	Присасывание клеща	Новосибирск	КЭ	отриц., отриц.	38, отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
102	Присасывание клеща	Новосибирск	КЭ	37, отриц.	отриц., отриц.	отриц.	отриц.	полож. (1,6 ое)	полож. (1,6 ое)
161	Дача, укусы собаки	Новосибирская обл.	КЭ	31, 31	29, 29	полож.	полож.	полож. (1,7 ое)	полож. (3,8 ое)
180	Наползание клеща	Новосибирская обл.	КЭ	30, 32	28, 30	полож.	полож.	полож. (1,5 ое)	полож. (3,6 ое)
286	Дача, лес	Новосибирская обл.	ОРВИ, КЭ	34, 34	30, 30	полож.	полож.	полож. (1,4 ое)	полож. (3,5 ое)

Примечание. КР – клещевой риккетсиоз (сибирский клещевой тиф); КЭ – клещевой энцефалит; ИКБ – иксодовый клещевой боррелиоз; ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция; ОП – оптическая плотность, указанная для положительных образцов. * – интерпретация результата исследования (отриц/полож) проведена в соответствии с инструкциями по применению наборов реагентов.

16. Яковлев Э.А., Борисевич С.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Заболеваемость лихорадкой Ку в Российской Федерации и странах Европы: реалии и проблемы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4: 49-54. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-49-54>.
17. Красиков А.П., Рудаков Н.В. Риккетсиозы, коксиеллез и анаплазмозы человека и животных. Омск: ИЦ Омский научный вестник; 2013.
18. Сильченко Е.В., Ошорова Л.М., Бальжинимаева И.Ц., Бондаренко Е.И., Дашеева Н.А., Балданов Б.В., Сымбелова Т.А. Выявление клещевых инфекций с помощью ПЦР-анализа, проводимого в рамках клинических исследований на базе «Республиканской клинической больницы» г. Улан-Удэ. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (4): 138–42.
19. Щучинова Л.Д., Бондаренко Е.И. Случаи заражения людей Ку-лихорадкой трансмиссивным путем. В кн.: Покровский В.И., ред. Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием (1-3 апреля 2019 г.). М.: Медицинское Маркетинговое Агентство; 2019; 234–5.
20. Рудаков Н.В., Тофанюк Е.Ф., Бурцев Ю.К., Федоров Е.Г., Мельникова З.В. Эпидемиологическая характеристика очагов лихорадки Ку на территории Новосибирской области. В кн.: Ржегачек И., Дайтер А.Б. Риккетсиозы: сборник научных трудов Института им. Пастера. Л.; 1989; Т. 66: 43–54.
23. Тимофеев Д.И., Бондаренко Е.И., Топычканова Н.Г., Сибирцева С.Г., Малышкин М.Ф., Алексенцев В.А., Иванов М.К. Новые наборы реагентов для выявления нуклеиновых кислот вируса клещевого энцефалита и боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi* s.l. методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. *Новости «Вектор-Бест»*. 2014; 1(71): 2–11.
24. Бондаренко Е.И., Позднякова Л.Л., Сибирцева С.Г., Тимофеев Д.И., Фоменко Н.В., Иванов М.К. Набор реагентов для выявления *Borrelia miyamotoi* – возбудителя клещевой возвратной лихорадки методом ПЦР в режиме реального времени. *Новости «Вектор-Бест»*. 2013; 1 (67): 2–8.
27. Фрейлихман О.А., Токаревич Н.К., Кондрашова В.Д. Лабораторные методы диагностики Ку-лихорадки и генотипирование *Coxiella burnetii*. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017; 2: 49–60.
- eration and European countries. *Bakteriologiya*. 2016; 1(1): 96–101. (in Russian)
14. Lukin E.P., Mishhenko O.A., Borisevich S.V. Q fever in the XXI century: material for the preparation of the lecture. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2019; 8(4): 62–77. (in Russian)
15. Carcopino X., Raoult D., Bretelle F., Boubli L., Stein A. Q Fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1166: 79–89.
16. Yakovlev Ye.A., Borisevich S.V., Popova A. Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V. The incidence of Q fever in the Russian Federation and European countries: realities and problems. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 4: 49-54. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-49-54>. (in Russian)
17. Krasikov A.P., Rudakov N.V. Rickettsioses, coxiellosis and anaplasmosis of humans and animals [Rikketsiozy, koksillyoz i anaplazmozny cheloveka i zhivotnykh]. Омск: IC Omskiy nauchnyi vestnik; 2013. (in Russian)
18. Sil'chenko E.V., Oshorova L.M., Bal'zhinimaeva I.C., Bondarenko E.I., Dasheeva N.A., Baldanov B.V., Symbelova T.A. Detection of tick-borne infections using PCR analysis carried out during the clinical trials at the «Republican Clinical Hospital» in Ulan-Ude city. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (4): 138–42. (in Russian)
19. Shchuchinova L.D., Bondarenko E.I. Cases of Q fever infection of humans by transmissive pathway. In: Pokrovskij V.I, ed. Infectious Diseases in the modern world: evolution, current and future threats: Proceedings of the XI Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases with International Participation, 2019, April 1-3; Moscow: Moscow: Meditsinskoe Marketingovoe Agentstvo; 2019; 234–5. (in Russian)
20. Rudakov N.V., Tofanyuk E.F., Burcev Yu.K., Fedorov E.G., Mel'nikova Z.V. Epidemiological characteristics of Q fever foci on the territory of the Novosibirsk region. In: Rzhegachek I., Dajter A.B. Rickettsioses: collection of scientific works of Institute named for Pasteur. Leningrad; 1989; 66: 43–54. (in Russian)
21. Alieva E.E., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Shvalov A.N., Verbenets E.A., Gafarova M.T. The role of Rhipicephalus sanguineus ticks parasitizing dogs in the spread of tick-borne rickettsial pathogens in the city of Sevastopol. *New Microbes and New Infections*. 2020; 36. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100704>.
22. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipksi A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30 (12): 2725–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
23. Timofeev D.I., Bondarenko E.I., Topychkanova N.G., Sibirceva C.G., Malysheva M.F., Aleksentsev V.A., Ivanov M.K. New reagent kits for the detection of nucleic acids of tick-borne encephalitis virus and borrelia of the *Borrelia burgdorferi* s.l. complex by PCR with real-time detection. *Novosti «Vektor-Best»*. 2014; 1(71): 2–11. (in Russian)
24. Bondarenko E.I., Pozdnyakova L.L., Sibirceva C.G., Timofeev D.I., Fomenko N.V., Ivanov M.K. Reagent kit for detection of *Borrelia miyamotoi* – the causative agent of tick-borne recurrent fever by real-time PCR. *Novosti «Vektor-Best»*. 2013; 1 (67): 2–8. (in Russian)
25. Igolkina Y., Krasnova E., Rar V., Savelieva M., Epikhina T., Tikunov A., Khokhlova N., Provorova V., Tikunova N. Detection of causative agents of tick-borne rickettsioses in Western Siberia, Russia: identification of Rickettsia raoultii and Rickettsia sibirica DNA in clinical samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(2): 199. e9-199.e12. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.003.
26. Tkachev S.E., Fomenko N.V., Rar V.A., Igolkina Y.P., Kazakova Y.V., Chernousova N.Y. PCR-detection and molecular-genetic analysis of tick-transmitted pathogens in patients of Novosibirsk region, Russia. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008; 298(S1): 365–7.
27. Freylikhman O.A., Tokarevich N.K., Kondrashova V.D. Laboratory methods for the diagnosis of Q fever and genotyping of *Coxiella burnetii*. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2017; 2: 49–60. (in Russian)
28. Vilcins I.M., Old J.M., Deane E. Molecular detection of Rickettsia, Coxiella and Rickettsiella DNA in three native Australian tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 2009; 49: 229–42.
29. Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in Coxiella-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiology Letters*. 2015; 362(17): fnv132. doi: 10.1093/femsle/fnv132.
30. Fernandes I., Rousset E., Dufour P., Sidi-Boumedine K., Cupo A., Thiery R., Duquesne V. Evaluation of the recombinant Heat shock protein B (HspB) of *Coxiella burnetii* as a potential antigen for immunodiagnostic of Q fever in goats. *Vet. Microbiol.* 2009; 134 (3-4): 300–4.

REFERENCES

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Мельникова О.В.¹, Трушина Ю.Н.¹, Адельшин Р.В.^{1,2}, Андаев Е.И.¹, Леонова Г.Н.³

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 664047, г. Иркутск, Россия;

²ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, 664003, Иркутск, Россия;

³ФГБНУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора, 690087, Владивосток, Россия

Клещевой энцефалит – трансмиссивная вирусная инфекция, широко распространенная в умеренном поясе Евразии. Для выявления инфицированности переносчиков вирусом КЭ используют ИФА и ПЦР, результаты которых часто не совпадают. Цель работы – сравнительный анализ зараженности ВКЭ природных популяций иксодовых клещей при комплексных исследованиях с помощью ИФА, ПЦР и метода изоляции вируса на модели лабораторных мышей. В период 2013-2019 гг. в природных очагах клещевого энцефалита Прибайкалья собрано 18608 экз. иксодовых клещей. Суспензии клещей исследовали индивидуально с помощью ИФА (n=17610) и ПЦР (n=2999), а положительными по результатам этих тестов пробами заражали мышей 2-3-суточного возраста. Доля клещей с антигеном ВКЭ в среднем составила 1,2 %. Все клещи, показавшие в ИФА положительный результат, были исследованы в ПЦР (группа 1). Часть проб с отрицательными результатами в ИФА также исследовали с помощью ПЦР (группа 2). В группе 1 генетический материал в ПЦР выявлен в 68,9±3,13 % суспензий, средний показатель Ct составил 24,6±0,38. Во второй группе положительные результаты в ПЦР составили 2,7±0,31 %. Средний показатель Ct = 31,0±0,70. Разница средних величин Ct между группами 1 и 2 статистически достоверна (p < 0,001; df = 118). В пробах группы 1 процент изоляции штаммов ВКЭ был значительно выше (21,7±2,77 %), чем в группе 2 (8,2±5,26 %; p < 0,05; df = 50). При исследовании больших выборок клещей рационально использовать ИФА. Для получения более полного представления о доле в природных очагах КЭ переносчиков, представляющих эпидемическую опасность, предлагается суммировать результаты двух экспресс-методов. Изоляцию вируса целесообразно проводить из суспензий, одновременно показавших положительный результат как в ИФА, так и в ПЦР.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита (ВКЭ); иксодовые клещи; вирусофорность; иммуноферментный анализ (ИФА); полимеразная цепная реакция (ПЦР); изоляция вируса.

Для цитирования: Мельникова О.В., Трушина Ю.Н., Адельшин Р.В., Андаев Е.И., Леонова Г.Н. Анализ эффективности методов детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66(4): 237-241. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-237-241>

Mel'nikova O.V.¹, Trushina Yu.N.¹, Adel'shin R.V.^{1,2}, Andaev E.I.¹, Leonova G.N.³

ANALYSIS OF EFFECTIVITY OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS DETECTION METHODS IN IXODID TICKS

¹Irkutsk Anti-Plague Research Institute of Siberia and the Far East, 664047, Irkutsk, Russia;

²Irkutsk State University, 664003, Irkutsk, Russia;

³Scientific-Research Institute of epidemiology and microbiology named after G.P. Somov, 690087, Vladivostok, Russia

Tick-borne encephalitis (TBE) is transmissible viral disease widely common in temperate zone of Eurasia. ELISA and PCR are used for express identification of the vector's infection, but the results of the two methods often do not agree. Aim of the work is comparative analysis for TBE virus of Ixodid ticks from nature using complex of methods, including ELISA, PCR, and isolation of the virus in laboratory mice. 18608 Ixodid ticks were collected during 2013-2019 in TBE natural foci of the Baikal Region. The ticks suspensions were examined individually, using ELISA (n=17610) and PCR (n=2999). Suckling mice were inoculated with the suspensions positive in the both tests. The TBEV antigen was found in 1.2 % of ticks in average. All ticks positive in ELISA were examined in PCR (Group 1). Randomly selected part of negative-ELISA samples were examined in PCR too (Group 2). The PCR results were positive in 68.9±3.13 % of the Group 1, with average Ct index 24.6±0.38. Positive results of PCR in Group 2 accounted for just 2.7±0.31 % with average Ct index 31.0±0.70. The average Ct margin of the Groups 1 and 2 is statistically significant (p < 0.001; df = 118). Isolation of strains was significantly more successful in Group 1 (21.7±2.77 %), than in Group 2 (8.2±5.26 %; p < 0.05; df = 50). ELISA is more useful for examining large amounts of ticks. To get a more complex picture about epidemically dangerous part of the vectors in TBE natural foci, the results of the two express-methods is better to sum. The isolation of the virus is useful to carry out of the samples positive in ELISA and PCR concurrently.

Key words: tick-borne encephalitis virus (TBEV); Ixodid ticks; density of infected ticks; ELISA; PCR; virus isolation.

For citation: Mel'nikova O.V., Trushina Yu.N., Adel'shin R.V., Andaev E.I., Leonova G.N. Analysis of effectivity of the tick-borne encephalitis virus detection methods in ixodid ticks. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021;66 (4) : 237-241 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-237-241>

For correspondence: *Melnikova O.V.*, Sc. D., senior researcher; e-mail: melnikovaovit@gmail.com

Information about authors:

Mel'nikova O.V. , <https://orcid.org/0000-0001-5133-0323>
Trushina Yu.N. , <https://orcid.org/0000-0003-4501-146X>
Adel'shin R.V. , <https://orcid.org/0000-0003-3690-3992>
Andaev E.I. , <https://orcid.org/0000-0002-6612-479X>
Leonova G.N. , <https://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Received 05.06.2020
Accepted 20.10.2020

Введение. Клещевой энцефалит (КЭ) широко распространен на территории умеренного пояса Евразийского континента. Для понимания эпидемиологии этой инфекции и стратегии иммунопрофилактики необходимы знания об участии иксодовых клещей в обеспечении циркуляции вирусных популяций в природных очагах КЭ. Важными факторами, определяющими напряженность очагов КЭ, являются не только численность переносчиков вируса, но и доля зараженных особей или, как определяют Ю.С. Коротков и соавт. [1], численность векторной популяции переносчика. В настоящее время для исследования природного и клинического материала используют несколько способов детекции вируса КЭ (ВКЭ) (биологические, серологические, молекулярно-генетические), которые имеют свои достоинства и недостатки [2]. Выбор способов зависит от задач исследований, от финансовых и технических возможностей каждой лаборатории, имеющей определенный уровень биобезопасности. В специализированных лабораториях, где применяются одновременно разные диагностические подходы, было замечено: результаты применяемых методов исследований часто не совпадают. Это обстоятельство неоднократно привлекало внимание исследователей, которые, как правило, стремились показать преимущество и эффективность предлагаемого метода [3, 4]. Но даже в случае применения одного и того же метода исследования возможны несовпадения полученных результатов. Такое может происходить при использовании тест-систем разных производителей [2, 5], при нарушении протокола проведения анализа [6], неоднородности трактовки результатов [7] и некоторых технических ошибок при постановке реакции [8]. На основе экспериментальных исследований Г.Н. Леоновой [9] были показаны особенности верификации ВКЭ. Предложенные автором рекомендации предстояло использовать для изучения вирусифорности иксодовых клещей, обитающих в природных очагах инфекции.

Цель настоящей работы – провести сравнительный анализ зараженности вирусом КЭ иксодовых клещей из природных популяций Прибайкалья при комплексных исследованиях, используя иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и метод изоляции вируса на модели лабораторных мышей.

Материал и методы. В весенне-летние периоды 2013 – 2019 гг. были проведены сборы иксодовых клещей (97,7 % из которых – имаго *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930) на флаг в природных очагах КЭ Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия). За этот период собрано 18608 экз. иксодовых клещей, которые были исследованы индивидуально. Для подготовки суспензии использовали физиологический раствор (0,5 мл на одного клеща) с антибиотиками (пенициллин 500 ед/мл). Всех собранных клещей первоначально исследова-

ли с помощью ИФА (Тест-система иммуноферментная для выявления антигена вируса клещевого энцефалита («Микроген», Томск-Москва)) в соответствии с инструкцией производителя. Учет результатов проводили с помощью иммуноферментного анализатора IMARK BioRAD при длине волны 450 нм. Пробу считали положительной, если отношение величины ее экстинкции к величине экстинкции нормального контроля (P/N) было 2,1 и более.

Кроме скрининга с помощью ИФА, проводили выборочное исследование клещей в ОТ-ПЦР-РВ (метод случайных выборок; $n=2999$), используя набор реагентов «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferis*.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL» ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва). РНК вируса выделяли с помощью набора «Ампли-Прайм® РИБО-преп» ООО «НекстБио» (Москва). Обратную транскрипцию проводили при помощи набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Результаты учитывали на термоциклере C1000™ Bio-Rad CFX96™ (США) по значению величины порогового цикла Ct (граничное значение равно 38).

В последующем суспензиями клещей, положительными по результатам ИФА и ПЦР, заражали внутримозговым способом лабораторных мышей 2-3-суточного возраста по общепринятой методике. За животными наблюдали 21 день. У заболевших мышей забирали головной мозг, руководствуясь «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены Приказом Минздрава России от 23.08.2010). При отсутствии клинических признаков заболевания, на 7-е сутки после заражения проводили «слепой» пассаж.

Материалы по заболеваемости КЭ жителей г. Иркутска взяты из авторской Базы данных¹.

Статистическая обработка данных проводилась стандартными методами (оценка среднего, стандартное отклонение, критерий Стьюдента, корреляционный анализ) с помощью программного продукта Microsoft Excel-2007.

Результаты. С помощью разных методов детекции ВКЭ в иксодовых клещах природных очагов Прибайкалья получены данные многолетних показателей вирусифорности переносчика. Результаты исследования клещей экспресс-методами представлены в табл. 1. С помощью ИФА исследовано 17 610 суспензий клещей, антиген ВКЭ обнаружен в 219 пробах, что составило 1,2±0,08 %. Все клещи, показавшие в ИФА положительный результат,

¹Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013620219 от 31.01.13 г.

были исследованы с помощью ПЦР (группа 1). Кроме того, часть суспензий с отрицательными результатами в ИФА исследовали с помощью ПЦР (группа 2).

Из 219 исследованных проб группы 1 положительные результаты ПЦР в разные годы выявляли от 40,5 до 100 %, средний показатель был равен $68,9 \pm 3,13$ %. Значения *St* этих проб колебались от 19 до 30, средний показатель составил $24,6 \pm 0,38$. Корреляция показателей зараженности клещей в ИФА и ПЦР не выявлена ($r_s = -0,028$).

Во второй группе исследовано 2780 проб клещей, в 75 случаях получены положительные результаты в ПЦР, что составило $2,7 \pm 0,31$ %. Значения *St* колебались от 21 до 36, средний показатель достигал $31,0 \pm 0,70$, что свидетельствует о низкой концентрации РНК ВКЭ в этих пробах. Разница средних величин *St* между группами 1 и 2 статистически достоверна ($p < 0,001$; $df = 118$).

Если результаты ПЦР обследованных клещей группы 1 явились фактом подтверждения их инфицированности, обнаруженной с помощью ИФА, то результаты ПЦР группы 2 свидетельствовали о том, что в исследованных пробах происходил не полный учет инфицированности их ВКЭ. В этой связи все случаи детекции генетического материала ВКЭ в клещах 2-й группы мы добавили к числу положительных результатов, выявленных в ИФА, и в итоге получили более полную картину вирусифорности переносчика.

В табл. 2 показаны уточненные данные по вирусифорности иксодовых клещей, а также по заболеваемости КЭ

жителей г. Иркутска, заражавшихся на обследованных территориях Прибайкалья в течение изучаемого периода.

Примечательно, что показатели заболеваемости не коррелировали с показателями зараженности клещей как по результатам ИФА ($r_s = -0,046$), так и поданным суммарной вирусифорности ($r_s = -0,036$), указывая на то, что даже уточненной информации о доле зараженных клещей недостаточно для выявления взаимосвязи сложных механизмов, влияющих непосредственно на заболеваемость КЭ.

Инфекционность вируса в этих пробах показана на модели мышей 2-3-суточного возраста. Так, в пробах группы 1 процент изоляции штаммов ВКЭ был значительно выше ($21,7 \pm 2,77$ %), чем в группе 2 ($8,2 \pm 5,26$ %; $P < 0,05$; $df = 50$).

Обсуждение. В настоящее время практически в каждом регионе Российской Федерации, эндемичном по КЭ, проводятся исследования иксодовых клещей на выявление маркеров ВКЭ с помощью ИФА и ПЦР. На основании нашего анализа корреляция результатов экспресс-методов как между собой ($r_s = 0,006$), так и с показателями заболеваемости отсутствует.

Следует отметить, что результаты исследования переносчиков даже одним и тем же методом на разных территориях трудно сопоставлять. Особенно это касается использования альтернативных методов (ИФА и ПЦР), результаты которых расходятся у некоторых авторов до

Таблица 1

Результаты выявления маркеров вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах из природных очагов Прибайкалья

Годы	Результаты ИФА		Результаты ПЦР			
			Группа 1 (ИФА+)		Группа 2 (ИФА-)	
	<i>n</i> / из них положительные	%±m	<i>n</i> / из них положительные	%±m	<i>n</i> / из них положительные	%±m
2013	2160/31	1,4±0,26	31/31	100,0±2,94	253/9	3,6±1,16
2014	2216/22	1,3±0,26	22/22	100,0±4,00	479/9	1,9±0,62
2015	2336/43	1,8±0,28	43/31	72,1±6,84	325/10	3,1±0,96
2016	2774/19	0,7±0,16	19/16	84,2±8,37	298/5	1,7±0,74
2017	2551/48	1,9±0,27	48/21	43,8±7,16	427/16	3,7±0,92
2018	2495/42	1,7±0,26	42/17	40,5±7,57	430/5	1,2±0,52
2019	3078/14	0,5±0,12	14/13	92,9±6,88	568/21	3,7±0,79
Всего	17610/219	1,2±0,08	219/151	68,9±3,13	2780/75	2,7±0,31

Таблица 2

Суммарные показатели зараженности вирусом КЭ иксодовых клещей, собранных с растительности в природных очагах, и заболеваемость КЭ в Прибайкалье

Годы	Исследовано клещей в ИФА и ПЦР	Суммарное количество проб, положительных в ИФА+ и ПЦР+	Вирусифорность иксодовых клещей (%±m)	Заболеваемость КЭ (на 100 тыс. населения)
2013	2160	40	1,9±0,29	6,2
2014	2216	33	1,5±0,26	4,2
2015	2336	53	2,3±0,31	6,2
2016	2774	24	0,9±0,18	5,7
2017	2551	64	2,5±0,31	3,3
2018	2925	47	1,6±0,23	4
2019	3646	35	1,0±0,16	4
Всего	18608	296	1,6±0,09	4,8

40 % [10]. По нашему мнению, основанному на результатах многолетней работы по мониторингованию ситуации в природных очагах и проведению скрининга зараженности иксодовых клещей из объектов окружающей среды, методом выбора в первую очередь служит ИФА. Его безусловными преимуществами являются значительно меньшая трудозатратность и стоимость по сравнению с ПЦР, а также высокая пропускная способность. Несмотря на меньшую чувствительность ИФА по сравнению с ПЦР [4, 9], этот метод, по нашему мнению, достаточно специфичен для индикации вируса в переносчиках. Известно, что возникновение случаев заболевания у людей может происходить после присасывания клещей, содержащих высокую дозу вируса (более 3 lg КИД₅₀) [11, 12]. В экспериментальных работах со штаммами ВКЭ разной патогенности показано, что положительные результаты в ИФА и ПЦР можно выявлять при титре вируса не менее чем 1-1,5 log TCID₅₀, т.е. этот уровень вируса в пробах определен, как эпидемически значимый [9].

Еще одним аргументом в пользу применения ИФА для выявления инфицированных клещей является возможность обнаружения с его помощью других вирусов комплекса КЭ [6, 13]. С одной стороны, это может свидетельствовать о невысоком уровне специфичности ИФА, но с другой стороны расширяется спектр выявляемых антигенно-близких возбудителей, которые циркулируют в природных очагах одновременно с ВКЭ (Омская геморрагическая лихорадка в Западной Сибири или вирус Повассан в Приморском крае).

Следует уточнить, что детекция генетического материала возбудителя в ПЦР не гарантирует выявление инфекционного вируса ни в природных образцах, ни в пробах от людей [2, 15]. Об этом свидетельствуют и результаты, полученные в настоящей работе: в группе 1 (ИФА+) генетический материал ВКЭ выявлен у 68,9 % клещей, а инфекционными для мышей оказались 21,7 % от этих проб; во второй группе (ИФА-) эти показатели были значительно ниже (2,7 и 8,2 % соответственно).

До сих пор изоляция возбудителя на биологической модели считается «золотым стандартом», подтверждающим присутствие жизнеспособного вируса в исследуемой пробе [2]. В работах, касающихся детекции ВКЭ, показан разный уровень соответствия результатов экспресс-методов и биопробы: ИФА vs биопроба – 67,6 % (исследование пулов клещей), МГНК vs биопроба – 66,4 % [3]; 35,0-80,6% апаатогенных образцов оказалось среди вирусифорных клещей по данным комплекса методов (ИФА и ПЦР) [14]. В той же работе отмечены отрицательные результаты ОТ-ПЦР и ИФА для клещевых суспензий, вызывающих заболевание КЭ у мышей. А.М. Титенко и соавт. [16] из суспензий клещей, положительных в ИФА, ВКЭ выделяли в 41,2 % случаев, а отрицательных – в 6,8 %.

Следует отметить, что как в нашем исследовании, так и в работах других авторов показатели вирусифорности переносчиков ВКЭ в природных очагах не коррелировали с уровнем заболеваемости населения на соответствующих территориях [17, 18]. По мнению Э.И. Коренберга и соавт. [19] процент зараженности клещей возбудителем плохо отражает эпизоотическое состояние очага, поскольку этот показатель не позволяет судить о количестве возбудителя в инфицированных особях. В настоящем исследовании клещей группы 2 в ПЦР высокий показатель средней величины порогового цикла (Ст = 31) также свидетельствовал о небольшом количестве

вирусной РНК в исследуемых образцах, что объясняло редкие случаи изоляции ВКЭ в этой группе проб.

Таким образом, анализ многолетних исследований по индикации ВКЭ в клещах из природных очагов с помощью двух экспресс-методов ИФА и ПЦР и по изоляции вируса на биологической модели, позволили сделать следующие выводы:

1. С целью проведения мониторинга вирусифорности иксодовых клещей для анализа больших выборок членистоногих из природных очагов рационально использовать ИФА, который позволит получить предварительное представление о доле эпидемически значимых переносчиков ВКЭ.

2. Для оценки полной картины вирусифорности иксодовых клещей следует одновременно проводить исследование в ИФА и в ПЦР, суммируя результаты в общий показатель зараженности клещей ВКЭ.

3. Для эффективной изоляции штаммов вируса КЭ из суспензий исследуемых клещей биопробу следует проводить в случаях одновременного выявления АГ в ИФА и генетического материала в ПЦР.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций и зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, принимавших в разные годы участие в сборе клещей и подготовке.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5, 18 см. REFERENCES)

1. Коротков Ю.С., Буренкова Л.А., Рукавишников М.Ю. Вирусифорность голодных взрослых клещей *Ixodes persulcatus* в среднетаежных лесах Карелии (северо-запад Прионежья). Медицинская вирусология. Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова. 2006; XXIII: 90-4.
3. Злобин В.И., Кветкова Э.А., Наволокин О.А., Мансуров П.Г., Дрокин Д.А., Пиценко Н.Д. и др. Сравнение трёх экспресс-методов индикации вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1990; 1: 57-9.
4. Белова О.А., Буренкова Л.А., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Топычанова Н.Г., Кувшинова И.Н. и др. Эффективность детекции вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах (Acari: Ixodidae) с помощью иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59 (5): 38-43.
6. Холодилов И.С., Белова О.А., Мотузова О.В., Орлова О.Е., Романова Л.Ю., Гмыль А.П. и др. Проблемы идентификации вируса клещевого энцефалита в клещах. Молекулярная диагностика. Сборник трудов. Покровский В.И., ред. М.: ООО «Издательство МБА», 2014а; 1: 505.
7. Холодилов И.С., Белова О.А., Мотузова О.В., Гмыль А.П., Романова Л.Ю., Бойко В.А. и др. Оценка зараженности клещей вирусом клещевого энцефалита с использованием различных методов исследования. Неоднозначность трактовки результатов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 3 (76): 29-35.
8. Масяго А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА (информационно-методическое пособие). Кольцово; 2004.
9. Леонова Г.Н. Сравнительный анализ эффективности методов верификации вируса клещевого энцефалита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (11): 686-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>.
10. Ржанова Т.Г., Дубинина О.А., Лютая Н.И. Эпидемиологические особенности распространения клещевого вирусного энцефалита на территории Тюменской области. Актуальные проблемы

- природной очаговости болезней. Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней (24-25.11.09, г. Омск). Рудаков Н.В., Ястребов В.К., ред. Омск: ИЦ «Омский научный вестник»; 2009: 55-6.
11. Пеньевская Н.А. Методологические подходы к оценке эффективности этиотропной противовирусной иммунопрофилактики (на примере препаратов иммуноглобулина против клещевого энцефалита). *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2008; 10 (1): 70-84.
 12. Пеньевская Н.А., Злобин В.И. Экстренная профилактика клещевого энцефалита с помощью гомологичного специфического иммуноглобулина: теория и практика. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 70 (3): 81-9.
 13. Наволокин О.В., Субботина Л.С., Хотетитский В.Я. Использование прямого иммуноферментного метода для идентификации и индикации вируса клещевого энцефалита. *Природно-очаговые болезни человека*. Омск; 1985: 45-50.
 14. Морозова О.В., Баквалова В.Н., Чичерина Г.С., Романенко В.Н., Панов В.В. Ограничения молекулярных методов при анализе природных популяций РНК-содержащих вирусов. *Молекулярная диагностика*. Сборник трудов. Покровский В.И., ред. М.: ООО «Издательство МБА», 2014; 1: 512-3.
 15. Леонова Г.Н. Верификация случаев лихорадки Денге, завезенных на территорию юга Дальнего Востока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (6): 382-386. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-382-386>.
 16. Титенко А.М., Бахум С.В., Андаев Е.И., Борисова Т.И. Эффективность альтернативных методов изоляции вируса клещевого энцефалита из клещей *Ixodes persulcatus*. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2004; 1 (2): 162-5.
 17. Валицкая А.В., Рязанцева Г.А., Катин А.А., Пустовалова В.Я. Сравнительная характеристика риска заражения клещевым энцефалитом в очагах с различной ландшафтной приуроченностью. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2002; 4: 11-4.
 19. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Гинзбург А.Л., Злобин В.Н., ред. М., 2013.
- ies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2018; 19 (5): 358-64. doi: 10.1089/vbz.2018.2359.
6. Kholodilov I.S., Belova O.A., Motuzova O.V., Orlova O.E., Romanova L.Yu., Gmyl' A.P. et al. The problems of tick-borne encephalitis virus identification in ticks. In: *Molecular diagnostics: Proceedings of the Conference*. Pokrovsky V.I., ed. Moscow: OOO "Izdatel'stvo MBA", 2014a; 1: 505. (in Russian)
 7. Kholodilov I.S., Belova O.A., Motuzova O.V., Gmyl' A.P., Romanova L.Yu., Boyko V.A. et al. Evaluation of tick-borne encephalitis virus infection of the ticks using various research methods. The ambiguity of the results interpretation. *Epidemiologiya i Vaksino-profilaktika*. 2014b; 3 (76): 29-35. (in Russian)
 8. Masyago A.V. Some errors in ELISA setting (informational and methodical material). Koltsovo; 2004. (in Russian)
 9. Leonova G.N. The comparative analysis of the tick-borne encephalitis virus verification methods. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (11): 686-9. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>. (in Russian)
 10. Rzhanova T.G., Dubinina O.A., Lyutaya N.I. Epidemiological features of tick-borne encephalitis in Tyumen region. In: *Actual problems of natural-focal diseases: Proceedings of the All-Russian Conference with International participation*. Omsk, 2009: 55-6. (in Russian)
 11. Pen'evskaya N.A. Methodological approaches applied to the assessment of aetiotropic antiviral immunoprophylaxis (by examining of anti-tick-borne encephalitis immunoglobulin drugs). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2008; 10 (1): 70-84. (in Russian)
 12. Pen'evskaya N.A., Zlobin V.I. Urgent prevention of tick-borne encephalitis by using homological specific immunoglobulin: theory and practice. *Epidemiologiya i Vaksino-profilaktika*. 2013; 70 (3): 81-9. (in Russian)
 13. Navolokin O.V., Subbotina L.S., Khotetitskiy V.Ya. Using of direct ELISA for indication and identification of tick-borne encephalitis virus. *Природноочаговые болезни человека*. Омск; 1985: 45-50. (in Russian)
 14. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Romanenko V.N., Panov V.V. Constrains of molecular methods in assessing of natural RNA viruses populations. *Molekulyarnaya diagnostika*. Proceedings of the Conference. Pokrovsky V.I. ed. Moscow: OOO "Izdatel'stvo MBA", 2014; 1: 512-3. (in Russian)
 15. Leonova G.N. Verification of dengue fever cases, imported in the territory of southern Far East. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2020; 65(6): 382-6. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-382-386>. (in Russian)
 16. Titenko A.M., Bakhum S.V., Andaev E.I., Borisova T.I. Effectivity of alternative methods of the tick-borne encephalitis virus isolation from the *Ixodes persulcatus* ticks. *Byulleten VSN Ts SO RAMN*. 2004; 1 (Tom 2): 162-5. (in Russian)
 17. Valitskaya A.V., Ryazantseva G.A., Katin A.A., Pustovalova V.Ya. Tick-borne encephalitis relative exposure risk in natural foci with different landscape locating. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2002; 4: 11-4. (in Russian)
 18. Moshkin M.P., Novikov E.A., Tkachev S.E., Vlasov V.V. Epidemiology of a tick-borne viral infection: theoretical insights and practical implications for public health. *Bioessays*. 2009; 31 (6): 620-8.
 19. Korenberg E., Pomelova V., Osin N. Infections with natural focality transmitted by Ixodid ticks [Prirodnoochagovyye infektsii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami]. Ginzburg A.L., Zlobin V.N., eds. Moscow; 2013. (in Russian)

REFERENCES

1. Korotkov Yu.S., Burenkova L.A., Rukavishnikov M.Yu. Density of infected questing imago ticks *Ixodes persulcatus* in Karelian middle-taiga forests (northwestern Prionezhie). *Meditinskaya virusologiya* [Trudy Instituta poliomielitov i virusnykh entsefalitov im. M.P. Chumakova]. 2006; XXIII: 90-4. (in Russian)
2. Ergunay K., Tkachev S., Kozlova I., Ruzek D. A Review of Methods for Detecting Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Tick, Animal, and Human Specimens. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016; 16 (1): 4-12. doi: 10.1089/vbz.2015.1896. DOI: 10.1089/vbz.2015.1896.
3. Zlobin V.I., Kvetkova E.A., Navolokin O.A., Mansurov P.G., Drokin D.A., Pitsenko N.D. et al. Comparison of three express methods of the tick-borne encephalitis virus indication. *Voprosy virusologii*. 1990; 1: 57-9. (in Russian)
4. Belova O.A., Burenkova L.A., Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Topychkanova N.G., Kuvshinova I.N. et al. The effectivity of tick-borne encephalitis virus detection in Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) using ELISA and real-time polymerase chain reaction. *Voprosy virusologii*. 2014; 59 (5): 38-43. (in Russian)
5. Ackermann-Gäumann R., Eyer C., Leib S.L., Niederhauser C. Comparison of Four Commercial IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Tick-Borne Encephalitis Virus Antibod-

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Канашенко М.Е., Мицевич И.П., Карцев Н.Н., Асташкин Е.И., Детушева Е.В., Храмов М.В., Светоч Э.А., Фурсова Н.К.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *ELIZABETHKINGIA MENINGOSEPTICA* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ И ДЕЗИНФЕКТАНТАМ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», 142279, пос. Оболensk, Московская обл., Серпуховский р-н, Россия

Для отечественного здравоохранения Elizabethkingia meningoseptica остается относительно новым и малоизученным патогеном, в то время как во многих странах Европы, Азии и других континентов он рассматривается как потенциальный возбудитель ИСМП, в особенности у недоношенных новорожденных и иммунокомпрометированных больных. Анализ литературы, полученные нами результаты свидетельствуют, что E. meningoseptica следует рассматривать как потенциальный патоген, для которого характерен уникальный профиль восприимчивости к антимикробным препаратам (АМП). Приводятся результаты изучения чувствительности к АМП и дезинфектантам трёх изолятов E. meningoseptica, выделенных в ходе расследования вспышки заболеваемости в одном из перинатальных центров РФ, где в период с января по февраль 2016 г. зарегистрировано три случая сепсиса с летальным исходом у недоношенных новорожденных, вызванного сочетанной инфекцией Acinetobacter baumannii и E. meningoseptica.

Ключевые слова: *Elizabethkingia meningoseptica*; нозокомиальные инфекции; антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Канашенко М. Е., Мицевич И. П., Карцев Н. Н., Асташкин Е. И., Детушева Е. В., Храмов М. В., Светоч Э. А., Фурсова Н. К. Изучение профиля чувствительности *Elizabethkingia meningoseptica* к антибактериальным препаратам и дезинфектантам. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 242-247 DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-242-247>

Kanashenko M.E., Mitzevich I.P., Kartsev N.N., Astashkin E.I., Detusheva E.V., Khramov M.V., Svetoch E.A., Fursova N.K.

A STUDY OF ANTIBIOTIC AND DISINFECTANT SUSCEPTIBILITY OF *ELIZABETHKINGIA MENINGOSEPTICA*

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

For the local health service, Elizabethkingia meningoseptica remains a relatively new and little-known pathogen, whereas in many countries of Europe, Asia and other continents it is considered as a potential causative agent of nosocomial infections, especially in premature infants and immunocompromised patients. An analysis of the literature data, as well as our results indicate that E. meningoseptica should be considered as a potential pathogen, which is characterized by a unique profile of susceptibility to antimicrobial agents (AMP) and disinfectants. This article presents the results of a study of susceptibility to AMP and disinfectants of three isolates of E. meningoseptica, isolated during an investigation of an outbreak in one of the perinatal centers of the Russian Federation, where three cases of sepsis with a fatal outcome in premature infants caused by co-infection with Acinetobacter baumannii and E. meningoseptica were recorded between January and February 2016.

Key words: *Elizabethkingia meningoseptica*, nosocomial infections, antibiotic resistance.

For citation: Kanashenko M.E., Mitzevich I.P., Kartsev N.N., Astashkin E.I., Detusheva E.V., Khramov M.V., Svetoch E.A., Fursova N.K. A study of antibiotic and disinfectant susceptibility of *Elizabethkingia meningoseptica*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 242-247 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-242-247>

For correspondence: *Kanashenko M.E.*, junior researcher of The Antimicrobial Agents Laboratory, Department of Molecular Microbiology; e-mail: Kanashenko@obolensk.org

Information about authors:

Kanashenko M. E., <https://orcid.org/0000-0001-5330-0806>;
Mitzevich I. P., <https://orcid.org/0000-0002-7521-1641>;
Kartsev N. N., <http://orcid.org/0000-0002-2006-9131>;
Astashkin E. I., <https://orcid.org/0000-0002-3559-9071>;
Detusheva E. V., <http://orcid.org/0000-0003-3478-6534>;
Khramov M. V., <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>;
Svetoch E. A., <http://orcid.org/0000-0002-3185-1954>;
Fursova N. K., <http://orcid.org/0000-0001-6053-2621>.

Conflict of interests. *The authors declare the absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 26.03.2020
Accepted 11.09.2020

Впервые данный микроорганизм описан Элизабет О. Кинг, изучавшей причину менингита у новорожденных в 1959 г., и назван [*Flavobacterium*] *meningosepticum*. В

1994 г. произведена реклассификация, и его отнесли к семейству *Flavobacteriaceae*, роду *Chryseobacterium*, виду *Chryseobacterium meningosepticum*. В 2005 г. на ос-

Для корреспонденции: *Канашенко Мария Евгеньевна*, мл. науч. сотр. лаб. антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии; e-mail: Kanashenko@obolensk.org

новании проведённого анализа 16S рРНК в семействе *Flavobacteriaceae* выделили новый род *Elizabethkingia*, к которому принадлежат: *E. meningoseptica*, *E. miricola*, *E. anopheles*, *E. endophytica* [1].

Морфологически *E. meningoseptica* – тонкие, слегка изогнутые одиночные палочки с закруглёнными концами, грамтрицательные, неподвижные. Спор не образуют, облигатные аэробы [1]. В окружающей среде встречается повсеместно, в почве и воде. Вспышки ИСМП потенциально могут возникать при использовании загрязнённой возбудителем воды, медицинских устройств, недостаточно простерилизованного инструментария [2–4].

E. meningoseptica растёт на простых питательных средах, не требует дополнительных факторов роста [5]. Культуральной особенностью *E. meningoseptica* является медленный и слабый рост или его полное отсутствие на агаре МакКонки. Оптимально культивирование в аэробных условиях при температуре 22–37 °С [6]. Представители рода *Elizabethkingia* являются галотолерантными, что наблюдается у большинства видов семейства *Chryseobacterium* [7].

E. meningoseptica относится к группе неферментирующих грамтрицательных бактерий (НГОБ), биохимические свойства переменны, что делает идентификацию на основании биохимических реакций недостоверной [8].

Элизабеткингии – типичные условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие инфекционный процесс только у иммунокомпрометированных лиц, в частности, у недоношенных новорожденных и пациентов с онкологическими заболеваниями [9]. У новорожденных менингит является наиболее распространённой клинической формой заболевания, вызываемого данным патогеном. Бактериемия и пневмония – другие частые проявления этой инфекции среди пациентов групп риска [10].

Штаммы *E. meningoseptica* природно устойчивы к полимиксинам, аминогликозидам (гентамицину, стрептомицину), хлорамфениколу, большинству β-лактамов антибиотиков, включая пенициллин и ампициллин [11].

Штаммы *E. meningoseptica* продуцируют по меньшей мере три типа β-лактамазы: две карбапенем гидролизующие металло-β-лактамазы класса В (MBL) [12], ассоциированные с резистентностью к азтреонаму и карбапенемам, являющимися важными лекарственными средствами для лечения инфекций, вызванных грамтрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью [13], и неиндуцируемую β-лактамазу с расширенным спектром класса А (ESBL), которая исключает использование для лечения цефалоспоринов с расширенным спектром действия – цефотаксима, цефтазидима, цефепима [14–16].

E. meningoseptica является микроорганизмом, имеющим два хромосомно кодируемых гена MBL. ПЦР в режиме «реального времени» и биохимический анализ демонстрируют, что три гена *bla* активно экспрессируются *in vivo* в виде функциональных β-лактамаз. Наиболее часто выявляются различные аллели *bla_B* и *bla_{GOB}*, отвечающие за синтез металло-β-лактамаз класса В [16].

Идентифицированы так называемые *bla_{CME}* (*S. meningosepticum* ESBL), кодирующие CME серин-β-лактамазы (SBL) класса D, связанные с устойчивостью к цефалоспорином [17, 18].

С помощью ПЦР выявлены детерминанты устойчивости к триметоприм/сульфаметоксазолу; шесть изоля-

тов обладали геном *sullI*, четыре – геном *sullII*, ген *dfrA12* обнаружен только в одном из них [19].

В связи с широким спектром природной множественной антибактериальной устойчивости трудно определить наиболее эффективные АМП для лечения заболеваний, ассоциированных с *E. meningoseptica*. Ранее рекомендовали ванкомицин, особенно в случаях менингита у новорожденных детей, впоследствии его эффективность поставлена под сомнение многими исследователями ввиду высоких минимальных подавляющих концентраций (МПК) препарата для данного патогена [20–22]. Появились сообщения об эффективности сочетанного применения ванкомицина и рифампицина при лечении *E. meningoseptica* инфекции у детей [23].

Отмечены несоответствия в паттернах чувствительности *E. meningoseptica* к АМП при постановке тестов диско-диффузионным методом и методом серийных разведений в бульоне, поэтому определение чувствительности диско-диффузионным методом не рекомендуется [24, 25].

Цель исследования – изучение профиля чувствительности к АМП и дезинфектантам и детекция генов антибиотикорезистентности у трёх изолятов *E. meningoseptica*, выделенных от трёх погибших недоношенных новорожденных детей на территории РФ в период с января по февраль 2016 г.

Материал и методы. Биэтические требования. Исследование не содержит персональных данных пациентов – фамилии, даты рождения, адреса проживания, номера истории болезни и др. В соответствии с требованиями Биэтического комитета Российской Федерации, каждым пациентом при поступлении в клинику заключен договор с лечебным учреждением, содержащий согласие на проведение лечения и лабораторного обследования.

Клинические изоляты, выделение и идентификация. Из одного перинатального центра РФ в период с января по февраль 2016 г. поступили образцы клинического и секционного материала от трёх умерших недоношенных детей с предварительным диагнозом сепсис. Образцы материала высевали на различные питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ. Средой накопления являлся тиогликолевый бульон. Посевы инкубировали в аэробных условиях при температуре 37°C. Выделенные культуры микроскопировали и идентифицировали с помощью автоматической системы MALDI-ToF – Biotyper (Bruker, США).

Определение чувствительности к АМП. Определение чувствительности к АМП у *E. meningoseptica*, с учётом природной полирезистентности проводили двумя методами: с помощью коммерческих наборов SENSILAtest NEFERM, SENSILAtest G-I, SENSILAtest G-II, SENSILAtest G+, SENSILAtest Staphy (ErbaLachema, Чехия) и методом серийных разведения АМП в бульоне с использованием следующих АМП: имипенем, меропенем, гентамицин, офлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, хлорамфеникол, триметоприм, триметоприм/сульфаметоксазол, рифампицин, новобиоцин, линезолид (все препараты, кроме триметоприм/сульфаметоксазола, производства Oxoid, Англия; триметоприм/сульфаметоксазол – коммерческий таблетированный препарат Ко-тримоксазол-Акри (Акрихин, Россия) в дозировке 480 мг (80 мг триметоприма, 400 мг сульфаметоксазола). Первый метод отобран на основании быстроты и удобства осуществления в условиях

базовой микробиологической лабораторий лечебно-профилактических учреждений, используя второй метод, определены МПК в отношении клинических изолятов *E. meningoseptica* для каждого АМП.

Детекция генов антибиотикорезистентности. Детекцию генов β -лактамаз bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{OXA-48} , bla_{NDM} , bla_{VIM} и интеграз класса 1 *intI1* и класса 2 *intI2* осуществляли с помощью ПЦР с электрофоретической детекцией результата [26-31].

Определение чувствительности к дезинфицирующим средствам. Чувствительность бактерий к дезинфектантам изучали на препаратах, относящихся к разным функциональным классам: гуанидины – «Дезин» (ООО «Дезиндустрия», Россия); четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) – «Биодез-Оптим» (ООО «Биодез», Россия), «Лактик-Окси» (ОАО НПО «Новодез», Россия); кислородсодержащие – «Новодез-Актив» (ОАО НПО «Новодез», Россия); на основе окислителей, не выделяющих активный хлор или кислород – «Тристел-Фьюз для поверхностей» («ТристелСолюшенс Лимитед», Великобритания); композитные на основе ЧАС и кислородсодержащих – «Триосепт-Окси» (ООО «НПО СпецСинтез», Россия), «Необак-Окси» (ОАО НПО «Новодез», Россия); композитные на основе ЧАС, альдегидов, гуанидина, спиртов и аминов – «САТ-22» (ООО «Сателлит», Россия), «Микробак-форте» («Боде Хемигмбх и Ко», Германия), «Биодез-Экстра ДВУ» (ООО «Биодез», Россия), «Эффект-форте Плюс» (ООО «Биодез», Россия).

Оценка антибактериальной активности препаратов для планктонных клеток. Пробирки, содержащие 4 мл питательного бульона и двукратные разведения дезсредств, засеивали по 0,02 мл бактериальной культуры в концентрации 10^7 КОЕ/мл, инкубировали при температуре 37°C. Наличие роста бактерий учитывали визуально по наличию мутности в пробирке. Минимальную концентрацию, в которой отсутствовал видимый рост, принимали за МПК. Из пробирки, принятой за МПК, и

из последующих, в которых отсутствовал рост, производили контрольный высеив по 0,1 мл на чашки Петри с плотной питательной средой, не содержащей подавляющего роста добавок, и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Минимальная концентрация, из которой произведён высеив на чашку Петри при отсутствии роста, после дополнительной инкубации в течение 24 ч, принималась за МБК [32].

Оценка антибактериальной активности препаратов для биоплёнок (БП). Чувствительность БП микроорганизмов к изучаемым препаратам определяли методом аппликаторов: поверхность питательного агара, не содержащего АМП, засеивали 0,1 мл суспензии исследуемой тест-культуры в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч, после чего на поверхность газона накладывали стерильный целлюлозный аппликатор (7×7 мм) на 2-3 мин. Аппликатор с отпечатком культуры переносили на поверхность агара в чашки Петри с питательной средой, содержащей серийные разведения дезинфектантов, в ориентации «вниз бактериальным отпечатком». Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 72 часов. За МБК принимали минимальную концентрацию препарата, при которой отсутствовал рост культуры на аппликаторе и вокруг него [32].

Результаты. Выделение и идентификация. Из всех проанализированных образцов от трёх умерших новорожденных детей выделены чистые культуры микроорганизмов, идентифицированные на приборе MALDI-ToF Biotyper как *A. baumannii* и *E. meningoseptica*.

Чувствительность к АМП. Результаты определения чувствительности *E. meningoseptica* к АМП с помощью пяти коммерческих наборов SENSILAtest и микрометодом серийных разведений АМП для определения МПК показывают, что все три изученных штамма имели идентичный профиль чувствительности к АМП (табл. 1-3).

Детекция генов антибиотикорезистентности. В клетках всех трёх изолятов не выявлено генов β -лактамаз

Таблица 1

Чувствительность изолятов *E. meningoseptica* к антимикробным препаратам для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями

SENSILAtestNEFERM			SENSILAtest G-I			SENSILAtest G-II		
АМП	мг/л	R/S/I	АМП	мг/л	R/S/I	АМП	мг/л	R/S/I
Цефтазидим	8	R	Ампициллин	8	R	Пиперациллин / тазобактам	16/4	S
Цефепим	8	R	Ампициллин / сульбактам	8/4	R	Меропенем	2	R
Меропенем	2	R	Цефалексин	16	R	Цефепим	1	R
	4	R	Цефутоксим	8	R	Цефотаксим	4	R
	8	R	Цефотаксим	1	R			
Амикацин	8	R		2	R	Цефтазидим	1	R
	16	R	Колистин	2	R		4	R
Ципрофлоксацин	0,5	R	Ципрофлоксацин	0,5	R	Азтреонам	1	R
Триметоприм / сульфаметоксазол	2/38	S		1	R		4	R
	4/76	S	Триметоприм / сульфаметоксазол	2/38	S	Тигециклин	1	S
Колистин	2	R		4/76	S		2	S
	4	R	Гентамицин	2	R	Нетилмицин	2	R
Пиперациллин / тазобактам	16/4	S		4	R		4	R
Гентамицин	4	R	Амикацин	8	R	Цефтазидим / клавуланат	0,25/4	R
				16	R		1/4	R

Примечание. Здесь и в табл. 2: R - наличие роста (резистентный), S - отсутствие роста (чувствительный), I - наличие слабого роста (промежуточная чувствительность).

Таблица 2

Чувствительность изолятов *E. meningoseptica* к антимикробным препаратам для лечения инфекций, вызванных грамположительными бактериями

SENSILAtest G+			SENSILAtest Staphy		
АМП	мг/л	R/S/I	АМП	мг/л	R/S/I
Хлорамфеникол	8	R	Триметоприм / сульфаметоксазол	2/38	S
Моксифлоксацин	0,5	S	Тигециклин	4/76	S
	1	S	Линезолид	0,5	R
Линезолид	2	I	Линезолид	4	S
	4	S	Эритромицин	1	R
Ампициллин	4	R		2	R
	8	R	Ванкомицин	2	R
Тигециклин	0,25	R	Ципрофлоксацин	1	R
	0,5	I	Цефокситин	4	R
Левифлоксацин	1	S	Фузидиевая кислота	1	S
	2	S	Рифампицин	0,0625	R
Эритромицин	0,25	R		0,5	S
	0,5	R	Клиндамицин	0,25	R
Пенициллин G	0,25	R		0,5	R
	2	R	Гентамицин	1	R
Цефтриаксон	0,5	R			
	1	R			
Тетрациклин	1	R			
	2	R			
Клиндамицин	0,5	I			
Гентамицин	256	S			
Ванкомицин	2	R			
	4	R			

*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, интеграз класса 1 *intI1*, класса 2 *intI2*.

Определение чувствительности к дезинфицирующим средствам. В ходе оценки чувствительности к дезсредствам планктонных клеток и БП изучаемых изолятов *E. meningoseptica* показано, что планктонные клетки *E. meningoseptica* более чувствительны к исследуемым дезсредствам, чем бактериальные клетки тех же штаммов в составе БП. Планктонные клетки *E. meningoseptica* чувствительны ко всем исследуемым дезсредствам, бактериальные клетки того же штамма в составе БП, устойчивы к дезсредствам «Биодез-Экстра ДВУ», «Тристел-Фьюз для Поверхностей», «Необак-Окси» в концентрациях применяемых в клинической практике (табл. 4).

Обсуждение. Для *E. meningoseptica* характерен широкий спектр природной резистентности к АМП различных классов: большинству β-лактамов антибиотиков, включая пенициллин и ампициллин, полимиксином, аминогликозидам, цефалоспорином, амфениколам [9-11, 23]. Это отличает данный патоген от других грамотрицательных бактерий, в том числе группы неферментирующих микроорганизмов. Множественная лекарственная устойчивость *E. meningoseptica* к АМП осложняет выбор эффективных этиотропных средств лечения.

В ходе исследования чувствительности к АМП трёх изолятов *E. meningoseptica* проведён сравнительный анализ результатов, полученных двумя методами: с помощью пяти коммерческих наборов SENSILAtest (ErbaLachema, Чехия) и микрометодом серийных разведений с определением МПК. В обоих случаях все три изолята имели идентичный профиль чувствительности к АМП: резистентны практически ко всем использованным препаратам.

Таблица 3

МПК АМП изолятов *E. meningoseptica*

Антимикробные препараты	Минимальные подавляющие концентрации, мг/л
Имипенем	128
Меропенем	128
Гентамицин	64
Офлоксацин	8
Левифлоксацин	4
Моксифлоксацин	2
Хлорамфеникол	128
Триметоприм	32
Триметоприм/сульфаметоксазол*	4/20
Рифампицин	1
Новобиоцин	32
Линезолид	8

Примечание. * - для постановки теста использован коммерческий таблетированный препарат Ко-тримоксазол-Акри (Акрихин, Россия) в дозировке 480 мг (80 мг триметоприма, 400 мг сульфаметоксазола).

С помощью рекомендованного к использованию для НГОБ коммерческого набора SENSILAtestNEFERM установлено, что изучаемые изоляты *E. meningoseptica* резистентны к подавляющему большинству входящих в набор АМП, кроме триметоприм/сульфаметоксазола и пиперациллин/тазобактама. Использование других наборов SENSILAtest, разработанных для грамположительных бактерий, выявило чувствительность изучаемых изолятов к препаратам, традиционно используе-

Таблица 4

Чувствительность к дезинфектантам планктонных клеток и БП штаммов *E. meningoseptica*

Дезинфектант	Планктонные клетки		Биоплёнка
	МПК, %	МБК, %	МБК, %
Дезин	0,060	0,130	1,00
Биодез-Оптима	0,0040	0,0040	0,020
Лактик-Окси	0,0030	0,0060	0,10
Новодез-Актив	0,0310	0,060	0,50
Тристел-Фьюз	0,130	1,00	8,00
Триосепт-Окси	0,0020	0,0020	0,060
Необак-Окси	0,0050	0,010	0,60
САТ-22	0,0030	0,0060	0,020
Микробак-форте	0,0050	0,010	0,010
Биодез-Экстра ДВУ	0,0040	0,0080	0,30
Эффект-форте Плюс	0,020	0,030	0,0130

мым для лечения инфекций, вызываемых грамположительной микрофлорой: моксифлоксацину, линезолиду (в дозировке >4 мг/л), левофлоксацину, гентамицину (в дозировке >256 мг/л), фузидиевой кислоте, рифампицину (в дозировке >0,5 мг/л). Использование одновременно набора SENSILAtestNEFERM и других наборов для определения чувствительности к АМП позволяет расширить спектр возможных к использованию для терапии *E. meningoseptica* инфекции.

Определение МПК АМП для изолятов *E. meningoseptica* является необходимым этапом для оценки возможности применения АМП в клинической практике. Несмотря на то, что международные критерии оценки чувствительности к АМП для данного микроорганизма отсутствуют, использование экспериментально определённых значений МПК может позволить клиницистам правильно рассчитать дозировку препаратов или их сочетаний для терапии пациентов, учитывая их возраст, клинический диагноз, тяжесть течения заболевания. Определение чувствительности к АМП для *E. meningoseptica* на автоматическом микробиологическом анализаторе Vitek 2-Compact (BioMérieux, Франция) невозможно из-за отсутствия критериев оценки чувствительности в программном обеспечении анализатора.

Поиск широко распространённых среди полирезистентных микроорганизмов генов β-лактамаз (*bla*_{CTX-M2}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}) и интегронов I и 2 классов у выделенных штаммов *E. meningoseptica* не дал положительных результатов.

В ходе исследования чувствительности к дезинфицирующим средствам использован методический подход, позволяющий проводить сравнительный анализ чувствительности микроорганизмов к АМП, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, в планктонном состоянии и для БП. В большинстве случаев БП штамма *E. meningoseptica* проявляла значительно большую устойчивость к дезсредствам, по сравнению с планктонными клетками.

Заключение. Проведённые исследования указывают на необходимость углублённого анализа чувствительности к АМП у представителей госпитальных патогенов, включая моделирование бактериальных БП для оценки реальной чувствительности к антисептикам и дезинфектантам.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы НИР Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-26, 30-31 см. REFERENCES)

27. Прячук С. Д., Фурсова Н. К., Абаев И. В., Ковалёв Ю. Н., Шишкова Н. А., Печерских Е. И. и др. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Esherichia coli*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*, выделенных в России в 2003-2007 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2010; 55(9-10):3-10.

28. Дегушева Е. В., Родин В. Б., Слукин П. В., Ершова О. Н., Александрова И. А., Сазыкина С. Ю. и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(1):57-67.

REFERENCES

1. Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B.P., Paster B.J., Staley J.T. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes, 2nd ed. Springer-Verlag, 2011; 202-10.

2. Ceyhan M., Yildirim I., Tekeli A., Yurdakok M., Us E., Altun B., et al. A *Chryseobacterium meningosepticum* outbreak observed in 3 clusters involving both neonatal and non-neonatal pediatric patients. *Am. J. Infect. Control*. 2008; 36:453-7.

3. Bloch K.C., Nadarajah R., Jacobs R. *Chryseobacterium meningosepticum*: An emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:30-41.

4. Hoque S.N., Graham J., Kaufmann M.E., Tabaqchali S. *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 2001; 47:188-92.

5. Holmes B., Owen R.J., McMeekin T.A. Genus *Flavobacterium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Baltimore, Williams&WilkinsCo. 1984; 353-61.

6. Bruun B., Ursing J. Phenotypic characterisation of *Flavobacterium meningosepticum* strains identified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. B*. 1987; 95(1):41-7.

7. Bernardet J.-F., Vancanneyt M., Matte-Tailliez O., Grizez L., Taillez P., Bizet C. et al. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Syst. Appl. Microbiol.* 2005; 28: 640-60.

8. Tuon F.F., Campon L., Duboc de Almeida G., Gryscek R.C. *Chryseobacterium meningosepticum* as a cause of cellulitis and sepsis in an immunocompetent patient. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56(8): 1116-7.

9. Hsu M.-S., Liao C.-H., Huang Y.-T., Liu C.-Y., Yang C.-J., Kao K.-L. et al. Clinical features, antimicrobial susceptibilities, and outcomes of *Elizabethkingia meningoseptica (Chryseobacterium meningosepticum)* bacteremia at a medical center in Taiwan, 1999-2006. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(10):1271-8.

10. Hawley H.B., Gump D.W. Vancomycin therapy of bacterial meningitis. *Am. J. Dis. Child.* 1973; 126:261-4.

11. Rossolini G.M., Franceschini N., Riccio M.L., Mercuri P.S., Perilli M., Galleni M. et al. Characterization and sequence of the *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* carbapenemase: a new molecular class B beta-lactamase showing a broad substrate profile. *Biochem. J.* 1998; 332:145-52.

12. Ceyhan M., Celik M. *Elizabethkingia meningosepticum (Chryseobacterium meningosepticum)* infections in Children. *Int J Pediatr*. 2011; 215-37.

13. Bellais S., Poire L., Naas T., Girlich D., Nordmann P. Genetic biochemical analysis and distribution of the Ambler class A-lactamase CME-2, responsible for extended spectrum cephalosporin resistance in *Elizabethkingiae (Flavobacterium) meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:1-9.

14. Chen G.X., Zhang R.H., Zhou W. Heterogeneity of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Elizabethkingia meningoseptica* from Hangzhou China. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57:750-2.
15. González L.J., Vila A.J. Carbapenem Resistance in *Elizabethkingia meningoseptica* Is Mediated by Metallo- β -Lactamase BlaB. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(4): 1686-92.
16. Chen G.-X., Zhang R., Zhou H.W. Heterogeneity of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Chryseobacterium meningosepticum* from Hangzhou, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006; 57(4): 750-2.
17. Bellais S., Poirel L., Naas T., Girlich D., Nordmann P. Genetic-biochemical analysis and distribution of the Ambler class A β -lactamase CME-2, responsible for extended-spectrum cephalosporin resistance in *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44:1-9.
18. Rossolini G.M., Franceschini N., Lauretti L., Caravelli B., Riccio M.L., Galleni M. et al. Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (*bla*_{ACME}) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999; 43:2193-9.
19. Jiang X., Wang D., Wang Y., Yan H., Shi L., Zhou L. et al. Occurrence of antimicrobial resistance genes *sul* and *dfpA12* in hospital environmental isolates of *Elizabethkingia meningoseptica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2012; 28(11):3097-102.
20. Lin P.Y., Chen H.L., Huang C.T., Su L.H., Chiu C.H. Biofilm production, use of intravascular indwelling catheters and inappropriate antimicrobial therapy as predictors of fatality in *Chryseobacterium meningosepticum* bacteraemia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 36:436-40.
21. Fraser S.L., Jorgensen J.H. Reappraisal of the antimicrobial susceptibilities of *Chryseobacterium* and *Flavobacterium* species and methods for reliable susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41(12):2738-41.
22. Chang J.C., Hsueh P.R., Wu J.J., Ho S.W., Hsieh W.C., Luh K.T. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium* as determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1997; 41(6):1301-6.
23. Issack M.I., Neetoo Y. An outbreak of *Elizabethkingia meningoseptica* neonatal meningitis in Mauritius. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5(12):834-9.
24. Aber R.C., Wennersten C., Moellering R.C.Jr. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1978; 14: 483-7.
25. Johny M., Khuffash F.A., Elhag K.M. Antimicrobial treatment of *Flavobacterium meningosepticum* infection. *Ann. Trop. Paediatr.* 1983; 3: 125-8.
26. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(12):3724-32.
27. Pryamchuk S.D., Fursova N.K., Abaev I.V., Kovalev Yu.N., Shishkova N.A., Pecherskikh E.I., Korobova O.V. et al. Genetic determinants of antibacterial resistance among nosocomial *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, and *Enterobacter spp.* isolates collected in Russia within 2003-2007. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2010; 55(9-10):3-10. (in Russian)
28. Poirel L., Bonnin R.A., Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(1):559-62.
29. Hujer K.M., Hujer A.M., Hulten E.A., Bajaksouzian S., Adams J.M., Donskey C.J. et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter sp.* isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(12):4114-23.
30. Yang J., Chen Y., Jia X., Luo Y., Song Q., Zhao W. et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(12): E506-513.
31. Machado E., Cantón R., Baquero F., Galán J.C., Rollán A. et al. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(5):1823-9.
32. Detusheva E.V., Rodin V.B., Slukin P.V., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Sazykina S.Yu. et al. Sensitivity of nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Proteus mirabilis* to chlorhexidine-based antiseptic. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2015; 17(1): 57-6. (in Russian)

Поступила 26.03.20
Принята к печати 11.09.20

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КУЗНЕЦОВА М.В., ГИЗАТУЛЛИНА Ю.С., 2021

Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С.

ХАРАКТЕРИСТИКА УРОПАТОГЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ В УСЛОВИЯХ СТАЦИОНАРА

ФГБУ «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН, 614000, г. Пермь, Россия

Цель исследования – оценить генетическое родство культур уропатогенной *E. coli* (UPEC) и определить основные типы *b*-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), встречающиеся среди внутрибольничных изолятов. Проведено молекулярное типирование UPEC ($n=93$), выделенных от пациентов с инфекциями мочевыводящих путей (ИМВП), проходивших стационарное лечение в девяти медицинских организациях (МО) г. Перми. Определено, что 69,89% культур имели индивидуальные RAPD/ERIC-профили, остальные 30,10% распределились в 13 геномогрупп. Чаще всего, в моноварианте или в сочетании с другими генами *b*-лактамаз, детектирован $bla_{CTX-M-1}$ ($n=23$, 79,31% от БЛРС-позитивных по фенотипу изолятов), в 17 случаях (58,62%) выявлены гены bla_{TEM} и/или bla_{OXA} , фрагмент bla_{CMY} обнаружен только у 3 изолятов (10,34%), bla_{SHV} в данной выборке отсутствовал. Возбудителями инфекционного процесса в двух третях ситуаций являются представители эндогенной кишечной микробиоты пациентов, в остальных случаях происходит экзогенное инфицирование. Доля «циркулирующих» (возможно, госпитальных) изолятов в спектре ИМВП нарастала в ряду терапия→хирургия→ОРИТ. В многопрофильных стационарах имеются условия для перекрёстных заражений пациентов, но эпидемиологические цепочки эпизодов ИМВП короткие и непродолжительные. Выявлено, что шанс инфицироваться *E. coli*, продуцирующими CTX-M или OXA ферменты, в ОРИТ существенно выше, чем в хирургии или терапии. Полученные данные дополняют представления об ИМВП, вызванных *E. coli*, и могут служить инструментом в планировании и реализации методов профилактики и контроля нозокомиальных ИМВП.

Ключевые слова: уропатогенная *Escherichia coli* (UPEC); нозокомиальная инфекция; молекулярное типирование; *b*-лактамазы расширенного спектра (БЛРС).

Для цитирования: Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Характеристика уропатогенных изолятов *Escherichia coli*, выделенных в условиях стационара. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (4): 248-256.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-248-256>

Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S.

EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF UROPATOGENIC ISOLATES OF *ESCHERICHIA COLI* IN HOSPITALS

Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences, 614000, Perm, Russia

The aim of the study was to evaluate the genetic affinity of uropathogenic *E. coli* cultures (UPEC) and to identify the major types of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) found among nosocomial isolates. A molecular typing of UPEC ($n=93$) isolated from patients with urinary tract infections (UTI) who were hospitalised in nine medical facilities (MO) in Perm was performed. It was found that 69.89% of the cultures had individual RAPD/ERIC profiles, the remaining 30.10% were distributed among 13 genome groups. Most frequently $bla_{CTX-M-1}$ was detected individually or in combination with other beta-lactamase genes ($n=23$, 79.31% of ESBL phenotype-positive isolates), genes were detected in seventeen cases (58.62%) bla_{TEM} and/or bla_{OXA} , the bla_{CMY} fragment was found in only three isolates (10.34%), bla_{SHV} was missing in this isolates. It was shown that in two thirds of the cases the pathogens of the infection process are representatives of the endogenous intestinal microbiota of the patients, in other cases an exogenous infection occurs. The proportion of “circulating” (possibly hospital) isolates in the spectrum of UTI increased in the series: therapy departments – surgery departments – intensive care units. In addition, in multidisciplinary hospitals there are conditions for cross-infections of patients, but the epidemiological chains of episodes of UTI are short and concise. It has been shown that the probability of infection with *E. coli* producing CTX-M or OXA enzymes is significantly higher in the intensive care unit than in surgery or therapy departments. The data obtained complement the understanding of the epidemiology of UTI caused by *E. coli* and can be used as an aid in the planning and implementation of methods for the prevention and control of nosocomial UTI.

Key words: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC); nosocomial infection; molecular typing; extended-spectrum beta-lactamases (ESBL).

For citation: Kuznetsova M.V., Gizatullina J.S. Epidemiological characteristics of uropathogenic isolates of *Escherichia coli* in hospitals. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2021; 66 (4): 248-256 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-248-256>

For correspondence: Kuznetsova M.V., Dr. Sci. Med., lead researcher of the laboratory of molecular microbiology and biotechnology; e-mail: mar19719@yandex.ru

Information about authors:

Kuznetsova M. V., <https://orcid.org/0000-0003-2448-4823>;

Gizatullina J. S., <https://orcid.org/0000-0001-9625-1151>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *This work was fulfilled under the State assignment (AAAA-A19-119112290009-1).*

Received 15.07.2020
Accepted 27.08.2020

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) являются распространёнными заболеваниями в мире и, согласно оценкам экспертов, составляют до 40% всех инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [1-3]. По данным российского многоцентрового обсервационного исследования одного дня ЭРГИНИ (2013 г.), в структуре ИСМП они занимают второе место и составляют 19% [4]. В большинстве случаев в условиях стационара ИМВП регистрируют после оперативных вмешательств, инвазивных лечебных и диагностических процедур [2, 5-7]. Возбудителями инфекционного процесса часто являются представители эндогенной кишечной микробиоты пациентов, но, в ряде случаев, источником может выступать больничная среда и/или медицинский персонал [3, 8]. Оценка принадлежности изолируемого штамма к госпитальному играет важную роль для принятия решений по проведению эффективных противоэпидемических мероприятий в отделении и для выбора оптимального подхода к лечению пациента [9]. Госпитальные патогены имеют более высокую устойчивость к антимикробным препаратам (АМП) и/или большее разнообразие факторов вирулентности, чем представители аутомикробиоты пациентов, но в последнее время появляется все больше данных, ставящих под сомнение это положение [10, 11].

Ведущая роль в развитии ИМВП отводится уропатогенной *Escherichia coli* (UPEC), изолируемой как в монокультуре, так и в составе ассоциаций [12, 13]. В зависимости от нозологической формы инфекции доля UPEC может составлять от 30% до 85% [14-16]. В последние годы резистентность *E. coli* к б-лактамам антибиотикам значительно увеличилась, и эта тенденция характерна как для госпитальных, так и для внебольничных возбудителей ИМВП [17, 18]. Одним из основных механизмов устойчивости *E. coli* к данной группе АМП является продукция б-лактамаз – ферментов, способных расщеплять б-лактамное кольцо антибиотика. б-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), гидролизующие оксимино-β-лактамы (цефалоспорины широкого спектра действия и азтреонам), чаще всего кодируются генами, расположенными на плазмидах, что является серьёзной проблемой с эпидемиологической точки зрения. Продукты БЛРС могут проявлять сочетанную устойчивость к триметоприму/сульфаметоксазолу, аминогликозидам, фторхинолонам [19]. У штаммов UPEC наиболее распространёнными типами БЛРС являются СТХ-М, ТЕМ, SHV, ОХА [20]. Наличие у возбудителей генов данных ферментов может существенно затруднить лечение пациента и повлиять на исход инфекционного процесса [21, 22].

Ранее в сравнительном аспекте нами изучены филогенетическое разнообразие и чувствительность к АМП штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с ИМВП, проходивших лечение в поликлиниках и стационарах [23]. Если среди поликлинических изолятов обнару-

жены представители всех распознаваемых филогрупп, то почти 90% госпитальных культур принадлежали к филогруппе В2 и в большом проценте случаев продуцировали БЛРС. Сделано предположение, что в условиях стационара с высокой частотой происходит экзогенное инфицирование пациентов госпитальными штаммами UPEC.

Цель исследования – проанализировать генетическое родство UPEC, изолированных от пациентов с нозокомиальными ИМВП, оценить долю эндогенного и экзогенного инфицирования, определить основные типы БЛРС, встречающиеся среди госпитальных штаммов.

Материал и методы. Объектами изучения служили клинические изоляты *E. coli* ($n=93$), выделенные из материала (моча, катетеры) пациентов с ИМВП, находившихся на стационарном лечении (9 медицинских организаций, 23 отделения) в г. Перми в 2017 г. При анализе результатов учитывали специализацию отделений: отделения неотложной медицинской помощи (реанимации и интенсивной терапии, (ОРИТ), $n=5$), отделения хирургического (общая хирургия, урологическое, гинекологическое, отделение диализа, $n=7$) и терапевтического (терапевтическое, неврологическое, эндокринологическое, нефрологическое, педиатрическое, реабилитационное, $n=11$) профиля.

Генетическое типирование культур осуществляли в системе двойного контроля посредством RAPD-ПЦР с праймером M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT) и реп-ПЦР с праймерами ERIC1R/ERIC2 (5'-САСТТАGGGGTCCCTCGAATGТА/5'-AAGТАAGTGACTGGGTGAGCG), используя соответствующие режимы реакции [24, 25]. Амплификацию проводили на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы геледокументации Gel-Doc XR («Bio-Rad», США). Анализ генетического родства штаммов проводили с применением компьютерного обеспечения Quantity One (версия 4.6.1, Bio-Rad Laboratories, США).

Чувствительность к АМП определяли диско-диффузионным методом (МАКМАХ, версия-2015-02). Продукцию БЛРС детектировали с помощью метода «двойных дисков», согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04.

Присутствие генов *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY} кодирующих наиболее распространённые типы БЛРС, определяли методом ПЦР, используя праймеры (ООО «Евроген», Москва) и протоколы, согласно рекомендациям авторов (табл. 1). Наличие интегров 1 класса проверяли с помощью праймеров 5'CS/3'CS, комплементарных консервативным сегментам интегона. Амплификацию, визуализацию полос, документирование данных осуществляли аналогично вышесказанному.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA v.10.

Праймеры для детекции генов β -лактамаз и интегров I класса

Ген	Праймер	Последовательность	Вес, п.н.	Ссылка	
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-C	5'-ATCAGCAATAAACCCAGC-3'	516	[26]	
	TEM-H	5'-CCCCGAAGAACGTTTTTC-3'			
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	5'-AGGATTGACTGCCTTTTTG-3'	392		
	SHV-R	5'-ATTTGCTGATTCGCTCG-3'			
<i>bla</i> _{OXA}	OXA-F	5'-ATATCTCTACTGTTGCATCTCC-3'	619		
	OXA-R	5'-AAACCCTTCAAACCATCC-3'			
<i>bla</i> _{CTX-M} унив.	CTX-M-F	5'-CGCTTTCGCGATGTGCAG-3'	551		[27]
	CTX-M-R	5'-ACCCGATATCGTTGGT-3'			
<i>bla</i> _{CTX-M} group I ^a	CTX-M-I-F	5'-GACGATGTCCTGGCTGAGC-3'	499		
	CTX-M-I-R	5'-AGCCGCCGACGCTAATACA-3'			
<i>bla</i> _{CTX-M} group II ^b	CTX-M-II-F	5'-GCGACCTGGTAACTACAATCC-3'	351		
	CTX-M-II-R	5'-CGGTAGTATTGCCCTTAAGCC-3'			
<i>bla</i> _{CTX-M} group III ^c	CTX-M-III-F	5'-CGCTTTCGCATGTGCAGCACC-3'	307	[28]	
	CTX-M-III-R	5'-GCTCAGTACGATCGAGCC-3'			
<i>bla</i> _{CTX-M} group IV ^d	CTX-M-IV-F	5'-GCTGGAGAAAAGCAGCGGAG-3'	474		
	CTX-M-IV-R	5'-GTAAGCTGACGCAACGTCTG-3'			
<i>bla</i> _{CTX-M} group V ^e	CTX-M-V-F	5'-GCACGATGACATTCGGG-3'	327		
	CTX-M-V-R	5'-AACCCACGATGTGGGTAGC-3'			
<i>bla</i> _{CMY}	CMY-2-F	5'-GCAGGCYATTCGGGTATG-3'	915	[29]	
	CMY-2-R	5'-GCYACGTAGCTGCCAAAYCC-3'			
Интегроны I класса	5'CS	5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3'	-*	[30]	
	3'CS	5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'			

Примечание. * продукт амплификации может быть представлен несколькими последовательностями разного размера; ^aCTX-M-1, -3, -10 до -12, -15, -22, -23, -28, -29, -30; ^bCTX-M-2, -4 до -7, -20; ^cCTX-M-8; ^dCTX-M-9, -13, -14, -16 до -19, -21, -27; ^eCTX-M-25 и -26.

Для выявления статистически значимых различий определяли χ^2 (с поправкой Йейтса) или точный критерий Фишера (*F*-test). Для оценки значимости признака вычисляли отношение шансов (OR) с определением 95%-го доверительного интервала.

Результаты. Проведено молекулярное типирование культур УРЕС, выделенных от пациентов, проходивших стационарное лечение в медицинских организациях (МО) г. Перми. Определено, что 65 изолятов (69,89%) имели индивидуальные RAPD/ERIC-профили, остальные 28 культур (30,10%) распределились в 13 геномогрупп (рис. 1).

В большинстве хирургических и соматических отделений возбудители ИМВП имели гетерогенный характер. Из 6 отделений, в том числе терапевтических, получены изоляты, выделенные от разных пациентов, но с идентичными RAPD-профилями. В МО № 8, откуда поступали как уринарные, так и катетер-ассоциированные культуры *E. coli*, большая часть изолятов имела схожий генотип в пределах отделения, а индивидуальные геномварианты представлены несколькими штаммами. В двух других многопрофильных стационарах обнаружены генотипически сходные культуры из разных подразделений. В обоих случаях циркуляция штаммов происходила между хирургией и терапией. Для МО № 2 короткие эпидемиологические цепочки (урология-нефрология; урология-диализ) прослеживались 4 раза. Что касается периода циркуляции штамма, то в основном он ограничивался 2-5 сут, и только в 4 случаях продолжительность персистенции была в пределах 10-20 дней. В 5 отделениях отмечены единичные случаи выделения УРЕС, в исследовании данные штаммы (*n*=5) включены в группу с индивидуальным геномпрофилем.

Для дальнейшего анализа выделены две группы сравнения: изоляты (*n*=65), имеющие уникальный генетический профиль, обозначены как «индивидуальные», вторую группу – «циркулирующие», составили изоляты (*n*=28), попавшие в одну из геномогрупп. Такое распределение соответствует случаям ИМВП, вызванным индигенными либо экзогенными штаммами *E. coli*. Госпитальные культуры *E. coli* в 100% случаев принадлежали к филогруппе B2, индивидуальные – в 75,39%. УРЕС «циркулирующей» группы чаще обнаруживались в ОРИТ, чем в отделениях хирургического (статистически недостоверно) или терапевтического (*F*-test: *p*=0,0051) профилей. Их доля в структуре ИМВП пациентов ОРИТ была больше по сравнению с индивидуальными культурами: 54,55% против 45,45%. В хирургии экзогенное происхождение изолята констатировали у 1/3 пациентов, в терапевтических отделениях – не более, чем в 20% случаях (рис. 2).

Ранее проведенное фенотипическое исследование показало, что среди 93 изученных госпитальных изолятов УРЕС фенотип продукции БЛРС имели 29 (31,18%) культур [23]. В анализ по встречаемости и генетическому разнообразию БЛРС взяты все изоляты без учета их уникальности, так как задачи исследования предполагали оценку инфицированности пациентов БЛРС-продуцирующими *E. coli* и выявление особенностей их циркуляции в различных отделениях МО.

Чаще всего (*n*=23), в моноварианте или в сочетании с другими генами β -лактамаз, детектирован *bla*_{CTX-M} (79,31% от БЛРС-позитивных по фенотипу; 24,73% от всех УРЕС), у 17 культур (58,62% и 18,28%) выявлены гены *bla*_{TEM} и/или *bla*_{OXA}, фрагмент *bla*_{CMY} обнаружен только в 3 случаях (10,34% и 3,23%), *bla*_{SHV} в данной вы-

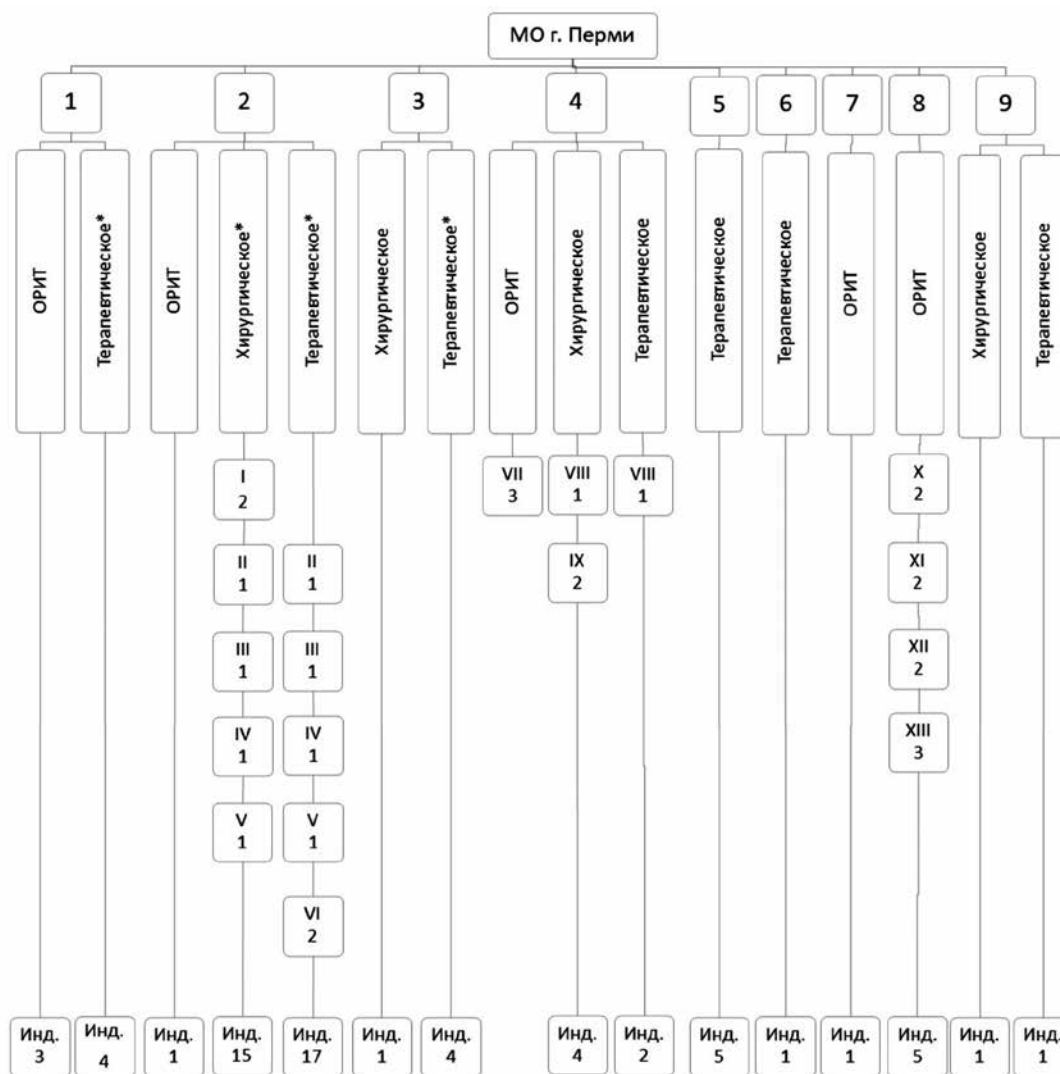


Рис. 1. Генетическое разнообразие изолятов UPEC, выделенных от пациентов с ИМВП, проходивших лечение в стационарах г. Перми.

* объединены отделения разных специализаций, инд. – индивидуальный генопрофиль, I-XIII – номера геномогрупп.

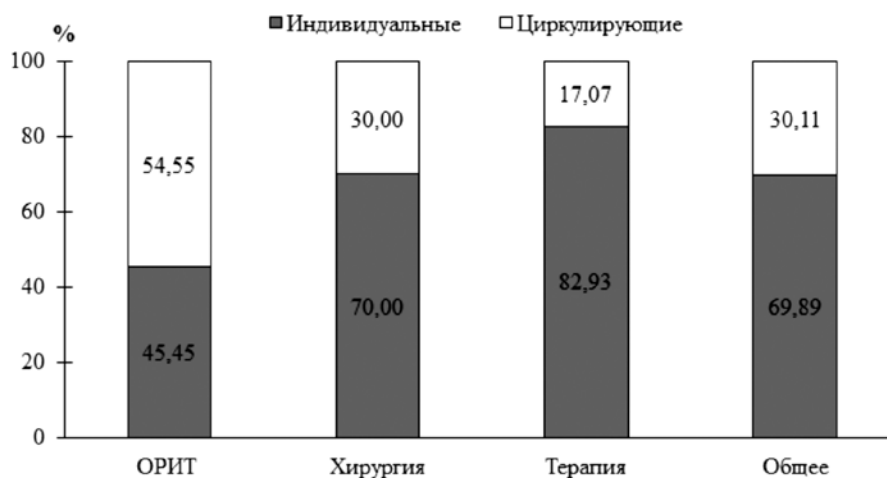


Рис. 2. Доля случаев ИМВП, вызванных «индивидуальными» и «циркулирующими» изолятами у пациентов ОРИТ, хирургических и терапевтических отделений (объединены соответствующие отделения всех МО).

Таблица 2

Встречаемость БЛРС-генов и интегров 1 класса у госпитальных изолятов УРЕС с учётом профиля отделения

БЛРС-генотип, интегрон	Число штаммов, <i>n</i>			
	ОРИТ (<i>n</i> =22)	Хирургия (<i>n</i> =31)	Терапия (<i>n</i> =40)	Общее (<i>n</i> =93)
<i>bla</i> _{TEM}	0	0	2	2
<i>bla</i> _{CTX-M}	2	1	0	3
<i>bla</i> _{OXA}	0	1	0	1
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M}	1	1	1	3
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	3	2	0	5
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA}	3	2	4	9
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{CMY}	1	0	0	1
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>bla</i> _{OXA} + <i>bla</i> _{CMY}	2	0	0	2
БЛРС-позитивный генотип	12	7	7	26
Неизвестный генотип	1	2	0	3
БЛРС-позитивный фенотип	13	9	7	29
Интегроны 1 класса	10	6	5	21

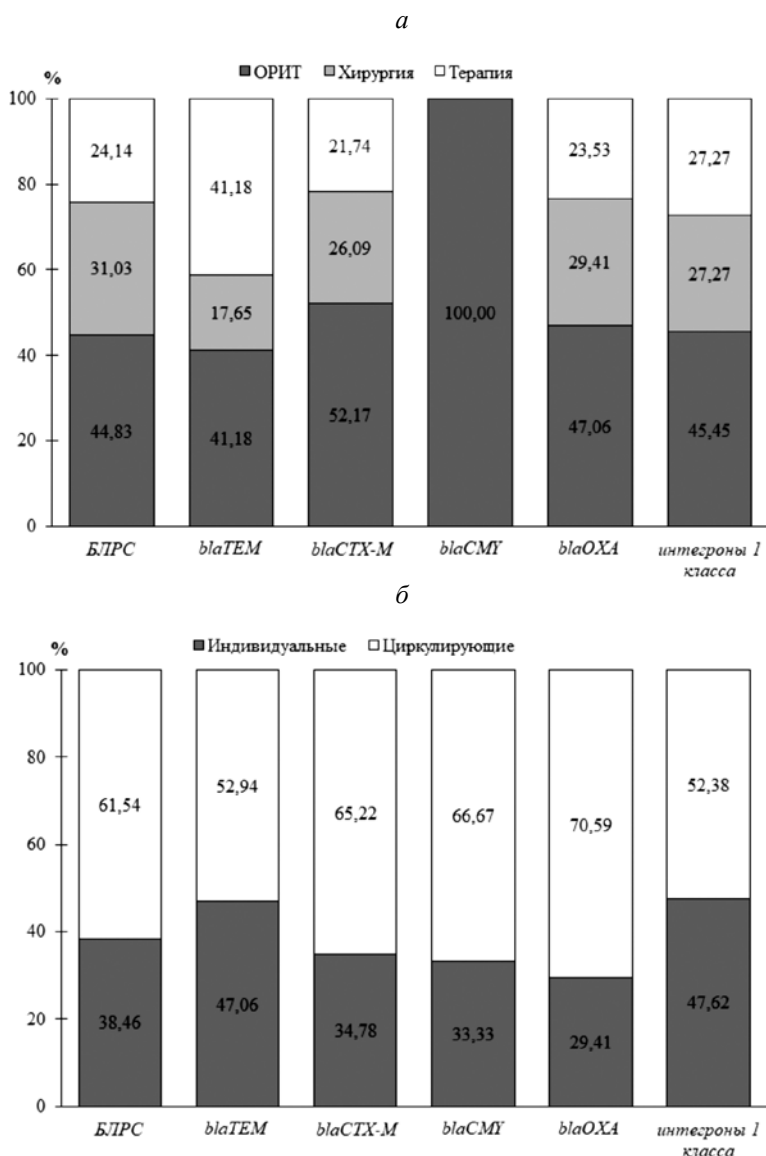


Рис. 3. Распределение БЛРС-продуцирующих нозокомиальных изолятов, выделенных от пациентов ОРИТ, хирургических и терапевтических отделений (объединены соответствующие отделения всех МО) (а); с учетом источника происхождения (б).

борке отсутствовал. В моноварианте любой из представленных генов встречался у 6 изолятов (20,69% и 6,45%), 8 культур (27,59% и 8,60%) имели 2 гена, десять культур (34,48% и 9,68%) – 3 гена, 2 культуры (6,90% и 2,15%) – 4 гена одновременно. Самый распространённым генотипом оказался вариант *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA}, который встречался у 9 (31,04% и 9,68%) УРЕС. Анализ выборки СТХ⁺ изолятов с использованием специфичных праймеров выявил наличие представителей только 1 группы. Фрагменты исследуемых генов не обнаружены у 3 фенотипически БЛРС-позитивных изолятов, что, по-видимому, может быть связано с наличием у них других специфических редких генов БЛРС, таких как, *bla*_{VEB} [31], *bla*_{GES} и др., не определяемых в данном исследовании. Участки интегров 1 класса с молекулярным весом от 800 п.н. до 1250 п.н. выявлены у двадцати одного изолята (72,41% и 22,58%). Все варианты БЛРС-генотипов и интегроны, обнаруженные у госпитальных УРЕС, представлены в табл. 2.

Распределение изолятов показало, что почти половина из них выделена от пациентов ОРИТ, чуть больше 1/3 – из хирургии, на терапию пришлось только четверть всех культур (рис. 3, а). БЛРС-продуцирующие изоляты достоверно чаще встречались в ОРИТ, чем в хирургии (*F*-test: *p*=0,0179) или терапии (*F*-test: *p*=0,0033). При качественном анализе генетических детерминант оказалось, что *E. coli* с *bla*_{TEM} в равной степени выделены от пациентов терапевтических отделений и ОРИТ, тогда как носители *bla*_{CTX-M} и *bla*_{OXA} представлены, в основном, культурами из ОРИТ или хирургии. Ген CMY встречался только у изолятов, выделенных от пациентов с ИМВП в ОРИТ. Участки интегров 1 класса чаще обнаруживались у изолятов из ОРИТ, чем из хирургии (*F*-test: *p*=0,0216) или терапии (*F*-test: *p*=0,0110).

Анализ генетического разнообразия БЛРС, встречающихся в разных по происхождению группах УРЕС, показал, что количественный и качественный состав генетических детерминант в субпопуляциях различался. В группе

«циркулирующих» культур БЛРС-продуцирующие изоляты (согласно генотипу) составили 57,14% – 16 из 28 изолятов, среди «индивидуальных» штаммов – 15,38% (10 из 65), различия статистически достоверны (F -test: $p=0,00001$). Несмотря на то, что число культур в «циркулирующей» группе в 2,3 раза меньше, чем в «индивидуальной», их доля среди БЛРС-продуцирующих изолятов больше (61,54% и 38,46% соответственно) (рис. 3, б). Среди «циркулирующей» группы самым распространённым типом БЛРС был СТХ-М фермент (93,75% БЛРС-положительных изолятов и 53,57% от всех «циркулирующих» изолятов), следующим – ОХА (75,0% и 42,86%), ТЕМ встречался в 56,25% и 32,14%, СМУ – в 12,5% и 7,14% соответственно. Во второй группе с одинаковой частотой 61,54% от БЛРС-положительных и 12,31% от общего числа встречались типы СТХ-М и ТЕМ, фермент ОХА обнаружен у 38,46% и 7,69% изолятов, СМУ – у 7,69% и 1,54% соответственно. Интегроны детектированы у 39,29% «циркулирующих» культур, у «индивидуальных» – в 16,92% (F -test: $p=0,0216$). Сравнение доли носителей генов БЛРС от общего числа изолятов в группе показало, что у «циркулирующих» чаще, чем у «индивидуальных» могут быть обнаружены $bla_{\text{СТХ-М}}$ (F -test: $p=0,0001$), $bla_{\text{ТЕМ}}$ (F -test: $p=0,0322$), $bla_{\text{ОХА}}$ (F -test: $p=0,0002$).

Анализ частоты встречаемости продуцентов БЛРС по отделениям показал, что в ОРИТ шанс инфицирования *E. coli*, продуцирующей СТХ-М фермент, в 5,5 раз выше, чем в хирургии (OR=5,556), и почти в 10 раз выше по сравнению с терапевтическим отделением (OR=9,600). БЛРС ОХА типа чаще обнаруживался у *E. coli*, изолированных от пациентов ОРИТ, чем хирургии и терапии (OR=3,200 и OR=5,629). Изоляты *E. coli* из ОРИТ с большей частотой имели интегроны I класса в отличие от изолятов, выделенных в хирургических или терапевтических отделениях МО (OR=3,788 и OR=5,303).

Обсуждение. По данным международных и российских исследований, за последние годы удельный вес *E. coli* в этиологии нозокомиальных ИМВП несколько снизился, тем не менее, он стабильно составляет 30–50% [4, 16, 32]. Различия в представительстве возбудителя могут быть связаны, в том числе, с профилизацией стационаров (ОРИТ, урология, хирургия, соматические отделения), в которых проводилось исследование, с нозологической структурой ИМВП. Ранее нами изучены филогенетическое разнообразие и биологические свойства штаммов УРЕС, выделенных от у амбулаторных и стационарных пациентов. Получены результаты, указывающие на возможность концентрирования в стационаре в условиях иммунокомпрометированного хозяина представителей филогруппы В2 с высоким вирулентным потенциалом [4]. Продолжением работы является настоящее исследование, в котором предполагается оценить уровень экзогенного и эндогенного инфицирования пациентов с ИМВП *E. coli* в различных по профилю стационарах (отделениях), а также определить частоту встречаемости и доминирующие типы БЛРС среди госпитальных изолятов УРЕС.

Молекулярно-генетические методы широко используются для субвидового типирования и анализа родства (клональности) выделенных изолятов микроорганизмов, что особенно важно при проведении эпидемиологических исследований. ПЦР методы, основанные на амплификации повторяющихся последовательностей (RAPD-ПЦР, Rep-ПЦР и др.), могут быть

выполнены как с единственной последовательностью, так и с двумя праймерами. При RAPD-ПЦР (Random Amplified Polymorphic DNA) используются короткие произвольные последовательности (чаще всего консенсусный праймер M13), которые гибридизуются с ДНК-мишенью при низкой температуре отжига [25]. ERIC-ПЦР (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences) позволяет амплифицировать энтеробактериальные повторяющиеся внутригенные последовательности, впервые описанные у представителей семейства *Enterobacteriaceae* [24]. Показана высокая разрешающая способность данного метода при дифференцировке госпитальных изолятов *E. coli*, выделенных из различного клинического материала пациентов [33, 34]. Он успешно применяется для молекулярного типирования штаммов, выделенных от пациентов с ИСМП [35]. Оценив ERIC-типирование в отношении *E. coli*, сделан вывод, что в случае большого количества образцов из разных источников для определения сходства изолятов следует использовать более одного метода [36]. Методы ERIC-ПЦР и RAPD-ПЦР с праймером M13 в качестве арбитражного успешно задействованы для оценки распространённости циркулирующих в российских стационарах штаммов *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих b-лактамазы СТХ типа [37]. В нашем исследовании на основании ERIC- и RAPD-генотипов УРЕС выявлено, что большинство изолятов, возбудителей ИМВП у пациентов хирургических и терапевтических отделений, имели уникальный генетический профиль, то есть с большой долей вероятности были эндогенного происхождения. Результаты согласуются с данными ряда исследований, в которых представлено высокое генетическое разнообразие УРЕС, изолированных от пациентов стационаров, что указывает на низкий уровень инфицирования госпитальными штаммами [33, 35]. Катеризация мочевыводящих путей является наиболее значимым предиктором возникновения ИСМП [7]. Доля экзогенного инфицирования может составлять более 30% при катетер-ассоциированных ИМВП в результате перекрёстной передачи микроорганизмов через руки медицинского персонала [8]. Если обнаружение *Serratia marcescens* и *Pseudomonas cepacia* практически всегда свидетельствует о том, что они получены из экзогенного источника, поскольку обычно эти микроорганизмы не являются частью постоянной кишечной микробиоты [38], то в отношении *E. coli*, напротив, эта ситуация редкая. Случаи внутрибольничного инфицирования пациентов, вызванные *E. coli*, продемонстрированы в работе Асланова Б.И. и соавт. [39]. Авторы констатировали, что в стационаре имеются условия для перекрёстных заражений урологических пациентов различными штаммами микроорганизмов через медицинский инструментарий и руки персонала при проведении диагностических и лечебных процедур [39]. Учитывая, что в установке катетера нуждаются чаще всего пациенты ОРИТ, уровень экзогенного инфицирования в них может быть более высоким, чем в других отделениях МО. Наши данные согласуются с этим положением: во-первых, доля «циркулирующих» культур в спектре ИМВП нарастала в ряду терапия→хирургия→ОРИТ, и в последнем случае их количество превалировало по сравнению с индивидуальными штаммами. Во-вторых, из 20 изолятов, выделенных с поверхности катетеров, 12 (60%) отнесены к «циркулирующей» группе. Следует отметить факт обнаружения близкородственных изолятов у пациентов

разных отделений многопрофильных стационаров, что указывает на циркуляцию возбудителя в замкнутом контуре «урология-нефрология-отделение диализа». Можно полагать, что инфицирование людей в этих отделениях происходит, в том числе и госпитальными штаммами, через медицинский персонал или диагностическое/лечебное оборудование. Представленная оценка принадлежности изолируемого штамма к госпитальному не бесспорна, так как культуры от медицинского персонала или объектов внутрибольничной среды не исследованы.

Лечение ИМВП становится более сложным из-за широкого распространения штаммов уропатогенных микроорганизмов с различными механизмами устойчивости к АМП [40, 41]. Ферментная инактивация АМП является одним из наиболее значимых механизмов резистентности *E. coli* [42, 43]. Среди госпитальных культур широко распространены такие БЛРС, как цефотаксимаза (СТХ-М), оксациллиназа (ОХА), β -лактамазы AmpC типа, хотя преобладающий тип может отличаться в разных регионах [9, 19, 20, 22, 27]. Количество случаев ИМВП, вызванных БЛРС-продуцирующими *E. coli*, постоянно увеличивается. В нашем исследовании мы проанализировали встречаемость генов, связанных с устойчивостью бактерий к β -лактамам АМП, принадлежащим к пяти различным типам β -лактамаз: TEM, SHV, CTX-M (класс A), OXA (класс D), CMY-2, отнесённому к небольшому семейству плазмид-опосредованных AmpC-подобных ферментов. Анализ результатов детекции фрагментов генов показал, что генотип продукции БЛРС имели чуть менее 30% изолятов УРЕС, при этом большинство из них обладали более чем одним *bla*-геном. Всего обнаружены 8 различных паттернов генотипов БЛРС среди исследованных госпитальных УРЕС. Тип CTX-M наиболее распространён – его ген несли около 80% БЛРС-позитивных изолятов, в том числе, в пяти комбинациях с другими генами, что составило почти 25% всех госпитальных УРЕС. Около 18% штаммов продуцировали β -лактамазы TEM и OXA типа, *bla*_{CMY} детектировали менее чем у 5% культур. Распространённость штаммов, экспрессирующих БЛРС фенотип, варьируется в разных географических регионах. По данным ранее проведенных многоцентровых российских исследований, в 1997-98 гг. выявлено 15,8% госпитальных изолятов *E. coli* с фенотипом БЛРС, в 2006-2008 гг. их доля возросла до 76,6% и стабильно поддерживается на этом уровне [19, 37]. Оба исследования проведены в ОРИТ медицинских организаций, и изучались культуры *E. coli*, изолированные при различных формах ИСМП. В Европе распространённость БЛРС-продуцентов, в том числе и среди УРЕС, существенно ниже. В многоцентровом исследовании (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial, T.E.S.T.), проведённом в 2004-2010 гг. в 42 центрах Восточной Европы, БЛРС-позитивные изоляты *E. coli* зафиксированы во всех странах, участвовавших в проекте, их доля, в среднем, составила 15% [43]. В ретроспективном исследовании, проведённом в лаборатории мочевых инфекций клинического центра университета Сараево (Босния и Герцеговина) в период 2018 г., показано, что БЛРС культуры из общего числа изолятов *E. coli* составили только 6,8% [32]. Изучив распределение культур, продуцирующих β -лактамазы, в различных по профилю отделениях, авторы констатируют наибольшую их распространённость в нефрологии и детских отделениях: 15,2% и 12,7% изолятов соответственно. Среди многих вариантов β -лактамаз CTX-M, о

встречаемости которых в УРЕС неоднократно сообщалось, *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{CTX-M-14} ферменты из групп CTX-M-1 и CTX-M-9, соответственно, наиболее часто идентифицируются в мире, что определяется их эффективной передачей с различными генетическими элементами [28, 42, 43]. При анализе 120 культур УРЕС, продуцирующих БЛРС, изолированных от длительно госпитализированных пациентов в больнице Университета Сучжоу (Китай), показано, что гены ферментов CTX-M, TEM, SHV, OXA идентифицированы в 90,8%, 40,0%, 10,8% и 10,0% случаях соответственно, большинство изолятов обладали более чем одним геном БЛРС, всего идентифицировано 9 различных паттернов генотипа БЛРС [20]. В исследовании, проведённом в пяти больницах общего профиля в 2012-13 гг., 96,9% БЛРС-продуцирующих изолятов несли *bla*_{CTX-M} и 84,6% – *bla*_{TEM} [28]. Распространённость CTX-M (93,94%) среди *bla*-позитивных УРЕС показана в работе A. Alqasim и соавт. [44], проанализировавших образцы мочи пациентов, госпитализированных в третичный центр здравоохранения в Эр-Рияде (Саудовская Аравия), CTX-M-15 обнаружен у всех изолятов, несущих CTX-M ген [44].

Полученные нами результаты по целому ряду позиций совпадают с общемировыми и российскими наблюдениями, характеризующими распространённость и уровень антибиотикочувствительности *E. coli*, выделенной при нозокомиальной ИМВП. Молекулярное типирование изолятов УРЕС показало, что возбудители имели гетерогенный генетический профиль, что свидетельствует о преимущественно эндогенном характере инфицирования мочевыводящих путей пациентов с различной первичной патологией. «Циркулирующие» культуры практически все принадлежат к филогруппе B2 и чаще продуцируют БЛРС, чем «индивидуальные» штаммы. В первой группе БЛРС-продуцирующие изоляты составили почти 60%, тогда как среди «индивидуальных» штаммов таких оказалось 20%, последнее может свидетельствовать об увеличении антибиотикоустойчивости аутомикробиоты. Среди многих типов БЛРС наиболее часто распространены CTX-M ферменты (CTX-M-1 группы), что определяется их эффективной передачей с различными генетическими элементами.

Заключение. Определение встречаемости эпидемически значимых госпитальных штаммов микроорганизмов, мониторинг их резервуаров и механизмов передачи является императивом, ограничивающим распространение резистентности и обеспечивающим сохранение эффективности применения АМП в МО. Поскольку у представителей семейства *Enterobacteriaceae* наличие гена *bla*_{CTX-M} свидетельствует о высоком эпидемическом потенциале и коррелирует с множественной устойчивостью к АМП, при мониторинге возбудителей ИСМП желательно проводить скрининг на продукцию БЛРС CTX-M типа.

Возбудителями инфекционного процесса в 2/3 случаев являются представители эндогенной кишечной микробиоты самих пациентов, в остальных случаях происходит экзогенное инфицирование. В различных отделениях МО, в первую очередь ОРИТ, формируется специфическая среда, определяющая степень эндогенного и экзогенного инфицирования, распространённость антибиотикоустойчивых штаммов УРЕС, продуцирующих БЛРС, что связано с особенностями контингента больных, набором лекарственных средств и методов лечебного пособия. В отделениях ОРИТ, часто

при катетеризации, с высокой вероятностью происходит инфицирование «циркулирующими» (возможно, госпитальными) резистентными штаммами. В многопрофильных стационарах имеются условия для перекрестных заражений пациентов, хотя эпидемиологические цепочки эпизодов ИМВП с участием госпитальных штаммов короткие и непродолжительные. Шанс инфицироваться *E. coli*, продуцирующей СТХ-М или ОХА ферменты, в ОРИТ существенно выше, чем в хирургии или терапии. Полученные данные дополняют представления об эпидемиологии ИМВП, вызванных *E. coli*. Они могут служить инструментом в планировании и реализации методов профилактики и контроля ИМВП, иметь решающее значение в руководстве эмпирического лечения ИМВП в регионе.

Финансирование. Работа выполнена по Государственному заданию (АААА-А19-119112290009-1).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5-8, 10-18, 20-22, 24-38, 40-44 см. REFERENCES)

1. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишена О.В. и др. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям. Н. Новгород: Ремедиум Приволжье; 2012.
2. Яковлев С.В., Суворова М.П. Нозокомиальные инфекции мочевыводящих путей. *Урология*. 2016; 3: 45-64.
4. Яковлев С.В., Суворова М.П., Белобородов В.Б., Басин Е.Е., Елисеева Е.В., Ковеленов С.В. и др. Распространенность и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование ЭРГИНИ. *Антибиотики и химиотерапия*. 2016; 61(5-6): 33-42.
9. Гриценко В.А., Шагинян И.А. Нозокомиальные инфекции: 1. Известные и новые подходы к классификации. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2013; 4: 1-17.
19. Рябкова Е.Л., Иванчик Н.В., Сухорукова М.В., Щедников А.Г., Решедько Г.К., Туркутюков В.Б. и др. Резистентность нозокомиальных штаммов в стационарах России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2009; 11(2): 161-9.
23. Кузнецова М.В., Проворова С.В., Кубарев О.Г., Юдин Д.С., Каримова Н.В., Баяндина Н.В. и др. Сравнительная характеристика штаммов уропатогенной *Escherichia coli*, выделенных в условиях поликлиники и стационара. *Урология*. 2018; 6: 37-44.
39. Асланов Б.И., Долгий А.А., Гончаров А.Е., Архангельский А.И. Эпидемиологические особенности формирования патогенных свойств *E. coli* в урологическом стационаре. *Профилактическая и клиническая медицина*. 2012; 1(42): 117-21.

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishena O.V. et al. National concept for the prevention of infections associated with the provision of medical care and information material on its provisions. Nizhny Novgorod: Remedium Privolzh'e; 2012. (in Russian)
2. Yakovlev S.V., Suvorova M.P. Nosocomial urinary tract infections. *Urologiya*. 2016; 3: 45-64. (in Russian)
3. Iacovelli V., Gaziev G., Topazzi L., Bove P., Vespasiani G., Finazzi Agrò E. Nosocomial urinary tract infections: A review. *Urologiya*. 2014; 81(4): 222-7. doi: 10.5301/uro.5000092. Epub 2014 Nov 12. Review.
4. Yakovlev S.V., Suvorova M.P., Beloborodov V.B., Basin E.E., Eliseeva E.V., Kovelonov S.V. et al. The prevalence and clinical significance of nosocomial infections in medical institutions in Russia: an ERGINI study. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2016; 61(5-6): 33-42. (in Russian)
5. Chenoweth C.E., Gould C.V., Saint S. Diagnosis, management, and prevention of catheter-associated urinary tract infections.

- Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2014; 28: 105-19. doi: 10.1016/j.idc.2013.09.002. Epub 2013 Dec 8.
6. Balasubramanian A., Chairman K., Ranjit Singh A.J., Alagumuthu G. Isolation and identification of microbes from biofilm of urinary catheters and antimicrobial susceptibility evaluation. *As. Pas. J. Trop. Biomed.* 2012; 8: 1780-3.
7. Kranz J., Schmidt S., Wagenlehner F., Schneidewind L. Catheter-associated urinary tract infections in adult patients. *Disch. Arztebl. Int.* 2020; 117(6): 83-8. doi: 10.3238/arztebl.2020.0083.
8. Chenoweth C.E., Saint S. Preventing catheter-associated urinary tract infections in the intensive care unit. *Crit. Care Clin.* 2013; 29: 19-32. doi: 10.1016/j.ccc.2012.10.005.
9. Gritsenko V.A., Shaginyan I.A. Nosocomial infections: 1. Known and new classification approaches. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN*. 2013; 4: 1-17. (in Russian)
10. de Souza G.M., Neto E.R.D.S., da Silva A.M., de Souza Iacia M.V.M., Rodrigues M.V.P., Pereira V.C., Winkelstroter L.K. Comparative study of genetic diversity, virulence genotype, biofilm formation and antimicrobial resistance of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated from nosocomial and community acquired urinary tract infection. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 3595-3606. doi: 10.2147/IDR.S228612.
11. Hassuna N.A., Khairalla A.S., Farahat E.M., Hammad A.M., Abdel-Fatta M. Molecular characterization of Extended-spectrum β lactamase producing *E. coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt. *Sci. Rep.* 2020; 10: 2772. doi: 10.1038/s41598-020-59772-z.
12. Moges A.F., Genetu A., Mengistu G. Antibiotic sensitivities of common bacterial pathogens in urinary tract infections at Gondar Hospital, Ethiopia. *East. Afr. Med. J.* 2002; 79: 140-2. doi: 10.4314/eamj.v79i3.8893.
13. Giray B., Ucar F.B., Aydemir S.S. Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* strains obtained from urology outpatient clinic of Ege Medical Faculty in İzmir. *Turk. J. Med. Sci.* 2012; 42: 1328-37.
14. Kucheria R., Dasgupta P., Sacks S.H., Khan M.S., Sheerin N.S. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad. Med. J.* 2005; 81: 83-6. doi: 10.1136/pgmj.2004.023036.
15. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* 2010; 7: 653-60. doi: 10.1038/nrurol.2010.190.
16. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5): 269-84. doi: 10.1038/nrmicro3432.
17. Picozzi S., Ricci C., Gaeta M., Macchi A., Dinang E., Paola G. et al. Do we really know the prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* in the territorial and nosocomial population? *Urol. Annals*. 2013; 5: 25-9. doi: 10.4103/0974-7796.106962.
18. Van der Steen M., Leenstra T., Kluytmans J.A.J.W., van der Bij A.K. Trends in expanded-spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among dutch clinical isolates, from 2008 to 2012. *PLoS ONE*. 2015; 10(9): e0138088. doi: 10.1371/journal.pone.0138088.
19. Ryabkova E.L., Ivanchik N.V., Sukhorukova M.V., Shchebnikov A.G., Reshed'ko G.K., Turkutyukov V.B. et al. Resistance of nosocomial strains in Russian hospitals. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2009; 11(2): 161-9. (in Russian)
20. Zhao R., Shi J., Shen Y., Li Y., Han Q., Zhang X. et al. Phylogenetic distribution of virulence genes among ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from long-term hospitalized patients. *J. Clin. Diagn. Res.* 2015; 9(7): DC01-DC04. doi: 10.7860/JCDR/2015/13234.6157. Epub 2015 Jul 1.
21. Briongos-Figuero L.S., Gómez-Traveso T., Bachiller-Luque P., Domínguez-Gil González M., Gómez-Nieto A., Palacios-Martín T. et al. Epidemiology, risk factors and comorbidity for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteria. *Int. J. Clin. Pract.* 2012; 66: 891-6. doi: 10.1111/j.1742-1241.2012.02991.x.
22. Lu P.L., Liu Y.C., Toh H.S., Lee Y.L., Liu Y.M., Ho C.M. et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: 2009-2010 results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2012; 40: S3743. doi: 10.1016/S0924-8579(12)70008-0.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

23. Kuznetsova M.V., Provorova S.V., Kubarev O.G., Yudin D.C., Karimova N.V., Bayandina N.V. et al. Comparative characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in a clinic and hospital. *Urologia*. 2018; 6: 37-44. (in Russian)
24. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(24): 6823-6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823
25. Huey B., Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 1989; 171(5): 2528-2532. doi: 10.1128/jb.171.5.2528-2532.1989.
26. Aleisa A.M. Molecular detection of β -lactamases and aminoglycoside resistance genes among *Escherichia coli* isolates recovered from medicinal plant 2013. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2013; 7(20): 2305-10. doi: 10.5897/AJMR12.1965.
27. Ahmed A.M., Motoi Y., Sato M., Maruyama A., Watanabe H., Fukumoto Y. et al. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(20): 6686-90. doi: 10.1128/AEM.01054-07. Epub 2007 Aug 24.
28. Shi H., Sun F., Chen J., Ou Q., Feng W., Yong X. et al. Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial *Escherichia coli* infection in China. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2015; 14: 4. doi: 10.1186/s12941-015-0063-7.
29. Koo H.J., Woo G.J. Characterization of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* recovered from foods of animal and fish origin in Korea. *J. Food Prot.* 2012; 75(5): 966-72. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-003.
30. Lévesque C., Piché L., Larose C., Roy P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(1): 185-191. doi: 10.1128/aac.39.1.185.
31. Naas T., Aubert D., Lambert T., Nordmann P. Complex genetic structures with repeated elements, a sul-type class 1 integron, and the bla_{VEB} extended-spectrum beta-lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 1745-52. doi: 10.1128/AAC.50.5.1745-1752.2006.
32. Jukić I., Topić D., Đulić E., Dedeić-Ljubović A. Frequency and antimicrobial susceptibility pattern of hospital isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in urine samples. *Acta Medica Saliniana*. 2019; 9(1): 195-200.
33. Ramazanzadeh R., Zamani S., Zamani S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iran. J. Microbiol.* 2013; 5(2): 126-31.
34. Daga A.P., Koga V.L., Soncini J.G.M., de Matos C.M., Perugini M.R.E., Pelisson M. *Escherichia coli* bloodstream infections in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2019; 9: 191. doi: 10.3389/fcimb.2019.00191.
35. Ardakani M.A., Ranjbar R. Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. *Elec. Physician*. 2016; 8(4): 2291-6. doi: 10.19082/2291.
36. Meacham K.J., Zhang L., Foxman B., Bauer R.J., Marrs C.F. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11): 5224-6. doi: 10.1128/JCM.41.11.5224-5226.2003.
37. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 3724-3732. doi: 10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003.
38. Maldonado S.I.C., Luna J.A.C. Nosocomial urinary tract infections In: Dr. Ahmad Nikibaksh, editors. Clinical management of complicated urinary tract infection, Croatia: InTech Europe; 2011: 225-38. doi: 10.5772/23521.
39. Aslanov B.I., Dolgiy A.A., Goncharov A.E., Arkhangel'skiy A.I. Epidemiological features of the formation of pathogenic properties of *E. coli* in a urological hospital. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2012; 1(42): 117-21. (in Russian)
40. Chen Y.H., Ko W.C., Hsueh P.R. Emerging resistance problems and future perspectives in pharmacotherapy for complicated urinary tract infections. *Expert Opin. Pharmacother.* 2013; 14: 587-96. doi: 10.1517/14656566.2013.778827.
41. Flores-Mireles A.L., Walker J.N., Caparon M., Hultgren S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13: 269-84. doi:10.1038/nrmicro3432.
42. Chong Y., Yakushiji H., Ito Y., Kamimura T. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a long-term study from Japan. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2011; 30(1): 83-7. doi: 10.1007/s10096-010-1057-1.
43. Allocati N., Michele M., Alexeyev M.F., Ilio D.C. *Escherichia coli* in Europe: An overview. *Int. J. Envir. Res. Pub. Health*. 2013; 10: 6235-54. doi: 10.3390/ijerph10126235.
44. Alqasim A., Jaffal A.A., Alyousef A.A. Prevalence of multidrug resistance and extended-spectrum β -Lactamase carriage of clinical uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Riyadh, Saudi Arabia. *Int. J. Microbiol.* 2018; 2018. doi: 10.1155/2018/3026851. eCollection 2018.

Поступила 15.07.20
Принята к печати 27.08.20