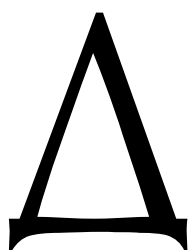


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 67
6 • 2022

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

ИЮНЬ

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. Архипова

Сдано в набор 25.04.2022.
Подписано в печать 20.05.2022.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,87.

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 из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical Ab-
stracts (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), Thom-
son 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.akc.ru,
www.pressa-rt.ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 6. 321–364.

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,
Л.М. СКУИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответст-
венный 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. ЕЛЬ-
ЧАНИНОВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск),
А. KALLNER (Швеция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО
(Санкт-Петербург), К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗ-
ЛОВ (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),
С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Москва),
В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ (Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ диагностика

Volume 67
6 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JUNE

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 Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost
Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-
BASE, 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 Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, 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,
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. KOCH-
TOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYTОВ (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*),
V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Путнева А.С., Максименя М.В., Караваева Т.М., Коцюржинская Н.Н., Цыбилов Н.Н.*
Особенности содержания матриксных металлопротеиназ ММР-9 и ММР-2 в смешанной слюне у молодых лиц с кариесом на фоне различного уровня 25(ОН) витамина D в организме. 325
- Костина О.В., Загреков В.И., Преснякова М.В., Пушкин А.С., Лебедев М.Ю., Ашкинази В.И.*
Взаимосвязь уровня цинка с патогенетически значимыми нарушениями гомеостаза у тяжелообожженных пациентов 330
- Селезнева И.А., Гильмиярова Ф.Н., Тлустенко В.С., Доменюк Д.А., Гусякова О.А., Колотьева Н.А., Гильмиярова И.Е., Назаркина И.А.*
Гематосаливарный барьер: строение, функции, методы (обзор литературы) 334

ИММУНОЛОГИЯ

- Ащина Л.А., Баранова Н.И., Молотилев Б.А.*
Анализ функциональной активности нейтрофилов у больных хроническим полипозным риносинуситом после лечения препаратом интерферона гамма 339

ЦИТОЛОГИЯ

- Базарный В.В., Мандра Ю.В., Сиденкова А.П., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Семенова Е.А., Светлакова Е.Н., Насретдинова Н.Ю., Котикова А.Ю.*
Возрастные особенности буккального эпителия практически здоровых людей. 345

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С.*
Эффективность использования жидких транспортных сред в бактериологической диагностике дифтерийной инфекции. 350
- Каргальцева Н.М., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Кочеровец В.И., Пименова А.С., Гадуа Н.Т.*
Инфекция кровотока у госпитальных терапевтических больных 355
- Алексеева Е.А., Миронов А.Ю., Полосенко О.В., Шепелин А.П., Храмов М.В.*
Выделение и идентификация листерий из клинического материала. 362
- Игнатова Н.И., Елагин В.В., Иванова Т.С., Харитонова Т.М., Антонян А.Э., Стрельцова О.С.*
Оценка потенциальной патогенности микроорганизмов, ассоциированных с конкрементами мочевыделительной системы. 369
- Старикова Д.В., Богачева Н.В., Макарова И.А.*
Проблема риска развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения у женщин Кировской области 374
- Максимова Е.А., Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Золотов М.О.*
Микрофлора мокроты и аутопсийного материала пациентов с COVID-19. 380

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Putneva A.S., Makximenya M.V., Karavaeva T.M., Kotsyurzhinskaya N.N., Tsybikov N.N.*
Features of the content of matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-2 in mixed saliva of young individuals with dental caries against the background of different level of 25(OH) vitamin D in the body325
- Kostina O.V., Zagrekov V.I., Presnyakova M.V., Pushkin A.S., Lebedev M.Yu., Ashkinazi V.I.*
Relationship of zinc level with pathogenetically significant homeostasis disorders in severely burned patients330
- Selezneva I.A., Gilmiyarova F.N., Tlustenko V.S., Domenjuk D.A., Gusyakova O.A., Kolotyeva N.A., Gilmiyarova I.E., Nazarkina I.A.*
Hematosalivarian barrier: structure, functions, study methods (review of literature).....334

HEMATOLOGY

- Aschina L.A., Baranova N.I., Molotilov B.A., Shkurova N.A.*
Analysis of neutrophil functional activity in patients with chronic polyposis rhinosinusitis after treatment with interferon gamma.339

CYTOLOGY

- Bazarnyi V.V., Mandra Yu.V., Sidenkova A.P., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Sementsova E.A., Svetlakova E.N., Nasretidinova N.Yu., Kotikova A.Yu.*
Age features of buccal epithelium in practically healthy people345

MICROBIOLOGY

- Gadua N.T., Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Afanasiev S.S.*
Effectiveness of using liquid transport media in bacteriological diagnostics of diphtheria infection350
- Kargaltseva N.M., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Kocherovets V.I., Pimenova A.S., Gadua N.T.*
Bloodstream infection in hospital therapeutic patients355
- Alekseeva E.A., Mironov A.Yu., Polosenko O.V., Shepelin A.P., Khramov M.V.*
Isolation and identification of listeria in clinical material362
- Ignatova N.I., Elagin V.V., Ivanova T.S., Kharitonova T.M., Antonyan A.E., Streltsova O.S.*
Evaluation of the potential pathogenicity of microorganisms associated with urinary calculi.369
- Starikova D.V., Bogacheva N.V., Makarova I.A.*
The problem of the risk of development of infection of surgical obstetric wound after cesarian section in women of the Kirov region.374
- Maksimova E.A., Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusyakova O.A., Zolotov M.O.*
Microflora of sputum and autopsy material of patients with COVID-19380

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Путнева А.С., Максименя М.В., Караваева Т.М., Коцюржинская Н.Н., Цыбиков Н.Н.

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ MMP-9 И MMP-2 В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ У МОЛОДЫХ ЛИЦ С КАРИЕСОМ НА ФОНЕ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ 25(OH) ВИТАМИНА D В ОРГАНИЗМЕ

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 672000, Чита, Россия

Изучено содержание MMP-9 и MMP-2 в ротовой жидкости у 105 человек в возрасте от 19 до 23 лет. Из них 42 человека были лица с кариесом и нормальным уровнем активной формы витамина D (25(OH)D >30 нг/мл) в сыворотке крови и 42 – с уровнем 25(OH)D <30 нг/мл. Контрольную группу составили 21 человек с низким индексом КПУ (1,5) и нормальным уровнем 25(OH)D в крови. Установлено, что при кариесе в смешанной слюне увеличивается уровень MMP-9, на фоне недостатка и дефицита 25(OH)D в организме содержание MMP-9 и MMP-2 существенно возрастает. Выявлены обратные корреляционные связи между уровнем 25(OH)D в сыворотке крови и величинами матриксных металлопротеиназ в слюне: заметные – с количеством MMP-9 и умеренные – с концентрацией MMP-2.

Ключевые слова: ротовая жидкость; матриксные металлопротеиназы; 25(OH) витамин D; кариес.

Для цитирования: Путнева А.С., Максименя М.В., Караваева Т.М., Коцюржинская Н.Н., Цыбиков Н.Н. Особенности содержания матриксных металлопротеиназ MMP-9 и MMP-2 в смешанной слюне у молодых лиц с кариесом на фоне различного уровня 25(OH) витамина D в организме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 325-329. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-325-329>

Для корреспонденции: Караваева Татьяна Михайловна, ст. науч. сотр. лаб. клин. и эксперимент. биохимии и иммунологии НИИ мол. медицины, доц. каф. химии и биохимии; e-mail: KaTany1@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 17.12.2021

Принята к печати 31.01.2022

Опубликовано 20.06.2022

Putneva A.S., Makximenya M.V., Karavaeva T.M., Kotsyurzhinskaya N.N., Tsybikov N.N.

FEATURES OF THE CONTENT OF MATRIX METALLOPROTEINASES MMP-9 AND MMP-2 IN MIXED SALIVA OF YOUNG INDIVIDUALS WITH DENTAL CARIES AGAINST THE BACKGROUND OF DIFFERENT LEVEL OF 25(OH) VITAMIN D IN THE BODY

The Chita State Medical Academy, Healthcare Ministry of Russia, 672000, Chita, Russia

The content of MMP-9 and MMP-2 in oral fluid of 105 individuals between the ages of 19 and 23 has been researched. Of these, 42 people are individuals with dental caries and normal level of the active form of vitamin D in serum (25(OH)D >30 ng/mL) and 42 people – with 25(OH)D <30 ng/mL level. The control group was composed of 21 individuals with low DMFT index (1,5) and a normal level of 25(OH)D in blood. It has been established that the level of MMP-9 in mixed saliva increases against the background of dental caries, while the content of MMP-9 and MMP-2 increases significantly amid the lack and deficiency of 25(OH)D in the body. Inverse correlations between the 25(OH)D level in serum and the value of matrix metalloproteinases in saliva have been revealed: noticeable – with the amount of MMP-9 and moderate – with the concentration of MMP-2.

Key words: oral fluid; matrix metalloproteinases; 25(OH) vitamin D; dental caries.

For citation: Putneva A.S., Makximenya M.V., Karavaeva T.M., Kotsyurzhinskaya N.N., Tsybikov N.N. Features of the content of matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-2 in mixed saliva of young individuals with dental caries against the background of different level of 25(OH) vitamin D in the body. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 325-329 (in Russ). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-325-329>

For correspondence: Karavaeva T.M., Candidate of Medical Sciences., Senior Researcher of Laboratory of Clinical and Experimental Biochemistry and Immunology of Research Institute of Molecular Medicine, assistant professor of Department chemistry and biochemistry; e-mail: KaTany1@yandex.ru

Information about authors:

Putneva A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3225-1333>;
Maximenya M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6308-3411>;
Karavaeva T.M., <https://orcid.org/0000-0002-0487-6275>;
Kotsyurzhinskaya N.N., <https://orcid.org/0000-0003-0061-8014>;
Tsybikov N.N., <http://orcid.org/0000-0002-0724-0352>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.12.2021

Accepted 31.01.2022

Published 20.06.2022

Введение. Изучение состава слюны при патологических состояниях, прежде всего в полости рта, весьма актуально в настоящее время. Это связано с тем, что забор слюны неинвазивен, а определение концентрации веществ, находящихся в ней, активно используется для изучения патогенеза заболеваний, их ранней диагностики, оценки прогноза течения и эффективности лечения [1–5].

Самым распространенным недугом, с которым на протяжении жизни сталкивается до 98% населения, является кариес зубов [6–10]. Данная патология, способствующая формированию очагово-обусловленных заболеваний организма, признана мультифакторной [11]. В ряде научных работ отмечено, что кариес зубов чаще развивается на фоне недостатка витамина D (25(OH)D) [12]. Активная форма витамина D – гормон кальцитриол, кроме принадлежащей ему ключевой роли в минеральном обмене, осуществляет широкий ряд биологических функций [13–16]. Установлено, что существует около 900 генов, непосредственно или косвенно реагирующих на воздействие кальцитриола [17]. Имеются сведения, что витамин D может влиять и на выработку матриксных металлопротеиназ (ММР) – ферментов, вовлеченных в кариозный процесс [18–20].

Интерес к изучению ММР связан с новыми доказательствами того, что они катализируют гидролиз широкого спектра молекул, потенциально могут регулировать ряд биохимических реакций. Сложность функций этих энзимов в «протеазной сети» имеет решающее значение для многих физиологических и патологических процессов, включая иммунитет, воспаление, резорбцию костной ткани. Данные ферменты подвергаются каскадной активации и, помимо своих классических субстратов внеклеточного матрикса, расщепляют некоторые сигнальные молекулы, такие, как цитокины, хемокины и факторы роста, регулируя их биологические функции и/или биодоступность при стоматологических заболеваниях [21].

В связи с этим целью работы являются оценка изменения концентраций ММР в смешанной слюне у лиц с кариесом на фоне различного содержания 25(OH) витамина D в организме и выявление взаимосвязи между изученными показателями.

Материалы и методы. Были проанализированы образцы слюны, собранной у 105 человек – студентов ВУЗов в возрасте от 19 до 23 лет без соматической патологии и известным содержанием уровня 25(OH) витамина D в крови, который оценивали методом хемилюминесцентного иммунного анализа (Access 2). Степень интенсивности кариеса зубов оценивали при стоматологическом осмотре, рассчитывая индекс КПУз (К-кариес; П-пломба; У-удаленный). Были сформированы 5 групп, 1-я и 2-я группы (по 21 человеку в каждой) включали студентов с кариесом разной степени интенсивности и нормальным уровнем активной формы витамина D (25(OH)D >30 нг/мл) в сыворотке крови: 1-я группа – обследуемые с индексом КПУ от 4 до 8, 2-я группа – обследуемые с индексом КПУ более 9 (высокая интенсивность кариеса); 3-я и 4-я группы состояли из 21 пациента с кариесом и уровнем активной формы витамина D в сыворотке крови ниже нормы (25(OH)D <30 нг/мл): 3-я группа – лица со средней интенсивностью процесса (индекс КПУ 4-8), 4-я группа – лица с высокой интенсивностью (индекс КПУ выше 9). Группу контроля составили 21 человек со средним индексом КПУ 1,5 (от 0 до 3) и

уровнем 25(OH)D в крови более 30 нг/мл. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, социальному статусу.

От всех участников исследования было получено добровольное информированное согласие на проводимое исследование. В работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2013 – поправки).

Слюну собирали с 8 до 9 ч утра натошак в стеклянную пробирку без предварительной стимуляции, очищали путем центрифугирования при $10000 \times g$ в течение 5 мин, затем замораживали и после оттаивания снова очищали от муцина. Для определения уровня ММР-9 и ММР-2 использовался набор для мультиплексного анализа Human Vascular Inflammation Panel 1 (фирма Biolegend, США), результаты оценивались с помощью проточного цитофлуометра Cytotflex LX (Beckman Coulter, США).

При проведении статистического анализа авторы руководствовались едиными требованиями для рукописей, подаваемых в биомедицинские журналы, и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL). Анализ нормальности распределения признаков проводился путем оценки критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального, полученные данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей: Me [Q₁; Q₃]. Сравнение количественных признаков выполняли с применением критерия Краскела-Уоллиса (H). При наличии статистически значимых различий с учетом поправки Бонферрони, проводилось попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни (U). Для определения корреляционных связей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (r). Силу связи между исследуемыми параметрами определяли по шкале Чеддока. Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты и обсуждение. Значения индекса КПУ и его компонентов, а также содержание 25(OH)D, представлены в таблице, из которой видно, что уровень активной формы витамина у лиц с кариесом даже в 1-й и 2-й группах статистически значимо ниже, чем в контрольной. Доля удаленных зубов и число пораженных кариесом зубов в группах относительно невелики.

Содержание ММР в слюне представлены на рис. 1 и 2. Смешанная слюна включает в себя секрет слюнных желез, детрит полости рта, десневую жидкость, зубной ликвор, слущенный эпителий и лейкоциты, а при патологических состояниях – большое количество нейтрофилов, вырабатывающих целый ряд медиаторов воспаления и факторов повреждения тканей, поэтому происхождение матриксных металлопротеиназ в слюне неоднозначно, а их концентрация может зависеть от метода очистки слюны. ММР-9 в основном синтезируется нейтрофилами и хранится во внутриклеточных вторичных гранулах в виде профермента.

После стимуляции, в том числе после бактериального воздействия, активированные лейкоциты мигрируют в область воспаления и выделяют ММР-9 в виде латентной формы, которая локально активируется путем частичного протеолиза другими протеазами (эластазой, ММР-1) и миелопероксидазой. Помимо нейтрофилов, ММР-9 секретируется макрофагами, эпителиальными клетками и одонтобластами. ММР-2 прежде всего экспрессируется в фибробластах, а также синтезируется

Индекс КПУ, его компоненты и содержание 25(ОН) витамина D в сыворотке крови у лиц обследуемых групп

Показатель	Исследуемые группы					Тестовая статистика Df=4
	Контрольная группа (n=21)	Группы с нормальным уровнем 25(ОН)D		Группы с низким уровнем 25(ОН)D		
		1-я группа (n=21)	2-я группа (n=21)	3-я группа (n=21)	4-я группа (n=21)	
КПУ	1,0 [1,0; 1,7]	5,0* [4,5; 6,5]	9,5* [9,0; 11,0]	5,0* [4,6; 6,7]	9,5* [9,1; 11,5]	H=51,49 p<0,001
К (кариес)	0,0 [0,0; 0,0]	1,5* [1,0; 2,5]	2,0* [1,0; 4,0]	2,0* [1,0; 3,5]	2,5* [1,0; 3,5]	H=48,25 p<0,001
П (пломба)	1,0 [1,0; 1,7]	4,0* [3,0; 5,1]	7,0* [5,5; 8,0]	4,0* [4,0; 5,2]	7,5* [7,0; 8,3]	H=47,26 p<0,001
У (удаленный)	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,0]	0,0 [0,0; 0,1]	0,0* [0,0; 0,2]	0,0* [0,0; 0,4]	H=7,91 p=0,02
Уровень 25 (ОН) витамина D (нг/мл)	47,2 [41,6; 50,2]	34,7* [32,2; 38,3]	32,8* [31,2; 39,1]	20,3* [18,4; 26,9]	19,3* [17,5; 25,4]	H=86,02 p<0,001

Примечание. * – статистически значимые различия при попарном сравнении с группой контроля с помощью критерия Манна-Уитни, n – число обследуемых.

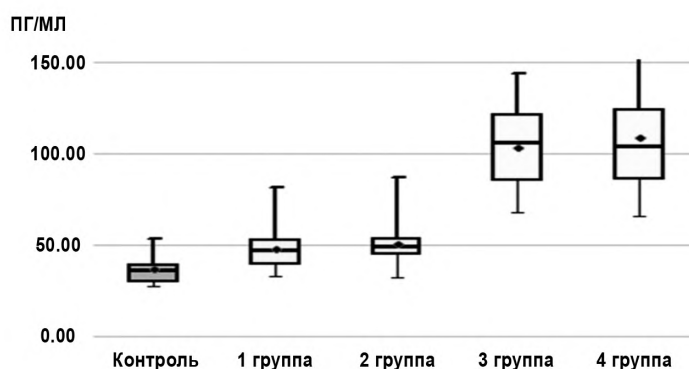


Рис. 1. Содержание ММР-9 в смешанной слюне в группах обследуемых лиц. Здесь и на рис. 2: • – медиана; – 25-75%; $\perp$ – диапазон значений.

остеобластами, одонтобластами, нейтрофилами, макрофагами и моноцитами [22].

Оценка уровня металлопротеиназ в смешанной слюне показала, что в группах с кариесом и нормальным уровнем 25(ОН) витамина D регистрируется увеличение концентраций ММР-9 относительно контроля: в 1-й группе – на 29,2% ($p<0,001$), во 2-й – на 36,1% ($p<0,001$) (рис. 1). Разницы в зависимости от интенсивности кариеса в данных группах не наблюдалось.

Полученные результаты в этом случае, на наш взгляд, выглядят вполне логично. Литературные данные свидетельствуют о том, что эти литические ферменты играют роль в прогрессировании кариеса зубов, запуская деградацию белков дентина, который менее минерализован, чем эмаль и содержит 19-20% органического компонента, главным образом представленного коллагеном I типа [23]. ММР, присутствующие в дентине [24, 25], продуцируются одонтобластами и могут вовлекаться в формирование дентина. После минерализации коллагенового матрикса они остаются в неактивной форме в кальцифицированном матриксе [26]. По мнению С. Chaussain и соавт. [27], каскад событий, вовлекающих эти протеазы в кариозный процесс, может быть следующим: деминерализация происходит под действием органических кислот, которые секретируются кариесогенными микроорганиз-

мами, ММР, в норме находясь в латентной форме как в слюне, так и в дентине, при низком значении pH активируются и деминерализованный матрикс в свою очередь подвергается их протеолитическому действию, что усугубляет кариозный процесс. С другой стороны, имеются исследования, указывающие на то, что и металлопротеиназы, секретируемые нейтрофилами, тоже вносят свой вклад в деградацию дентина [28, 29].

В группах пациентов с кариесом и недостатком/дефицитом 25(ОН) витамина D уровни ММР-9 были увеличены гораздо существеннее по сравнению с контрольной группой: в третьей группе – на 201,7% ($p<0,001$), в четвертой – на 191,5% ($p<0,001$) (см. рис. 1). Кроме того, в четвертой группе была повышена концентрация ММР-2 на 33,5% ($p<0,001$) относительно контроля, а также на 27,0% ($p=0,049$) относительно значений во второй группе (рис. 2).

Сравнительный анализ в группах с одинаковым индексом КПУ, но различным статусом 25(ОН) витамина D, показал, что недостаток/дефицит 25(ОН) витамина D сопровождается повышением концентрации ММР-9 (практически в два раза), которое не зависит от интенсивности кариеса, а также ростом уровня ММР-2 на 27,7% ($p=0,049$), наблюдаемым в группе с высоким индексом КПУ.

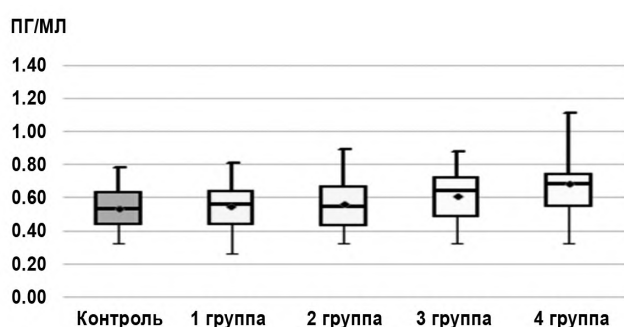


Рис. 2. Содержание MMP-2 в смешанной слюне в группах обследуемых лиц.

Проведенный корреляционный анализ выявил наличие заметной прямой связи между величинами MMP-9 и индексом КПУ ($r=0,52$; $p<0,001$) и заметной обратной связи между уровнем MMP-9 слюны и содержанием 25(OH) витамина D в сыворотке крови ($r=-0,64$; $p<0,001$). Между количеством MMP-2 и уровнем 25(OH) витамина D регистрировалась умеренная обратная связь ($r=-0,40$; $p=0,001$). Похожие взаимосвязи между концентрациями MMP-9 и 25(OH)D₃ обнаружены в исследовании H. Wasse и соавт. [30]. Известно, что некоторые цитокины, например TNF- α , стимулируют избыточную продукцию MMP-9. Витамин D подавляет активацию фактора транскрипции NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), вызванную TNF- α , что устраняет пагубное действие TNF- α за счет угнетения образования MMP-9 [18].

Таким образом, в ходе проведенного исследования было установлено, что статус 25(OH) витамина D в организме влияет на уровень MMP в смешанной слюне при кариесе, что подтверждает значимость дефицита витамина D в патогенезе данного заболевания. Полученные результаты повышенного содержания MMP в ротовой жидкости молодых лиц с кариесом на фоне недостатка 25(OH) витамина D можно расценивать как фактор, приводящий в последующем к прогрессированию кариеса зубов. Выявленные изменения концентрации MMP при множественном кариесе могут служить дополнительными критериями, указывающими на активность течения заболевания. Кроме того, на наш взгляд, проведенное исследование дает основание для постановки вопроса оценки статуса витамина D в организме с целью своевременной терапевтической коррекции кариеса высокой степени интенсивности с включением препаратов витамина D в комплексное лечение.

Выводы:

1. При кариесе в смешанной слюне увеличивается уровень MMP-9. Недостаток/дефицит сывороточного 25(OH)D сопровождается более интенсивным ростом концентрации MMP-9 и MMP-2 в слюне при кариесе.
2. Концентрация 25(OH)D находится в обратной заметной корреляционной зависимости с величинами MMP-9 и в обратной умеренной зависимости с уровнем MMP-2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельская Л.В. Возможности применения слюны для диагностики онкологических заболеваний. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(6): 333-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-333-336>.

2. Колсанов А.В., Чаплыгин С.С., Соколов А.В., Власов М.Ю., Мякишева Ю.В. Экспресс-методы определения показателей метаболизма в ротовой жидкости (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(8): 489-95.
3. Кочурова Е.В., Козлов С.В. Диагностические возможности слюны. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(1): 13-5.
4. Кушлинский Н.Е., Соловых Е.А., Караогланова Т.Б., Баяр У., Герштейн Е.С., Трошин А.А. и др. Матриксные металлопротеиназы и воспалительные цитокины в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным пародонтитом с различными конструкционными материалами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 153(1): 72-6.
5. Цыбиков Н.Н., Пинелис Ю.И., Малежик М.С., Малежик Л.П. Выявление иммуноглобулинов, антител против белков теплового шока и цитокина IL-8 в слюне больных хроническими заболеваниями пародонта. *Медицинская иммунология*. 2010; 12(4-5): 421-4. DOI:10.15789/1563-0625-2010-4-5-421-424.
6. Токмакова С.И., Бондаренко О.В., Шевцова А.А., Сгибнева В.А., Жукова Е.С., Воблова Т.В. Оценка распространенности и интенсивности кариеса и некариозных поражений у взрослого населения города Барнаул. *Современные проблемы науки и образования*. 2018; 4: 226.
7. Леонтьев В.К. Кариес зубов – болезнь цивилизации. *Биосфера*. 2010; 3: 392-6.
8. Шадрин А.С., Плиева Я.З., Кушлинский Д.Н., Морозов А.А., Филипенко М.Л., Чанг В.Л., Кушлинский Н.Е. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии. *Альманах клинической медицины*. 2017; 45(4): 266-79. DOI: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-266-279.
24. Македонова Ю.А., Поройская А.В., Чурсина Т.К., Венскель И.В. Морфологические особенности и роль дентин-матриксной металлопротеиназы в деградации дентинного матрикса (обзорная статья). *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2019; (4): 25-8.
25. Хабазе З.С., Генералова Ю.А., Шубаева В.С., Шерозия М.Г., Недашковский А.А., Негорелова Я.А. Актуальность применения хлоргексидина в адгезивном протоколе в девитальных зубах. *Эндодонтия Today*. 2020; 18(4): 26-31. DOI: 10.36377/1683-2981-2020-18-4-26-31.

REFERENCES

1. Bel'skaya L.V. Possible applications of saliva for the diagnosis of cancer. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(6): 333-6. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-6-333-336. (in Russian)
2. Kolsanov A.V., Chaplygin S.S., Sokolov A.V., Vlasov M.Yu., Myakisheva Yu.V. Express methods for detection the indicators of metabolism in the oral liquid (a review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(8): 489-95. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-8-489-495. (in Russian)
3. Kochurova E.V., Kozlov S.V. The diagnostic possibilities of saliva. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014; 59(1): 13-5. (in Russian)
4. Kushlinskii N.E., Solovykh E.A., Karaoglanova T.B., Boyar U., Gershtein E.S., Troshin A.A., Maksimovskaya L.N., Yanushevich O.O. Matrix metalloproteinases and inflammatory cytokines in oral fluid of patients with chronic generalized periodontitis and various construction materials. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012; 153(1): 72-6. (in Russian)
5. Tsybikov N.N., Pinelis Yu.I., Malezik M.S., Malezik L.P. Detection of immunoglobulins, antibodies to heat-shock proteins and IL-8 cytokine in saliva from the patients with chronic periodontal diseases. *Meditsinskaya immunologiya*. 2010; 2(4-5): 421-4. DOI:10.15789/1563-0625-2010-4-5-421-424. (in Russian)
6. Bostanci N., Mitsakakis K., Afacan B., Bao K., Johansen B., Baumgartner D., Müller L., Kotolová H., Emingil G., Karpíšek M. Validation and verification of predictive salivary biomarkers for oral health. *Sci. Rep.* 2021; 11: 6406.
7. Tokmakova S.I., Bondarenko O.V., Shevtsova A.A., Sgibneva V.A., Zhukova E.S., Voblova T.V. Estimation of prevalence and intensity

- of caries and non-caries lesions in the adult population of Barnaul. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2018; 4: 226. (in Russian)
8. Kazemini M., Abdi A., Shohaimi S., Jalali R., Vaisi-Raygani A., Salari N., Mohammadi M. Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: a systematic review and meta-analysis. *Head Face Med*. 2020; 16(1): 22. DOI: 10.1186/s13005-020-00237-z
9. Pandey P., Nandkeoliar T., Tikku A.P., Singh D., Singh M.K. Prevalence of dental caries in the indian population: a systematic review and meta-analysis. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent*. 2021; 11(3): 256-65. DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_42_21.
10. Soltani M.R., Sayadizadeh M., Raeisi Estabragh S., Ghannadan K., Malek-Mohammadi M. Dental caries status and its related factors in iran: a meta-analysis. *J. Dent (Shiraz)*. 2020; 21(3): 158-176. DOI: 10.30476/DENTJODS.2020.82596.1024.
11. Leontiev V.K. Dental caries as a civilization disease. *Biosfera*. 2010; 3: 392-6. (in Russian)
12. Deane S., Schroth R.J., Sharma A., Rodd C. Combined deficiencies of 25-hydroxyvitamin D and anemia in preschool children with severe early childhood caries: a case-control study. *Paediatr. Child. Health*. 2018; 23(3): e40-e45. DOI: 10.1093/pch/pxx150.
13. Naeini A.E., Moenizadeh F., Vahdat S., Ahmadi A., Hedayati Z.P., Shahzeidi S. The effect of vitamin D administration on intracellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 levels in hemodialysis patients: a placebo-controlled, double-blinded clinical trial. *J. Res. Pharm. Pract*. 2017; 6(1): 16-20. DOI: 10.4103/2279-042X.200994.
14. Umar M., Sastry K.S., Chouchane A.I. Role of vitamin D beyond the skeletal function: a review of the molecular and clinical studies. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19(6): 1618. DOI: 10.3390/ijms19061618.
15. Habib A.M., Nagi K., Thillaiappan N.B., Sukumaran V., Akhtar S. Vitamin D and Its potential interplay with pain signaling pathways. *Front Immunol*. 2020; 28(11): 820. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00820.
16. Bivona G., Agnello L., Ciaccio M. The immunological implication of the new vitamin D metabolism. *Cent. Eur. J. Immunol*. 2018; 43(3): 331-4.
17. Mak A. The impact of vitamin D on the immunopathophysiology, disease activity, and extra-musculoskeletal manifestations of systemic lupus erythematosus. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(8): pii: E2355. DOI: 10.3390/ijms19082355.
18. Oh C., Kim H.J., Kim H.M. Vitamin D maintains E-cadherin intercellular junctions by downregulating MMP-9 production in human gingival keratinocytes treated by TNF- α . *J. Periodontal. Implant. Sci*. 2019; 49(5): 270-286. DOI: 10.5051/jpis.2019.49.5.270.
19. Coussens A., Timms P.M., Boucher B.J., Venton T.R., Ashcroft A.T., Skolimowska K.H., et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology*. 2009; 127(4): 539-48. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.03024.x.
20. Sundar I.K., Hwang J.W., Wu S., Sun J., Rahman I. Deletion of vitamin D receptor leads to premature emphysema/COPD by increased matrix metalloproteinases and lymphoid aggregates formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2011; 406(1): 127-33. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.011.
21. Shadrina A.S., Plieva Ya.Z., Kushlinskiy D.N., Morozov A.A., Filipenko M.L., Chang V.L., Kushlinskii N.E. Classification, regulation of activity, and genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in health and disease. *Almanakh klinicheskoy meditsiny*. 2017; 45(4): 266-79. DOI: 10.18786/2072-0505-2017-45-4-266-279. (in Russian)
22. Cortes-Vieyra R., Rosales C., Uribe-Querol E. Neutrophil functions in periodontal homeostasis. *J. Immunol. Res*. 2016; 10: 1396106. DOI:10.1155/2016/1396106.
23. Mazzoni A., Tjäderhane L., Checchi V., Di Lenarda R., Salo T., Tay F.R., Pashley D.H., Breschi L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J. Dent. Res*. 2015; 94(2): 241-51. DOI: 10.1177/0022034514562833.
24. Makedonova Yu.A., Poroyskaya A.V., Chursina T.K., Venskel I.V. Morphological features and role of dentine matrix metalloproteinases in the degradation of the dentinal matrix. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2019; (4): 25-8. (in Russian)
25. Khabadze Z.S., Generalova Yu.A., Shubaeva V.S., Sheroziia M.G., Nedashkovsky A.A., Negorelova Ya.A. The relevance applying in the adhesive protocol in devital teeth. *Endodontiya Today*. 2020; 18(4): 26-31. DOI: 10.36377/1683-2981-2020-18-4-26-31. (in Russian)
26. Femiano F., Femiano R., Femiano L., Jamilian A., Rullo R., Perillo L. Dentin caries progression and the role of metalloproteinases: an update. *European Journal of Paediatric Dentistry*. 2016; 17(3): 243-7.
27. Chaussain-Miller C., Fioretti F., Goldberg M., Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J. Dent. Res*. 2006; 85(1): 22-32. DOI: 10.1177/154405910608500104.
28. Anshida V.P., Kumari R.A., Murthy C.S., Samuel A. Extracellular matrix degradation by host matrix metalloproteinases in restorative dentistry and endodontics: An overview. *J. Oral. Maxillofac. Pathol*. 2020; 24(2): 352-60. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_34_20.
29. Gitalis R., Zhou L., Marashdeh M.Q., Sun C., Glogauer M., Finer Y. Human neutrophils degrade methacrylate resin composites and tooth dentin. *Acta Biomater*. 2019; 88: 325-31. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.02.033.
30. Wasse H., Cardarelli F., De Staercke C., Hooper C., Veledar E., Guessous I. 25-hydroxyvitamin D concentration is inversely associated with serum MMP-9 in a cross-sectional study of African American ESRD patients. *BMC Nephrol*. 2011; 12: 24. DOI: 10.1186/1471-2369-12-24.

Костина О.В., Загреков В.И., Преснякова М.В., Пушкин А.С., Лебедев М.Ю., Ашкинази В.И.

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ ЦИНКА С ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ГОМЕОСТАЗА У ТЯЖЕЛООБОЖЖЕННЫХ ПАЦИЕНТОВ

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, 603950, Нижний Новгород, Россия

Цель исследования – оценка содержания цинка и выявление взаимосвязей концентрации этого микроэлемента с изменениями биохимического статуса и маркерами воспаления у пациентов в период ожогового шока. Обследованы 23 пациента в возрасте 45,3±16,1 лет с ожогами I-II-III степени, площадью поражения 31-80%. У всех пациентов в сыворотке крови определяли концентрацию цинка, альбумина, интерлейкина-6, С-реактивного белка (СРБ), активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). У 21 пациента отмечалась гипоцинкемия. Медиана концентрации этого микроэлемента была статистически значимо снижена в 1,7 раза по сравнению со значением здоровых людей. Анализ коррелятивных взаимоотношений концентрации цинка в сыворотке крови с площадью термического поражения выявил обратную зависимость средней силы ($r=-0,53$; $p=0,008$). Снижение уровня цинка в период ожогового шока ассоциировалось с развитием гипоальбуминемии ($r=0,52$, $p=0,01$). Выявлена сопряженность отклонений активности АЛТ и АСТ с изменениями концентрации цинка ($-0,59 < \gamma < -0,61$, $0,008 < p < 0,009$), что может свидетельствовать о роли дисфункции печени в развитии гипоцинкемии. Наблюдаемые изменения происходили на фоне системного воспалительного ответа, о чем свидетельствует увеличение концентрации интерлейкина-6 и СРБ. Проведение корреляционного анализа выявило ассоциативную связь между уровнем цинка и интерлейкина-6 ($r=-0,63$, $p=0,03$), а также цинка и СРБ ($r=-0,41$, $p=0,04$). Таким образом, с первых дней после травмы у тяжелообожженных пациентов наблюдается выраженный дефицит цинка, на который влияют воспалительная реакция и гипоальбуминемия. В связи с тем, что цинк является одним из ключевых факторов поддержания гомеостаза в организме, необходимо дальнейшее исследование молекулярных механизмов регуляции уровня этого микроэлемента у обожженных пациентов и разработки путей коррекции гипоцинкемии, способствующих более эффективному лечению ожоговой болезни.

Ключевые слова: цинк; ожоговая болезнь; шок; воспаление; гипоальбуминемия.

Для цитирования: Костина О.В., Загреков В.И., Преснякова М.В., Пушкин А.С., Лебедев М.Ю., Ашкинази В.И. Взаимосвязь уровня цинка с патогенетически значимыми нарушениями гомеостаза у тяжелообожженных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 330-333. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-330-333>

Для корреспонденции: Костина Ольга Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы биохимии отд. лаб. исследований НИИ профилактической медицины Университетской клиники; e-mail: olkosta@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.12.2021
Принята к печати 25.01.2022
Опубликовано 20.06.2022

Kostina O.V., Zagrekov V.I., Presnyakova M.V., Pushkin A.S., Lebedev M.Yu., Ashkinazi V.I.

RELATIONSHIP OF ZINC LEVEL WITH PATHOGENETICALLY SIGNIFICANT HOMEOSTASIS DISORDERS IN SEVERELY BURNED PATIENTS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

The aim of the study was to assess the zinc content and identify the relationship between the concentration of this element and changes in the biochemical status of patients and markers of inflammation during burn shock. We examined 23 patients aged 45.3±16.1 years with burns of I-II-III degree, area of 31-80%. The serum concentrations of zinc, albumin, interleukin-6, C-reactive protein (CRP), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined. The majority of patients (21/23) had severe hypocinemia, correlated with burn area ($r=-0.53$; $p=0.008$). A decrease in zinc levels during burn shock was associated with the development of hypoalbuminemia ($r=0.52$, $p=0.01$). The association of deviations in ALT and AST activity with changes in zinc concentration was revealed ($-0.59 < \gamma < -0.61$, $0.008 < p < 0.009$), which may indicate the role of hepatic dysfunction in the development of hypocinemia. The development of a systemic inflammatory response was revealed. The correlation analysis revealed an association between the zinc and interleukin-6 levels ($r=-0.63$, $p=0.03$), as well as zinc and CRP ($r=-0.41$, $p=0.04$). From the first days after the injury, zinc deficiency is observed in severely burned patients, which is affected by an inflammatory reaction and hypoalbuminemia. Due to the fact that zinc is one of the key factors in maintaining homeostasis in the body, it is necessary to further study the molecular mechanisms of regulating the level of this trace element in burned patients and to develop ways to correct hypocinemia that contribute to the effective treatment of burn disease.

Key words: zinc; burn disease; shock; inflammation; hypoalbuminemia.

For citation: Kostina O.V., Zagrekov V.I., Presnyakova M.V., Pushkin A.S., Lebedev M.Yu., Ashkinazi V.I. Relationship of zinc level with pathogenetically significant homeostasis disorders in severely burned patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2022; 67 (6): 330-333 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-330-333>

For correspondence: Kostina O.V., cand. of biol. sciences, senior researcher of the biochemistry groups of the laboratory research department of the Research Institute of preventive medicine of the University clinic; e-mail: olkosta@rambler.ru

Information about authors:

Kostina O.V., <http://orcid.org/0000-0001-7529-2544>;
Zagrekov V.I., <https://orcid.org/0000-0001-8235-7705>;
Presnyakova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3951-9403>;

Pushkin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7170-7885>;
Lebedev M.Y., <https://orcid.org/0000-0001-5596-2619>;
Ashkinazi V.I., <https://orcid.org/0000-0003-3376-566X>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 13.12.2021

Accepted 25.01.2022

Published 20.06.2022

Введение. Обширное, глубокое термическое поражение кожных покровов сопровождается синдромом системного воспалительного ответа, эндокринными и метаболическими нарушениями, которые обуславливают тяжелое течение ожоговой болезни [1, 2]. Выраженный воспалительный ответ, гиперметаболическая реакция, включающая гиперкатаболизм, дисбаланс между про- и антиоксидантами, нарушения свертываемости крови и микроциркуляции способствуют развитию синдрома полиорганной недостаточности и утяжелению состояния тяжелообожженных пациентов [3-6].

В патогенезе термической травмы немаловажную роль играют нарушения микроэлементного состава крови [7]. Одним из наиболее значимых микроэлементов в организме человека является цинк (Zn), дефицит которого может способствовать развитию сепсиса, про- и антиоксидантного дисбаланса [8, 9], снижению регенераторных способностей кожи [10, 11]. Значимость этого микроэлемента в патогенезе ожоговой болезни обусловлена его многофункциональностью. Цинк входит в состав большинства ферментов, играет важную роль во всех видах обмена веществ, в регуляции антиоксидантной и иммунной систем, оказывает влияние на процессы апоптоза, пролиферации клеток, клеточное дыхание, гемопоэз [12]. Показано, что цинк является адаптогеном и в условиях гипоксии стимулирует эритропоэз, активирует продукцию супероксиддисмутазы и ингибирует синтез провоспалительных цитокинов [13]. Являясь структурным компонентом металлопротеиназ, цинк необходим для тканевого ремоделирования [14], в связи с чем наличие достаточного количества цинка представляется важным для оптимизации процессов заживления ран [15, 16].

Несмотря на успехи, достигнутые в лечении тяжелой термической травмы, ранняя стадия ожоговой болезни является критическим периодом ожоговой болезни. Изучение патофизиологических изменений, в том числе особенностей микроэлементного состава крови в период ожогового шока, необходимо для разработки патогенетически обоснованных методов лечения и по-прежнему остается важной задачей для ученых и клиницистов.

Цель исследования – выявление взаимосвязей концентрации цинка с изменениями биохимического статуса и маркерами воспаления у пациентов в период ожогового шока.

Материал и методы. Исследование носило пилотный описательный характер. Лабораторные показатели изучались в период ожогового шока у 23 пациентов (5 женщин и 18 мужчин, средний возраст пациентов составил $45,3 \pm 16,1$ лет) с ожогами I-II-III степени площадью поражения $51,1 \pm 17,1\%$ (31-80%). Пациенты находились в Университетской клинике Приволжского исследовательского медицинского университета, где получали стандартное комплексное лечение. Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией

Всемирной медицинской ассоциации и одобрено Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета. От каждого пациента получено добровольное информированное согласие на участие и обработку данных.

Группу сравнения составили 24 практически здоровых добровольца, сопоставимых по возрасту и полу с группой тяжелообожженных больных.

Для исследований использовали сыворотку крови пациентов, которую забирали в период ожогового шока. Концентрацию цинка определяли с использованием наборов реагентов фирмы «Вектор-Бест», С-реактивного белка (СРБ) – с использованием реагентов фирмы «Human» на автоматическом анализаторе Furuno SA-180 (Япония). Содержание альбумина, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) оценивали на автоматическом анализаторе ILAB 650 (Италия, США, Япония) с использованием наборов реагентов фирмы «BioSystems». Концентрацию интерлейкина 6 (ИЛ-6) измеряли на микропланшетном фотометре Multiskan EX Thermo Labsystems (Финляндия) с использованием наборов реагентов фирмы «Вектор-Бест». Уровень пресепсина определяли на анализаторе Pathfast (Япония), прокальцитонина – на анализаторе Ramp (Канада).

Результаты исследований обрабатывали с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft, Inc.). Проверку гипотезы о нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. При описании данных, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану, первый и третий квартили – Me (Q1; Q3). Статистическую значимость различий между изучаемыми показателями вычисляли с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Для выявления взаимосвязей между переменными использовали критерии ранговой корреляции – коэффициент Спирмена (r) и коэффициент γ -корреляции. Критическая величина уровня значимости (p) принималась равной 0,05.

Результаты. Анализ проведенных исследований показал, что у большинства пациентов (91%, 21/23) в период ожогового шока отмечалось снижение уровня цинка. Содержание этого микроэлемента в сыворотке крови обследованных больных варьировало от 2,3 мкмоль/л до 10,2 мкмоль/л при диапазонах нормальных значений 11,1-19,5 мкмоль/л для мужчин и 10,7-17,5 мкмоль/л для женщин. Медиана концентрации цинка была статистически значимо снижена в 1,7 раза по сравнению со значением здоровых людей (см. таблицу).

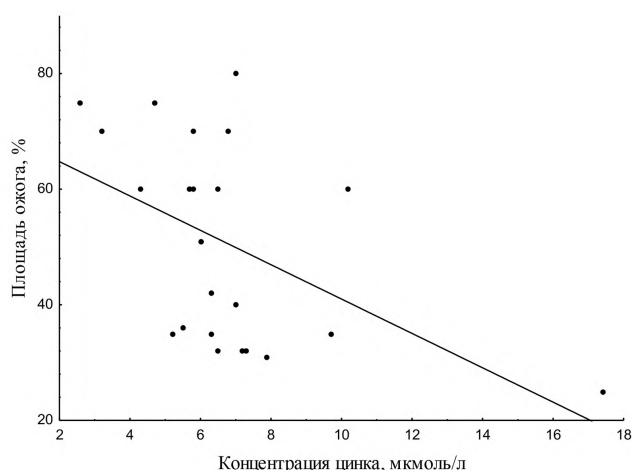
Анализ коррелятивных взаимоотношений концентрации Zn в сыворотке крови с площадью термического поражения выявил обратную зависимость средней силы (см. рисунок). Не было выявлено зависимости уровня цинка у обожженных больных от их возраста.

Обнаруженная в период ожогового шока гипоальбуминемия (статистически значимое снижение в 1,7 раза

по сравнению с медианой контрольной группы) была сопряжена со снижением уровня цинка ($r=0,52$, $p=0,01$). Отмечено повышение активности трансаминаз – АЛТ и АСТ – в 2,2 и 2,3 раза соответственно ($0,0001 < p < 0,02$). При этом частота встречаемости девиации активности аланинаминотрансферазы составила 35% (8/23), аспаратаминотрансферазы – 52% (12/23): увеличение в 3,8 и 3,6 раза по сравнению с медианой группы здоровых людей соответственно. Проведение корреляционного анализа также выявило сопряженность отклонений активности этих ферментов с изменениями концентрации цинка ($-0,59 < r < -0,61$, $0,008 < p < 0,009$).

Выявлено значительное увеличение концентрации С-реактивного белка и интерлейкина-6, имеющих между собой высокую степень сопряженности ($r=0,89$; $p=0,03$). Проведение корреляционного анализа обнаружило обратную зависимость концентрации цинка от уровня СРБ ($r=-0,41$, $p=0,04$), а также от уровня ИЛ-6 ($r=-0,63$, $p=0,03$). Также отмечена ассоциативная связь между концентрацией ИЛ-6 и активностью АЛТ ($r=0,8$, $p=0,005$).

В обследованной группе больных был зафиксирован случай летального исхода на 4-е сутки с момента получения травмы пациентом, у которого наблюдалось



Корреляционная взаимосвязь концентрации цинка в крови тяжелообожженных больных с площадью ожога ($r=-0,53$; $p=0,008$).

Лабораторные показатели сыворотки крови у пациентов в период ожогового шока

Показатели	Здоровые люди (n=24)	Пациенты в период ожогового шока (n=23)
Цинк, мкмоль/л	10,8 [9,7; 11,5]	6,3 [5,2; 7,0] $p=0,0001$
Альбумин, г/л	45,1 [42,8; 48,0]	27,3 [24,4; 30,9] $p=0,0001$
АЛТ, ед/л	14,2 [11,9; 18,8]	31,05 [17,85; 49,25] $p=0,0002$
АСТ, ед/л	18,1 [4,4; 22,5]	41,95 [23,75; 65,80] $p=0,01$
ИЛ-6, пг/мл	2,22 [1,59; 4,99]	47,6 [28,29; 74,28] $p=0,00001$
СРБ, мг/л	4,14 [3,0; 6,0]	87,7 [43,7; 133,7] $p=0,00001$

Примечание. p – достоверность различий по сравнению с показателями здоровых людей.

снижение уровня цинка с 2,3 ммоль/л в 1-е сутки до 1,1 ммоль/л на 4-е сутки. Усугубление гипопинкемии происходило на фоне развития раннего бактериального сепсиса, подтвержденного высокими значениями прокальцитонина (9,51 нг/мл при норме – до 0,36 нг/мл) и пресепсина (1290 пг/мл при норме – до 337 пг/мл).

Обсуждение. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о развитии гипопинкемии у тяжелообожженных больных уже с первых дней ожоговой болезни. Как показали данные корреляционного анализа, выраженность дефицита цинка имеет зависимость от тяжести полученной ожоговой травмы, что не согласуется с представленными данными G. Khorasani и соавт. [17] об отсутствии влияния площади ожога на изменение концентрации цинка.

Возможными причинами дефицита цинка при ожоговой болезни являются экссудативные потери, недостаточное поступление с пищей, повышенная экскреция с мочой [7], а также перераспределение цинка из крови в печень, чему, по всей видимости, способствует активирующее действие глюкокортикоидов на синтез транспортных белков – металлотионеинов [18, 19].

Другой вероятной причиной гипопинкемии может быть выявленный у всех пациентов низкий уровень альбумина – основного белка-транспортера Zn. Одной из причин такого снижения является дисфункция печени, проявляющаяся в нарушении синтеза белка. Кроме того, увеличение содержания свободных жирных кислот в плазме крови, характерное для острого периода ожоговой болезни [20], может способствовать снижению связывания и стехиометрического соотношения Zn^{2+} /альбумин [21, 22].

О дисфункции гепатоцитов и цитолитическом синдроме свидетельствовало и повышение активности АЛТ и АСТ. Выявленные корреляционные связи активности этих трансаминаз с изменениями концентрации цинка также могут свидетельствовать о роли нарушения функции печени в развитии гипопинкемии.

Наблюдаемые изменения содержания цинка происходили на фоне развития выраженного системного воспалительного ответа у всех пациентов, признаками которого являлось значительное увеличение концентрации «золотого маркера воспаления» – С-реактивного белка и провоспалительного цитокина – интерлейкина-6, а также снижение уровня негативного реактанта острой фазы воспаления – альбумина.

Принимая во внимание тот факт, что провоспалительные цитокины, включая ИЛ-6, ингибируют синтез альбумина в печени [23] и, таким образом, ограничивают его цинк-связывающую способность, можно предположить, что начальная гипопинкемия является отражением опосредованной интерлейкинами острофазной реакции организма в ответ на термическое поражение. Это предположение подтверждают выявленные обратные зависимости концентрации изучаемого микроэлемента от уровня СРБ и ИЛ-6.

Согласно литературным данным, клетки печени активируются с первых часов после получения ожоговой травмы и начинают вырабатывать провоспалительные медиаторы, что еще в большей степени усугубляет местное и системное воспаление [24]. Установленная нами сильная корреляционная связь между содержанием ИЛ-6 и активностью АЛТ подтверждает роль воспалительной реакции в развитии дисфункции печени.

Выявленный случай летального исхода у пациента с минимальными значениями уровня цинка среди остальных пациентов на фоне развития раннего бакте-

риального сепсиса согласуется с данными других исследований, показавших при других заболеваниях связь гипопинкемии с риском развития и неблагоприятного исхода септических осложнений [25-27]. Роль цинка в иммунной дисфункции при ожоговой болезни может заключаться в том, что гипопинкемия является одной из причин нарушения интестинального барьера, синдрома «дырявого кишечника» и, как следствие, бактериальной транслокации, способствующей усилению воспалительного ответа и развитию сепсиса [28, 29]. Кроме того, дефицит цинка оказывает влияние на Т-клеточное звено иммунитета и выработку цитокинов, снижение хемотаксиса нейтрофилов и их фагоцитарной активности [30]. В дополнение к неэффективному бактериальному клиренсу дефицит цинка сопровождается усилением воспалительной реакции, что усугубляет повреждение органов [31]. Несмотря на имеющиеся литературные данные о значимости дефицита цинка в иммунной дисфункции и его ассоциации с риском развития сепсиса, в связи с ограниченным количеством наблюдений в нашем исследовании требуется дальнейшее изучение возможности использования гипопинкемии как маркера ожогового сепсиса и предиктора летального исхода.

Заключение. С первых дней после травмы у тяжело-обожженных пациентов наблюдается выраженный дефицит цинка, который связан с развитием воспалительной реакции и гипопинкемией. В связи с плюрипотентной биологической ролью цинка и его участием в обеспечении многих витальных процессов, необходимо дальнейшее исследование молекулярных механизмов регуляции уровня этого микроэлемента у обожженных пациентов с целью оценки степени его вовлеченности в патогенез заболевания, возможности использования в качестве прогностического маркера развития сепсиса и неблагоприятного исхода при ожоговой болезни, а также разработки оптимальных путей коррекции гипопинкемии, способствующих эффективному лечению ожоговой болезни.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4-11, 13-19, 21, 23-31 см. REFERENCES)

3. Хакимов Э.А. Оценка эффективности и профилактики, и лечения синдрома полиорганной недостаточности у тяжелообожженных. *Инновационная медицина Кубани*. 2019; 1 (13): 28-35.
12. Преснякова М.В., Костина О.В., Альбицкая Ж.В. Биологическая роль цинка и его значимость в патогенезе расстройств аутистического спектра. *Социальная и клиническая психиатрия*. 2019; 29(3): 63-70.
20. Вильяева М.В. Использование определения содержания длинноцепочечных и короткоцепочечных свободных жирных кислот в оценке эффективности лечения с использованием патогенетически обоснованных препаратов. *Вестник Мордовского университета*. 2013; 1-2: 41-45.
22. Шейбак В.М. Транспортная функция сывороточного альбумина: цинк и жирные кислоты. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2015; 14(2): 16-22.

REFERENCES

1. Sommerhalder C., Blears E., Murton A.J., Porter C., Finnerty C., Herndon D.N. Current problems in burn hypermetabolism. *Curr. Probl. Surg.* 2020; 57(1): 100709. DOI: 10.1016/j.cpsurg.2019.100709.
2. Zhang P., Zou B., Liou Y.C., Huang C. The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury. *Burns Trauma*. 2021; 9: tkaa047. DOI: 10.1093/burnst/tkaa047.
3. Khakimov E.A. Evaluation of the effectiveness of both prevention and treatment of multiple organ failure syndrome in patients with severe burns. *Innovatsionnaya meditsina Kubani*. 2019; 1(13): 28-35. (in Russian)
4. Jeschke M.G., Chinkes D.L., Finnerty C.C., Kulp G., Suman O.E., Norbury W.B. et al. Pathophysiologic response to severe burn injury. *Ann. Surg.* 2008; 248(3): 387-401. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181856241.
5. Rehov S., Shahrokhi S., Natanson R., Stanojcic M., Jeschke M.G. Antioxidant and trace element supplementation reduce the inflammatory response in critically ill burn patients. *J. Burn. Care Res.* 2018; 39(1): 1-9. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000607.

6. Sterling J.P., Lombardi V.C. Decreasing the likelihood of multiple organ dysfunction syndrome in burn injury with early antioxidant treatment. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(8): 1192. DOI: 10.3390/antiox10081192.
7. Żwierello W., Styburski D., Maruszewska A., Piorun K., Skórka-Majewicz M., Czerwińska M. et al. Bioelements in the treatment of burn injuries – the complex review of metabolism and supplementation (copper, selenium, zinc, iron, manganese, chromium and magnesium). *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2020; 62: 126616. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126616.
8. Kurmis R., Greenwood J. Trace element supplementation following severe burn injury: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Burn Care & Research*. 2016; 37 (3): 143–59. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000259.
9. Hübner C., Haase H. Interactions of zinc- and redox-signaling pathways. *Redox Biol.* 2021; 41: 101916. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101916.
10. Berger M.M., Binnert C., Chiolerio R.L., Taylor W., Raffoul W., Cayeue M.C. et al. Trace element supplementation after major burns increases burned skin trace element concentrations and modulates local protein metabolism but not whole-body substrate metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007; 85(5): 1301-6. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1301.
11. Wang X.X., Zhang M.J., Li X.B. Advances in the research of zinc deficiency and zinc supplementation treatment in patients with severe burns. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2018; 34(1): 57-9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2018.01.012.
12. Presnyakova M.V., Kostina O.V., Al'bitskaya Zh.V. Biological role of zinc and its importance for pathogenesis of autistic spectrum disorders. *Sotsial'naya i klinicheskaya psichiatriya*. 2019; 29(3): 63-70. (in Russian)
13. Baranaukas M.N., Powell J., Fly A.D., Martin B.J., Mickleborough T.D., Paris H.L. et al. Influence of zinc on the acute changes in erythropoietin and proinflammatory cytokines with hypoxia. *High Alt. Med. Biol.* 2021; 22(2): 148-56. DOI: 10.1089/ham.2020.0190.
14. Lin P.H., Sermersheim M., Li H., Lee P.H.U., Steinberg S.M., Ma J. Zinc in wound healing modulation. *Nutrients*. 2017; 10(1): 16. DOI: 10.3390/nu10010016.
15. Jafari P., Thomas A., Haselbach D., Watfa W., Pantet O., Michetti M. et al. Trace element intakes should be revisited in burn nutrition protocols: a cohort study. *Clin. Nutr.* 2018; 37(3): 958-64. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.03.028.
16. Olson L.M., Coffey R., Porter K., Thomas S., Bailey J.K., Jones L.M. et al. The impact of serum zinc normalization on clinical outcomes in severe burn patients. *Burns*. 2020; 46(3): 589-95. DOI: 10.1016/j.burns.2019.08.012.
17. Khorasani G., Hosseinimehr S.J., Kaghazi Z. The alteration of plasma's zinc and copper levels in patients with burn injuries and the relationship to the time after burn injuries. *Singapore Med. J.* 2008; 49(8): 627-30. PMID: 18756346.
18. Agay D., Anderson R.A., Sandre C., Bryden N.A., Alonso A., Roussel A.M. et al. Alterations of antioxidant trace elements (Zn, Se, Cu) and related metallo-enzymes in plasma and tissues following burn injury in rats. *Burns*. 2005; 31(3): 366-71. DOI: 10.1016/j.burns.2004.11.010.
19. Jafari P., Thomas A., Haselbach D., Watfa W., Pantet O., Michetti M. et al. Trace element intakes should be revisited in burn nutrition protocols: A cohort study. *Clin. Nutr.* 2018; 37(3): 958-64. DOI: 10.1016/j.clnu.2017.03.028.
20. Vil'dyaeva M.V. The use of determination of the content of long-chain and short-chain free fatty acids in the evaluation of the effectiveness of treatment using pathogenetically based drugs. *Vestnik Mordovskogo universiteta*. 2013; 1-2: 41-5. (in Russian)
21. Lu J., Stewart A.J., Sadler P.J. et al. Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site. *Biochem. Soc. Trans.* 2008; 36: 1317–21. DOI: 10.1042/bst0361317.
22. Sheybak V.M. Transport function of serum albumin: zinc and fatty acids. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2015; 14(2): 16-22. (in Russian)
23. Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014; 6 (10): a016295. DOI: 10.1101/cshperspect.a016295.
24. Idrovo J.P., Boe D.M., Kaahui S., Yang W.L., Kovacs E.J. Hepatic inflammation after burn injury is associated with necroptotic cell death signaling. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2020; 89(4): 768-74. DOI: 10.1097/TA.0000000000002865.
25. Maeres M., Haase H. Zinc and immunity: An essential interrelation. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016; 611: 58-65. DOI: 10.1016/j.abb.2016.03.022.
26. Cirino Ruocco M.A., Pacheco Cechinatti E.D., Barbosa F.Jr., Navarro A.M. Zinc and selenium status in critically ill patients according to severity stratification. *Nutrition*. 2018; 45: 85-9. DOI: 10.1016/j.nut.2017.07.009.
27. Xu X., Meng J., Fang Q. Prognostic value of serum trace elements Copper and Zinc levels in sepsis patients. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2020; 32(11): 1320-3. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200313-00216.
28. Skrovanek S., DiGuilio K., Bailey R., Huntington W., Urbas R. et al. Zinc and gastrointestinal disease. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 2014; 5(4): 496-513. DOI: 10.4291/wjgp.v5.i4.496.
29. Van Spaendonck H., Ceuleers H., Witters L., Patteet E., Joossens J., Augustyns K. et al. Regulation of intestinal permeability: the role of proteases. *World J. Gastroenterol.* 2017; 23(12): 2106-23. DOI: 10.3748/wjg.v23.i12.2106.
30. Souffriau J., Libert C. Mechanistic insights into the protective impact of zinc on sepsis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018; 39: 92-101. DOI: 10.1016/j.cytogr.2017.12.002.
31. Hoeger J., Simon T.P., Beeker T., Marx G., Haase H., Schuerholz T. Persistent low serum zinc is associated with recurrent sepsis in critically ill patients – a pilot study. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0176069. DOI: 10.1371/journal.pone.0176069.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Селезнева И.А.¹, Гильмиярова Ф.Н.¹, Тлустенко В.С.¹, Доменюк Д.А.², Гусякова О.А.¹, Колотьева Н.А.¹,
Гильмиярова И.Е.³, Назаркина И.А.¹

ГЕМАТОСАЛИВАРНЫЙ БАРЬЕР: СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, МЕТОДЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 355017, Ставрополь, Россия;

³ГБУЗ СО «Самарская стоматологическая поликлиника № 3», 443045, Самара, Россия

Организм человека состоит из различных систем (кровь, ткани, внеклеточная жидкость, внутриклеточное содержимое), разделённых биологическими мембранами. Физиологические барьеры обеспечивают сохранение постоянства физико-химического состава внутренней среды и защиту организма от изменений окружающей среды. Проницаемость гистогематического барьера зависит от концентрации веществ, находящихся в крови, состояния организма, внешних воздействий и ряда других причин, обусловленных раздражениями, поступающими из внешней или внутренней среды. Информация о состоянии регуляторных систем организма оказывает своё действие на специфические хеморецепторы, что ведёт к возникновению местных и общих физиологических и биохимических процессов. По локализации различают гематоэнцефалический, гематоплацентарный, гематоофтальмический, гематосаливарный барьеры. В последнее время особое место в изучении занимает гематосаливарный барьер, благодаря которому осуществляется избирательное поступление веществ из крови в ротовую жидкость. Функционирование его зависит от процессов, происходящих в организме, что осуществляется селективной проницаемостью для веществ, определяющих своим составом состояние главной внутренней среды организма – крови. Гематосаливарный барьер – важное звено в поддержании гомеостаза, что отражается в метаболических параметрах ротовой жидкости.

Ключевые слова: обзор; гистогематические барьеры; гематосаливарный барьер; ротовая жидкость; слюна.

Для цитирования: Селезнева И.А., Гильмиярова Ф.Н., Тлустенко В.С., Доменюк Д.А., Гусякова О.А., Колотьева Н.А., Гильмиярова И.Е., Назаркина И.А. Гематосаливарный барьер: строение, функции, методы (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 334-338. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-334-338>

Для корреспонденции: Селезнева Инна Александровна, д-р мед. наук, доц. каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: bio-sam@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.03.2022

Принята к печати 30.03.2022

Опубликовано 20.06.2022

Selezneva I.A.¹, Gilmiyarova F.N.¹, Tlustenko V.S.¹, Domenjuk D.A.², Gusyakova O.A.¹, Kolotyeva N.A.¹,
Gilmiyarova I.E.¹, Nazarkina I.A.¹

HEMATOSALIVARIAN BARRIER: STRUCTURE, FUNCTIONS, STUDY METHODS (REVIEW OF LITERATURE)

¹FSBEI HE «Samara State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 443099, Samara, Russia;

²FSBEI HE «Stavropol State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 355017, Stavropol, Russia;

³SBHI SR «Samara Dental Clinic No. 3», 443045, Samara, Russia

The human body consists of various systems (blood, tissues, extracellular fluid, intracellular contents) separated by biological membranes. Physiological barriers ensure the physico-chemical composition of the internal environment remains constant and protects the body from environmental changes. The permeability of the histohematic barrier depends on the concentration of substances in the blood, the body's condition, external influences, and a number of other reasons caused by stimuli coming from the external or internal environment. Information about the state of the regulatory systems of the body has its effect on specific chemoreceptors, which leads to the emergence of local and general physiological and biochemical processes. According to their localization, they distinguish between the hematoencephalic, hemato-placental, hemato-ophthalmic, and hemato-salivary barriers. Recently, the hematosalivary barrier, through which the selective entry of substances from the blood into the oral fluid is carried out, has taken a special place in the study. Its functioning depends on the processes occurring in the body, which is carried out by selective permeability for substances that determine the composition of the main internal environment of the body – blood. Hematosalivary barrier is an important link in maintaining homeostasis, which is reflected in the metabolic parameters of oral fluid.

Key words: review; histohematic barriers; hematosalivary barrier; oral fluid; saliva.

For citation: Selezneva I.A., Gilmiyarova F.N., Tlustenko V.S., Domenjuk D.A., Gusyakova O.A., Kolotyeva N.A., Gilmiyarova I.E., Nazarkina I.A. Hematosalivarian barrier: structure, functions, study methods (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 334-338 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-334-338>

For correspondence: Selezneva Inna Alexandrovna, MD, docent of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics; e-mail: bio-sam@yandex.ru

Information about authors:

Selezneva I.A., <https://orcid.org/000-0001-6647-5330>;

Gilmiyarova F.N., <https://orcid.org/0000-0001-5992-3609>;

Tlustenko V.S., <https://orcid.org/0000-0002-2756-5277>;

Domenyuk D.A., <https://orcid.org/0000-0003-4022-5020>;
Gusyakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>;
Kolotyeva N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7583-6222>;
Gilmiyarova I.E., <https://orcid.org/0000-0003-2729-7601>;
Nazarkina I.A., <https://orcid.org/0000-0001-7115-6430>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 02.03.2022

Accepted 30.03.2022

Published 20.06.2022

Введение. Для нормального функционирования жизнедеятельности организма необходимым условием является постоянство внутренней среды. В основе поддержания гомеостаза лежат многочисленные физиологические механизмы, одним из которых является наличие гистогематических барьеров. Впервые термин «гистогематический барьер» в 1929 г. применил советский физиолог Л.С. Штерн, согласно которому, гистогематические барьеры – это пластичные, подвижные аппараты, принимающие участие в поддержании постоянства внутренней среды и функции которых можно регулировать с помощью экзогенных и эндогенных физиологически активных веществ [1]. При помощи гистогематических барьеров осуществляется переход электролитов, белков с небольшой молекулярной массой, продуктов метаболизма, факторов специфической и неспецифической защиты из крови в тканевую жидкость, что способствует дыханию, трофике, пролиферации и дифференцировке клеток, удалению ненужных компонентов из органов и тканей, образующихся в ходе обмена веществ [2]. Благодаря важному свойству гистогематического барьера в виде способности к изменению проницаемости под влиянием вегетативной нервной системы и гуморальных факторов, воздействие различных биоактивных стимулов, проникающих через тот или иной барьер, приводит к появлению новых физиологических и биохимических реакций, как локальных, так и организма в целом [3].

Гистогематические барьеры реализуют свои функции за счет избирательной проницаемости, которая обусловлена особенностью их строения. По локализации различают гематоэнцефалический, гематоплацентарный, гематоофтальмический, гематосаливарный барьеры [4]. Кроме того, клеточные и внутриклеточные мембраны, кожа и слизистые оболочки также являются своеобразными барьерами [5].

Таким образом, гистогематические барьеры являются неотъемлемой частью в поддержании гомеостаза, как отдельных органов, так и организма в целом. Последнее время особое место в изучении структуры и свойств занимает гематосаливарный барьер, который был описан подробно Ю.А. Петровичем и соавт. [3], и представляет собой механизм, регулирующий избирательное поступление веществ из крови в ротовую жидкость.

Цель данного обзора – охарактеризовать гематосаливарный барьер, строение, функции, методы исследования.

Гематосаливарный барьер образуют эндотелий, выстилающий изнутри стенку капилляров, миоэпителиальные и секреторные клетки и клетки выводных протоков слюнных желез [6]. В дополнение к перечисленным структурам содержатся и другие типы клеток: клетки Лангерганса, меланоциты, клетки Меркеля, которые способствуют функционированию гематосаливарного барьера [7]. В местах соединения эпителиальных клеток образуются так называ-

емые плотные контакты, которые играют роль в клеточной полярности, действуя как препятствие, предотвращающее латеральное перемещение белков между апикальной и базолатеральной мембранами [8]. Они также создают первичный барьер против параклеточной диффузии растворенных веществ, поддерживая селективные трансэпителиальные ионные градиенты, необходимые для секреции слюны [9, 10] и выступают в роли мишеней и эффекторов сигнальных путей, контролирующих экспрессию генов, дифференцировку и пролиферацию клеток [11]. Важным компонентом гематосаливарного барьера являются миоэпителиальные клетки – тонкие структуры веретенообразной формы, локализованные между ацинарными и мелкими протоковыми эпителиальными клетками на одном уровне и базальной мембраной на другом [12]. Они охватывают секреторные клетки слюнных желез своими отростками, благодаря чему при сокращении миоэпителиальных клеток происходит выделение слюны. В свою очередь, выводные протоки слюнных желез окружены рыхлой волокнистой соединительной тканью.

Слюнные железы – хорошо кровоснабжаемые органы, что достигается за счет образования многочисленных артериоловеноулярных анастомозов, снабженных сфинктерами. При их закрытии происходит повышение давления в капиллярах слюнных желез, в результате чего обеспечивается проникновение различных метаболитов из просвета капилляра в клетки секреторного эпителия, необходимых для образования слюны [13]. Слюнные железы обладают высокой селективностью деятельности, что позволяет говорить о функционировании гематосаливарного барьера, изменением его проницаемости в ответ на любые физиологические или патологические сдвиги в организме [13, 14]. Поступление веществ через гистогематические барьеры в большей степени достигается путем простой пассивной диффузии (в основном, параклеточной), активным транспортом или эндоцитозом, что определяется в основном липофильностью, зарядом и размером проникающего вещества [15]. При этом считается, что большинство веществ, имеющих белковую природу, транспортируется через слизистую оболочку рта параклеточным механизмом за счёт пассивной диффузии [16]. Подчеркивается значение функционирования гематосаливарного барьера в этиологии, патогенезе, диагностике, профилактике и патогенетически обоснованном лечении многих стоматологических заболеваний во взаимосвязи с ответной реакцией целостного организма. Изучение цитокинового профиля ротовой жидкости у больных с одонтогенными гнойно-воспалительными процессами показало, что изменение содержания основных классов иммуноглобулинов и их соотношение в крови и слюне коррелируют не только друг с другом, но и с выраженностью воспалительного процесса [17]. Так, увеличение концентрации провоспалительных цитокинов в

ротовой жидкости при хроническом пародонтите сопряжено с повышением степени заболевания, что связано с подавлением нормального процесса ресинтеза соединительной ткани, угнетением остеосинтетических процессов, сопровождающихся подавлением остеобразования [18].

Открытие селективной (избирательной) проницаемости гематосаливарного барьера благодаря изучению водных и ионных каналов обеспечило возможность разработки новых диагностических и прогностических способов констатации различных заболеваний [19, 20]. Так, о селективной проницаемости гематосаливарного барьера при различной соматической патологии свидетельствует различное содержание меди в ротовой жидкости у пациентов с красным плоским лишайём, диагностированным в ротовой полости, и у участников контрольной группы. При этом в сыворотке крови содержание микроэлемента остаётся неизменным в обеих группах, что позволяет обосновать клиническую симптоматику грибкового поражения полости рта, применив эффективные диагностические маркеры данного процесса [21].

При хроническом гастродуодените у детей изменение барьерной функции оказалось направлено в сторону её ослабления и преимущественного накопления продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида, диеновых конъюгатов), холестерина, NO, Na⁺, Ca²⁺, летучих жирных кислот в слюне [22].

Доказана патогенетическая роль гематосаливарного барьера в формировании бронхиальной обструкции у курильщиков и у здоровых лиц. В частности, имеются данные об изменении проницаемости гематосаливарного барьера в условиях длительной никотиновой интоксикации в сочетании с хронической обструктивной болезнью лёгких, что проявляется в виде изменения концентрации таких показателей, как интерлейкин-β, фактор некроза опухолей (ФНО-α), кальция, магния, свободного железа и ферментов – лактатдегидрогеназы, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы. При этом у пациентов с тяжёлым течением хронической обструктивной болезни лёгких зарегистрирована высокая степень проницаемости гематосаливарного барьера для ферментов лактатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы [23]. Таким образом, гематосаливарный барьер имеет определённое значение в провокации системного воспалительного ответа.

Отмечено, что у большинства людей в слюне возможно обнаружить некоторые группоспецифические антигены, которые располагаются на поверхности мембраны эритроцитов. Одними из таких антигенов являются антигены А и В, формирующие группу крови по системе АВ0. В данном случае они выполняют защитную функцию, так как способны нейтрализовать поступающие с пищей в организм гемагглютинины и гемолизины [24]. Определение антигенов различных систем групп крови в секретах имеет прикладное значение, так как используется в судебной медицинской экспертизе с целью установление личности подозреваемого. Однако следует обратить внимание на то, что не у всех людей возможно определить наличие антигенов АВ0 в слюне [25]. Данный факт доказывает уникальность структуры гематосаливарного барьера каждого индивидуума.

Методы исследования гематосаливарного барьера. Для изучения строения и функционирования гематосаливарного барьера учёные зачастую прибегают к тканевой инженерии, за счет чего достигается моделирование эпителия ротовой полости и слюнных желез *in vitro* с по-

мощью выращивания клеточных монослоев. Так, было разработано множество моделей, однако окончательной стандартизированной модели не было создано ни для моделей ротовой полости, ни для эпителия слюнных желез. При этом было показано, что эпителиальный слой разных областей ротовой полости, таких, как язык, десны, щёки отличается по своим барьерным свойствам, причём проницаемость гематосаливарного барьера способна меняться в разных условиях. Это также справедливо для эпителия слюнных желез (ацинусы, протоковые клетки). Кроме того, вероятны различия между тремя основными слюнными железами (подчелюстная, околоушная и подъязычная), а также сотнями второстепенных слюнных желез. Например, согласно проведённым экспериментам по изучению ультраструктурных изменений проницаемости гематосаливарного барьера, самые значимые изменения протекают на поверхности клеток эндотелия при воздействии на них низких температур. В результате такого воздействия на внешней и внутренней сторонах капилляров увеличивается число инвагинаций, микровилл (микроволосковых выпячиваний) и эндоцитозных везикул, что свидетельствует о повышенной функциональной активности гематосаливарного барьера в ответ на холод [26]. Изменения проницаемости гематосаливарного барьера также происходят в условиях гипергликемии, что в значительной степени влияет на протеомный состав ротовой жидкости за счёт увеличения в ней содержания таких белков, как альбумин, цистатин-SA, цистатин-SN и α-амилаза, которые коррелируют с увеличением уровня гликированного гемоглобина в сыворотке крови [27].

Тем не менее, благодаря моделированию гематосаливарного барьера *in vitro* удалось установить виды контактов между эпителиальными клетками, что обуславливает функцию избирательной проницаемости и влияет на компонентный состав слюны. Парацеллюлярная барьерная функциональность эпителия в значительной степени определяется плотными соединениями, адгезионными соединениями и десмосомами, которые являются основными компонентами многопротеинового комплекса, называемого апикальным соединительным комплексом, расположенным на конце боковой плазматической мембраны [28]. В первую очередь, плотные соединения действуют как парацеллюлярные ворота, которые ограничивают диффузию ионов и растворенных веществ в зависимости от их молекулярного размера и заряда [29]. В слоях эпителиальных клеток плотные соединения представляют собой узкие ленточные структуры, локализованные в апикальной области боковой плазматической мембраны и многократно анастомозирующие между собой. Белки, входящие в их состав, принадлежат к семейству клаудинов. В настоящее время идентифицировано более 20 видов клаудинов [30]. Не менее важными белками являются окклюдин или трицеллюлин, которые являются трансмембранными белками. Они связаны с актиновым цитоскелетом через закрепленные на мембране каркасные белки, такие как ZO-1 и ZO-2 [31]. Для подтверждения функционирования гематосаливарного барьера часто используется гистологический анализ, визуализирующий структуру плотных соединений с помощью просвечивающей электронной микроскопии (обычный или сублимационный разрыв) или белки плотных соединений с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Кроме того, экспрессия окклюдина и трицеллюлина в основном исследуется либо методом ПЦР, либо методом Вестерн-блот-анализа на уровне мРНК или самого белка, а для

того, чтобы понять изменения гематосаливарного барьера на функциональном уровне, проводятся исследования проницаемости с помощью парацеллюлярных маркерных молекул, которые подкрепляются анализом изображений для визуализации локализации белков [32]. Было показано, что в слюнных железах плотные соединения регулируют однонаправленную секрецию слюны и поддерживают клеточный барьер между кровью и тканевыми жидкостями [33]. Экспрессия и организация плотных контактов меняются в зависимости от физиологических и патологических процессов. Например, ацинусы слюнных желез обеспечивают парацеллюлярный поток воды, в то время как протоки остаются непроницаемыми для воды во время секреции слюны [34].

Следует отметить роль рогового слоя эпителия, который также поддерживает парацеллюлярную избирательную проницаемость слизистой оболочки полости рта. Так, ороговевающие эпителиальные клетки высвобождают гранулы во время процессов дифференцировки. Эти гранулы содержат липиды (например, глюкозилцерамиды), гидролитические ферменты и белки (например, корнеодезмозин), которые выходят из гранул и распространяются по поверхности клеток для поддержания образования толстой клеточной оболочки, устойчивой к кератинолитическим агентам. Такой слой непроницаем для воды и является очень прочным экраном, предотвращающим парацеллюлярную проницаемость в ороговавшем многослойном плоском эпителии слизистой оболочки полости рта [35].

Как уже было сказано выше, функция биологического барьера *in vitro* может определяться парацеллюлярным потоком ионов или гидрофильных молекул, которые путём пассивного транспорта секретируются в биологические жидкости. Парацеллюлярный поток ионов возможно измерить трансэпителиальным/трансэндотелиальным электрическим сопротивлением или использованием так называемых парацеллюлярных маркерных молекул.

Измерение трансэпителиального/трансэндотелиального электрического сопротивления является широко используемым неинвазивным количественным методом для оценки целостности барьера моделей клеток, выращенных на специальных пористых мембранах, являющихся фильтрами. Для данной цели широко используются простые устройства, состоящие из двух электродов. Кроме того, простой в использовании физический метод, называемый импедансной спектроскопией, позволяет проводить непрерывный анализ как трансэпителиального/трансэндотелиального электрического сопротивления, так и электрической емкости, предоставляя дополнительную информацию о барьерных свойствах клеток, выращенных на фильтрах. Этот метод полезен в качестве контроля качества клеток, образующих барьер. Другой подход, основанный на импедансе, требует, чтобы клетки выращивались непосредственно на твердых микроструктурированных электродах [36].

Было разработано значительно меньше моделей эпителия слюнных желез *in vitro* по сравнению с моделями эпителия слизистой оболочки полости рта. Наиболее подробное описание моделей клеток слюнных желез, а также их применение в биоинженерии дали J. Nelson и соавт. [37]. В частности, авторы уделяют большое внимание прикладным исследованиям гематосаливарного барьера слюнных желез с целью создания искусственных слюнных желез для пациентов с пониженной саливацией. В связи с этим *in vitro* выращиваются культуры клеток, моделирующие человеческие слюнные железы. HSY – это

линия неопластических эпителиальных клеток, которая была создана из опухолей мышечной ткани после трансплантации образцов аденокарциномы околоушной железы человека [38]. Структурно клетки HSY кубовидной формы и имеют папиллярные образования, сформированные за счёт цитоплазматических отростков и микроворсинок на их свободной границе. Эти клетки способны устанавливать межклеточные связи, такие как десмосомы и плотные соединения. Кроме того, они способны секретировать α -амилазу, что является огромным преимуществом для использования такой культуры клеток в качестве модели искусственной слюнной железы [39].

В настоящее время использование первичных клеток представляет собой наилучший вариант для создания искусственной слюнной железы, поскольку они более похожи на нативную ткань. Кроме того, их можно подвергать различным модификациям *in vitro*, а затем пересадить в организм, из которого они были получены. Однако есть определенные проблемы применения первичных клеток, связанных с невозможностью преобразовываться в ацинусы слюнных желез *in vitro* и высокой склонностью к апоптозу [37]. Использование стволовых клеток и клеток-предшественниц для создания искусственной слюнной железы является относительно новым методом для улучшения современных методов лечения гипосаливации, так как они обладают высоким потенциалом дифференцировки и замещения поврежденных тканей поврежденных слюнных желез [40]. Особенно привлекательной моделью для создания искусственной слюнной железы являются клетки-предшественники новорожденных, поскольку было обнаружено, что они участвуют в регенерации ацинарных, протоковых и миоэпителиальных клеток слюнных желез *in vitro* [41].

Заключение. Таким образом, функционирование гематосаливарного барьера подтверждает его основную роль – выступать в качестве некоего неспецифического адаптивного механизма защиты от негативных факторов внутри организма человека. Переход метаболитов, медиаторов, ферментов, гормонов через гематосаливарный барьер зависит не только от величины молекул, размеров пор в мембранах, открытия и закрытия ионных каналов, электрического заряда, растворимости в липидах, но и от потребностей в целом, нервных и гуморальных влияний, скорости кровотока, микроциркуляции, площади открытых и резервных капилляров, наличия или отсутствия функциональных и морфологических нарушений. Работу гематосаливарного барьера отражают различные метаболические параметры ротовой жидкости, способные изменяться при малейших сдвигах в состоянии организма. В свою очередь, саливадиагностические индикаторы показывают функциональное состояние барьера на уровне организма в целом, обеспечивающего перераспределение различных компонентов между кровью и ротовой жидкостью в ответ на любые метаболические сдвиги в организме.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7-12, 15-17, 23, 26-41 см. REFERENCES)

1. Рувинская Г.Р., Мухамеджанова Л.Р. Гематосаливарный барьер: морфофункциональные особенности в норме и патологии. *Практическая медицина*. 2013; 4 (13): 21-5.
2. Чуйкин С.В., Акмалова Г.М. Концепция гематосаливарного барьера. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2015; 5(59): 103-7.
3. Петрович Ю. А., Подорожная Р.П., Киченко С.М. Гематосаливарный барьер. *Российский стоматологический журнал*. 2004; 4: 39-45.

4. Быков В.Л. Гистология и эмбриональное развитие органов полости рта человека. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
5. Вавилова Т. П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008.
6. Акмалова Г.М. Клиническое значение гематосаливарного барьера при некоторых соматических заболеваниях. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 4: 386.
13. Коротко Г.Ф. Секреты слюнных желез и элементы саливадиагностики. М.: Издательский Дом «Академия Естествознания»; 2006.
14. Носков В. Б. Слюна в клинической лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 6: 14–7.
18. Проходная В. А., Гайворонская Т.В. Цитокиновый профиль ротовой жидкости у беременных женщин с воспалительными заболеваниями пародонта. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 3(4): 655–60.
19. Чуйкин С. В., Капустина Е.В. Особенности микроэлементного состава слюны и крови у детей с хронической почечной недостаточностью. *Уральский медицинский журнал*. 2007; 3: 58–60.
20. Чуйкин С. В., Штанько М.И. Оценка эффективности применения жевательного фитосубстрата в комплексной профилактике и лечении стоматологических заболеваний у пациентов пожилого возраста. *Пародонтология*. 2014; 19(1): 48–51.
21. Чуйкин С. В., Акмалова Г.М., Гильманов А.Ж., Гареев Е.М. Состояние проницаемости гематосаливарного барьера при красном плоском лишае слизистой оболочки рта. *Проблемы стоматологии*. 2016; 12: 11–8.
22. Краснова Е. Е., Чемоданов В.В., Егорова Е.Ю. Характеристика гематосаливарного барьера у детей с гастроудоденальными заболеваниями. *Успехи современного естествознания*. 2006; 3: 13–6.
24. Донсков С.И., Уртаев Б.М., Дубинкин И.В. Новая тактика гемотрансфузионной терапии – от совместимости к идентичности. Руководство для специалистов производственной и клинической трансфузиологии. М.: Бином; 2015.
25. Селезнева И.А., Гильмиярова Ф.Н., Кузьмичева В.И., Колотьева Н.А., Гусьякова О.А., Ерещенко А.А. и др. Секреторный статус ротовой жидкости по антигенам А и В здоровых добровольцев. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(4): 548–56.
17. Khash H., Baiju C. S., Rohatgi Bansal S. Salivary Biomarkers: A Periodontal Overview. *J. Oral. Health Comm. Dent*. 2012; 6(1): 28–33.
18. Prokhodnaya V. A., Gayvoronskaya T.V. Cytokine profile of oral fluid in pregnant women with inflammatory periodontal disease. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015; 3(4): 655–60. (in Russian)
19. Chuykin S. V., Kapustina E.V. Features of the microelement composition of saliva and blood in children with chronic renal failure. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2007; 3: 58–60. (in Russian)
20. Chuykin S. V., Shtan'ko M.I. Evaluation of the effectiveness of chewing phytosubstrate in the complex prevention and treatment of dental diseases in elderly patients. *Parodontologiya*. 2014; 19(1): 48–51. (in Russian)
21. Chuykin S. V., Akmalova G.M., Gil'manov A.J., Gareev E.M. State of hematosalivary barrier permeability in red squamous lesions of the oral mucosa. *Problemy stomatologii*. 2016; 12: 11–8. (in Russian)
22. Krasnova E. E., Chemodanov V.V., Egorova E. Yu. Characteristics of the hematosalivary barrier in children with gastroduodenal diseases. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 2006; 3: 13–6. (in Russian)
23. Ji J., von Schéele I., Bergström J., Billing B., Dahlén B., Lantz A.S. et al. Compartment differences of inflammatory activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res*. 2014; 15(1): 104.
24. Donskov S.I., Urtaev B.M., Dubinkin I.V. New tactics of hemotransfusion therapy – from compatibility to identity. Guidelines for specialists in industrial and clinical transfusiology [Novaya taktika gemotransfuzionnoy terapii – ot sovmestimosti k identichnosti. Rukovodstvo dlya specialistov proizvodstvennoy i klinicheskoy transfuziologii]. Moscow: Binom; 2015. (in Russian)
25. Selezneva I.A., Gil'miyarova F.N., Kuz'micheva V.I., Kolot'eva N.A., Gusyakov O.A., Ereshchenko A.A. et al. Secretory status of oral fluid by A and B antigens in healthy volunteers. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(4): 548–56. (in Russian)
26. Pedersen A., Sørensen C.E., Proctor G.B., Carpenter G.H. Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral. Dis*. 2018; 24(8):1399–1416.
27. Bencharit S., Baxter S.S., Carlson J., Byrd W.C., Mayo M.V., Border M.B. et al. Salivary proteins associated with hyperglycemia in diabetes: a proteomic analysis. *Mol. Biosyst*. 2013; 9(11): 2785–97.
28. Tsukita S., Furuse M., Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2001; 2(4): 285–93.
29. Zihni C., Mills C., Matter K., Balda M.S. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2016; 17(9): 564–80.
30. Mineta K., Yamamoto Y., Yamazaki Y., Tanaka H., Tada Y., Saito K. et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*. 2011; 585(4): 606–12.
31. González-Mariscal L., Domínguez-Calderón A., Raya-Sandino A., Ortega-Olvera J.M., Vargas-Sierra O., Martínez-Revollar G. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Semin Cell Dev. Biol*. 2014; 36: 213–23.
32. Appelt-Menzel A., Cubukova A., Günther K., Edenhofer F., Piontek J., Krause G. et al. Establishment of a Human Blood-Brain Barrier Co-culture Model Mimicking the Neurovascular Unit Using Induced Pluri- and Multipotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017; 8(4): 894–906.
33. Baker O.J. Tight junctions in salivary epithelium. *J. Biomed. Biotechnol*. 2010; 2010: 278948.
34. Kawedia J.D., Nieman M.L., Boivin G.P., Melvin J.E., Kikuchi K., Hand A.R. et al. Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2007; 104(9): 3621–6.
35. Hayward A. F. Membrane-coating granules. *Int. Rev. Cytol*. 1979; 95:97–127.
36. Benson K., Cramer S., Galla H.J. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS*. 2013; 10(1): 5.
37. Nelson J., Manzella K., Baker O.J. Current cell models for bioengineering a salivary gland: a mini-review of emerging technologies. *Oral Dis*. 2013; 19(3): 236–44.
38. Hayashi Y., Yanagawa T., Yoshida H., Azuma M., Nishida T., Yura Y. et al. Expression of vasoactive intestinal polypeptide and amylase in a human parotid gland adenocarcinoma cell line in culture. *J. Natl. Cancer Inst*. 1987; 79(5): 1025–37.
39. Joraku A., Sullivan C.A., Yoo J.J., Atala A. Tissue engineering of functional salivary gland tissue. *Laryngoscope*. 2005; 115: 244–8.
40. Feng J., van der Zwaag M., Stokman M.A., van Os R., Coppes R.P. Isolation and characterization of human salivary gland cells for stem cell transplantation to reduce radiation-induced hyposalivation. *Radiother. Oncol*. 2009; 92: 466–71.
41. Kishi T., Takao T., Fujita K., Taniguchi H. Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2006; 340: 544–52.

REFERENCES

1. Ruvinskaya G.R., Mukhamedzhanova L.R. Hematosalivary barrier: morphofunctional features in norm and pathology *Prakticheskaya meditsina*. 2013; 4 (13): 21–5. (in Russian)
2. Chuykin S.V., Akmalova G.M. The concept of hematosalivary barrier. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2015; 5(59): 103–7. (in Russian)
3. Petrovich Yu. A., Podorozhnaya R.P., Kichenko S.M. Hematosalivary barrier. *Rossiyskiy stomatologicheskij zhurnal*. 2004; 4: 39–45. (in Russian)
4. Bykov V.L. Histology and embryonic development of human oral organs [Gistologiya i embrional'noe razvitiye organov polosti rta cheloveka]. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. (in Russian)
5. Vavilova T. P. Biochemistry of oral tissues and fluids: textbook. [Biokhimiya tkaney i zhidkostey polosti rta: uchebnoe posobie]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008. (in Russian)
6. Akmalova G.M. Clinical significance of hematosalivary barrier in some somatic diseases. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; 4: 386. (in Russian)
7. Bierbaumer L., Schwarze U.Y., Gruber R., Neuhaus W. Cell culture models of oral mucosal barriers: A review with a focus on applications, culture conditions and barrier properties. *Tissue Barriers*. 2018; 6(3): 1479–1568.
8. Furuse M., Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*. 2006; 16(4): 181–8.
9. Anderson J.M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci*. 2001; 16: 126–30.
10. Kondo Y., Nakamoto T., Jaramillo Y., Choi S., Catalan M.A., Melvin J.E. Functional differences in the acinar cells of the murine major salivary glands. *J. Dent. Res*. 2015; 94(5): 715–21.
11. Farkas A.E., Capaldo C.T., Nusrat A. Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins. *Ann. N Y Acad. Sci*. 2012; 1258: 115–24.
12. Baker O.J. Current trends in salivary gland tight junctions. *Tissue Barriers*. 2016; 4(3): 1162–1348.
13. Korot'ko G.F. Salivary gland secretion and elements of salivary diagnostics [Sekretsia slyunnykh zhelez i elementy sallyvadiagnostiki]. Moscow: Akademiya Estestvoznaniya; 2006. (in Russian)
14. Noskov V. B. Saliva in clinical laboratory diagnostics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2008; 6: 14–7. (in Russian)
15. Salamat-Miller N., Chittchang M., Johnston T.P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2005; 3; 57 (11): 1666–91.
16. Chinnna Reddy P., Chaitanya K.S., Madhusudan Rao Y. A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods. *Daru*. 2011; 19(6): 385–403.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ащина Л.А.¹, Баранова Н.И.¹, Молотиллов Б.А.¹, Шкурова Н.А.^{1,2}

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПОЛИПОЗНЫМ РИНОСИНОСИТОМ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОМ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА

¹Пензенский институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 440060, Пенза, Россия;

²ГБУЗ «Клиническая больница № 6 имени Г.А. Захарьина», 440060, Пенза, Россия

Хронический полипозный риносинусит (ХПРС) представляет собой воспалительное заболевание носа и околоносовых пазух, сопровождающееся образованием и рецидивирующим ростом полипов. ХПРС является актуальной проблемой медицины, так как трудно поддается лечению и сопровождается постоянными обострениями. Доказана важная роль нейтрофильных гранулоцитов в патогенезе ХПРС, которые являются первой линией защиты в ответ на повреждение тканей и активными участниками патологического процесса. Имеются данные успешного применения иммунокорректоров при лечении больных с ХПРС, однако часто они назначаются без учета возможных патогенетических механизмов заболевания. Одним из перспективных иммуномодуляторов местного применения является препарат интерферона гамма человеческого рекомбинантного. Известно, что интерферон гамма способен активировать нейтрофилы, за счет рецепторов к данному цитокину, которые находятся на их поверхности. Задачей исследования явилось изучение функциональной активности нейтрофилов у больных ХПРС и влияние препарата интерферона гамма человеческого рекомбинантного на данные показатели. Проведено обследование 35 пациентов с ХПРС до и после терапии интраназальным препаратом интерферона гамма. В контрольную группу вошли 30 здоровых людей. В цельной крови хемилюминесцентным методом с использованием двойной стимуляции изучали функциональную активность нейтрофилов. У больных ХПРС до лечения выявлено повышение показателей стимулированной активности нейтрофилов, максимальной интенсивности свечения клеток, коэффициента активации и снижение времени выхода нейтрофилов на максимум свечения. После проведенной терапии интраназальным препаратом интерферона гамма выявлено достоверное снижение спонтанной, стимулированной активности нейтрофилов и максимальной интенсивности свечения клеток. В результате у пациентов ХПРС после проведенного лечения, показатели стимулированной продукции нейтрофилов и максимальной интенсивности свечения клеток были снижены до уровня контрольной группы, а показатель спонтанной активности нейтрофилов стал даже ниже значений здоровых людей, при этом коэффициент активации нейтрофилов остался повышенным, как у больных до терапии. Полученные результаты свидетельствуют о нормализации основных показателей функциональной активности нейтрофилов у больных ХПРС после проведенного лечения препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного.

Ключевые слова: хронический полипозный риносинусит; нейтрофилы; хемилюминесцентный метод; интерферон гамма человеческий рекомбинантный.

Для цитирования: Ащина Л.А., Баранова Н.И., Молотиллов Б.А., Шкурова Н.А. Анализ функциональной активности нейтрофилов у больных хроническим полипозным риносинуситом после лечения препаратом интерферона гамма. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (6): 339-344. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-339-344>

Для корреспонденции: Ащина Людмила Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории; e-mail: pushino2008@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания АААА-А20-120031090059-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.11.2021

Принята к печати 15.01.2022

Опубликовано 20.06.2022

Aschina L.A.¹, Baranova N.I.¹, Molotilov B.A.¹, Shkurova N.A.^{1,2}

ANALYSIS OF NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY IN PATIENTS WITH CHRONIC POLYPOSIS RHINOSINUSITIS AFTER TREATMENT WITH INTERFERON GAMMA

¹Penza Institute for Further Training of Physicians – Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education «Russian Medical Academy of Continuing Professional Education» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 440060, Penza, Russia;

²State budgetary institution of health care «Clinical hospital № 6 named after G.A. Zakharyin», 440060, Penza, Russia

Chronic polyposis rhinosinusitis (CPRS) is an inflammatory disease of the nose and paranasal sinuses, accompanied by the formation and recurrent growth of polyps. CPRS is an urgent medical problem, because it is difficult to treat and is accompanied by constant exacerbations. The important role of neutrophil granulocytes in the pathogenesis of CPRS has been proved, as they are the first line of defense in response to tissue damage and active participants in the pathological process. There is evidence of successful use of immunocorrectors in the treatment of patients with CPPS, but they are often prescribed without regard to possible pathogenetic mechanisms of the disease. One of the promising immunomodulators of local use is a preparation of human recombinant interferon

gamma. It is known that interferon gamma is able to activate neutrophils due to the receptors to this cytokine, which are located on their surface. The aim of the study was to investigate the functional activity of neutrophils in patients with CHRS and the effect of human recombinant interferon gamma on these indicators. Thirty-five patients with CHRS were examined before and after therapy with intranasal interferon gamma. The control group included 30 healthy subjects. Functional activity of neutrophils was studied in whole blood by chemiluminescent method using double stimulation. Patients with CHRS before treatment revealed increased indexes of neutrophils stimulated activity, maximal intensity of cells luminescence, activation coefficient and decreased time of neutrophils output at maximal luminescence. After treatment with intranasal preparation of interferon gamma there was significant decrease of spontaneous and stimulated activity of neutrophils and maximum intensity of cell luminescence. As a result, after the treatment, in patients with CHRS the values of stimulated production of neutrophils and maximum intensity of cell luminescence were reduced to the level of the control group, and the spontaneous activity of neutrophils was even lower than in healthy subjects, while the neutrophils activation factor remained elevated as in patients before therapy. The results obtained testify to normalization of the main indexes of neutrophil functional activity in CHRS patients after treatment with human recombinant interferon gamma.

Key words: *chronic polyposis rhinosinusitis; neutrophils; chemiluminescent method; human recombinant gamma interferon.*

For citation: Aschina L.A., Baranova N.I., Molotilov B.A., Shkurova N.A. Analysis of neutrophil functional activity in patients with chronic polyposis rhinosinusitis after treatment with interferon gamma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 339-344 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-339-344>

For correspondence: Aschina Lyudmila Andreevna, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Central Research Laboratory; e-mail: pushino2008@yandex.ru

Information about authors:

Aschina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-4445-5619>;
Baranova N.I., <https://orcid.org/0000-0002-2991-0898>;
Molotilov B.A., <https://orcid.org/0000-0003-4129-2815>;
Shkurova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-0434-1972>.

Acknowledgment. *The study was carried out with the financial support of the state assignment AAAA-A20-120031090059-8.*

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

Received 23.11.2021
Accepted 15.01.2022
Published 20.06.2022

Введение. Хронический полипозный риносинусит (ХПРС) представляет собой воспалительное заболевание носа и околоносовых пазух, сопровождающееся постоянным образованием и рецидивирующим ростом полипов [1]. Распространённость ХПРС среди взрослого населения колеблется от 1 до 4% и является актуальной проблемой медицины [2-3]. В связи с отсутствием единой точки зрения на этиологические факторы и иммунопатогенетические механизмы ХПРС, затрудняется прогноз течения заболевания и разработка единых стандартных алгоритмов диагностики и терапии [4].

Доказано, что ХПРС всегда сопровождается воспалительным процессом. На сегодняшний день в зависимости от преобладающего типа воспалительных клеток в носовых полипах, ХПРС разделяют на эозинофильный и нейтрофильный типы [5-7]. Однако, примерно в одной трети случаев встречается смешанный тип ХПРС, где нейтрофилы и эозинофилы определяются в равном количестве [8].

Показано, что нейтрофилы при ХПРС являются первой линией защиты в ответ на повреждение тканей и активными участниками патологического процесса [9]. За счет гиперпродукции данными клетками эластазы и других биологически активных молекул они способствуют повышению проницаемости, нарушению регенерации и повреждению эпителиального барьера. Кроме того, показано повышенное содержание в носовых полипах миелопероксидазы, ряда хемокинов, интерферон-индуцибельного белка (IP-10), IL-8, что приводит к увеличению плотности и клеточной инфильтрации ткани [8].

Известно, что нейтрофилы осуществляют киллинг объектов фагоцитоза за счет кислородзависимого механизма с участием «респираторного взрыва». При этом наблюдается активное потребление кислорода, за счет преобразования его в активные формы (АФК). По уровню образовавшихся АФК можно судить о функциональном состоянии нейтрофилов и дальнейшем ходе

воспалительного процесса. В настоящее время одним из современных методов регистрации данных молекул является хемилюминесцентный анализ [10].

К настоящему времени накоплен довольно значительный опыт использования различных иммунокорректоров системного и местного действия для лечения больных с ХПРС [11-12], однако, часто они назначаются без учета возможных патогенетических механизмов заболевания. Одним из перспективных иммуномодуляторов местного применения является препарат интерферона гамма человеческого рекомбинантного. Известно, что интерферон гамма, являясь фактором активации Т-хелперов, способствует развитию Th1-специфического противовирусного ответа, что, в свою очередь, приводит к коррекции иммунологических показателей у пациентов [13].

Кроме того, данный цитокин способен активировать нейтрофилы, на поверхности которых имеются рецепторы к интерферону гамма [14]. Имеются данные, что интерферон гамма *in vitro* усиливает фагоцитарную активность нейтрофилов, что обусловлено усилением экспрессии Fc-рецепторов и поверхностных белков семейства интегринов на нейтрофилах. Это позволяет данным клеткам осуществлять цитотоксические функции и фагоцитоз. В качестве основных эффекторных клеток воспалительного процесса, они обеспечивают элиминацию инфекционного агента из организма [15].

Целью настоящего исследования явилось изучение функциональной активности нейтрофилов у больных хроническим полипозным риносинуситом до и после лечения препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного.

Материал и методы. Объектом исследования явились больные хроническим полипозным риносинуситом (ХПРС, $n = 35$) в возрасте от 22 до 47 лет, среди которых были 20 женщин и 15 мужчин. Средний возраст больных составил 39 ± 15 лет. Диагноз ХПРС устанавливал-

ся согласно EPOS 2020. В контрольную группу вошли практически здоровые люди ($n = 30$) аналогичного возрастного диапазона.

Пациенты с ХПРС получали лечение препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного в интраназальной форме согласно следующей схеме. Препарат вводился по 2 капли в каждый носовой ход после их туалета 2 раза в день в течение 14 дней. Обследование больных проводилось до начала терапии и через 1-2 мес после окончания лечения.

Было проведено клиническое, открытое, проспективное, рандомизированное исследование. Критериями включения больных в исследование явились: диагноз ХПРС, возраст от 22 до 47 лет, информированное согласие на участие в исследовании. Критериями исключения были: хронический риносинусит без полипов, психические заболевания, онкологические заболевания, туберкулез в активной фазе, беременность, период лактации.

Иммунологические исследования были проведены на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Пензенского института усовершенствования врачей – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России в период с 2020 по 2021 гг. От всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проводимые исследования.

Взятие крови для исследования у пациентов осуществляли утром, натощак из кубитальной вены в объеме 5 мл в вакутейнеры с Li-гепарином. Функциональную активность нейтрофилов изучали с помощью хемилюминесцентного анализа по методике, предложенной И.В. Образцовым [16], которая заключается в последовательной стимуляции нейтрофилов двумя стимулами: форбол-12-мирикат-13-ацетатом (ФМА) и N-формилметионил-лейцил-фенилаланином (фМЛФ) с последующей регистрацией ХЛ на аппарате Lum-1200 (ДИСофт, Россия) с программным обеспечением PowerGraph 3.0. Объектом исследования являлась цельная кровь, без выделения фагоцитов. В качестве активатора ХЛ использовали люминол (Sigma-Aldrich, США). ФМА (Sigma-Aldrich, США), используемый в качестве стимула, выполнял роль праймера, а фМЛФ (Sigma-Aldrich, США) являлся основным стимулом для люминол-зависимого хемилюминесцентного анализа.

В исследовании были определены: светосумма спонтанной и ФМА+фМЛФ-стимулированной продукции нейтрофилов ($S_{\text{спонт.}}$, $S_{\text{стим.}}$), максимальная интенсивность свечения нейтрофилов (I_{max}), коэффициент активации (K_a), равный отношению показателя светосуммы ФМА+фМЛФ-стимулированных нейтрофилов к показателю светосуммы спонтанной продукции нейтрофилов и время выхода на максимум (T_{max}). Единицы измерения показателей светосуммы и максимальной интенсивности свечения выражали в РР (количество импульсов света в секунду времени в пересчете на миллион нейтрофилов). Время выхода на максимум свечения выражали в секундах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программ STATISTICA 12.0 (США). Описание полученных в исследовании результатов производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0.25}$ и $Q_{0.75}$). Анализируемые показатели не имели нормального распределения (применяли критерий Шапиро-Уилка). Сравнительный анализ групп оценивали по критерию Манна-Уитни и Вилкоксона. Достоверно значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Анализ функциональной активности нейтрофилов методом хемилюминесцентного анализа у больных ХПРС показал достоверно более высокий уровень стимулированной продукции нейтрофилов по сравнению с уровнем здоровых людей. При этом показатель спонтанной продукции нейтрофилов у пациентов не отличался от группы контроля. Уровень максимальной интенсивности свечения нейтрофилов в группе больных ХПРС был достоверно более высоким по сравнению с показателями в контрольной группе. А анализ времени выхода на максимум свечения клеток у пациентов был достоверно ниже, чем у здоровых людей. При этом значение коэффициента активации нейтрофилов, равный отношению уровней стимулированной продукции к спонтанной продукции АФК нейтрофилами, был достоверно повышенным в группе больных ХПРС по сравнению с группой здоровых доноров.

После проведенной терапии интраназальным препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного у больных ХПРС было выявлено значительное снижение спонтанной продукции АФК нейтрофилами. Кроме того, уровень стимулированной продукции клеток у пациентов после терапии достоверно снижился, и показатель максимальной интенсивности свечения клеток также был достоверно более низким у больных после лечения по сравнению с пациентами ХПРС до начала терапии. Однако анализ показателя времени выхода на максимум не выявил достоверно значимых различий у больных до начала терапии и после ее проведения. Также и уровень коэффициента активации нейтрофилов достоверно не различался между сравниваемыми группами больных.

В результате, у пациентов ХПРС после проведенного лечения препаратом интраназального интерферона гамма человеческого рекомбинантного, показатели стимулированной продукции нейтрофилов и максимальной интенсивности клеток не отличались от уровня здоровых людей. Уровень спонтанной активности нейтрофилов у больных после лечения стал даже ниже значений контрольной группы. При этом показатель времени выхода на максимум свечения нейтрофилов у пациентов после проведенной терапии был достоверно более низким по сравнению с группой здоровых лиц. Однако коэффициент активации нейтрофилов у больных ХПРС после лечения остался достоверно более высоким по сравнению со значениями группы контроля (см. таблицу).

Обсуждение. Доказано, что немаловажную роль в патогенетических механизмах ХПРС играют нейтрофильные гранулоциты. В доступной литературе имеется работа О.А. Коленчуковой и соавт. [10], в которой было проведено исследование функциональной активности нейтрофилов у больных полипозным риносинуситом (ПР) при стимуляции зимозаном и бактериальной культурой *Staphylococcus aureus*. В данном исследовании было показано повышение спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной реакции в люминол-зависимом процессе. При исследовании реакции нейтрофильных гранулоцитов в ответ на разные стимулы было выявлено увеличение интенсивности образования АФК у больных в ответ на индукцию бактериальной культурой в люминол-зависимом процессе [10].

В нашем исследовании для изучения функционального состояния нейтрофилов у пациентов с ХПРС до и после применяемой терапии препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного был применен хемилюминесцентный метод по методике И.В. Образцо-

ва [16], основанной на применении люминола в качестве хемилюминесцентного зонда, и двух стимулов ФМА и фМЛФ. В анализе ФМА выполнял функцию праймера, а фМЛФ, представляя собой аналог полипептидов бактериального происхождения, являлся основным стимулом дыхательного взрыва клеток. Также стоит отметить, что применяемая люминол-зависимая хемилюминесценция регистрировала весь пул вырабатываемых АФК нейтрофилами и характеризовала их продукцию как внутри, так и вне клеток [17].

В проведенном исследовании было показано, что уровень спонтанной продукции АФК нейтрофилами у больных ХПРС не отличался от показателей здоровых лиц. Однако наблюдалось снижение данного показателя в два раза после проведенной терапии препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного. У пациентов ХПРС после проведенного лечения уровень базовой (спонтанной) продукции АФК нейтрофилами становился даже ниже по сравнению с группой здоровых лиц. Полученные данные разнятся с результатами, полученными в работе О.А. Коленчуковой и соавт. [10]. Это можно объяснить тем, что ХПРС является гетерогенным заболеванием, который существует в многомерном спектре воспалительных паттернов и имеет различные эндотипы и фенотипы, а в работах подбор пациентов осуществлялся без их учета.

При исследовании стимулированной продукции нейтрофилов под действием стимулов ФМА и фМЛФ было выявлено увеличение продукции АФК клетками у больных ХПРС до начала терапии по сравнению со здоровыми донорами, что может свидетельствовать о повышенной реакции нейтрофилов на стимулы у пациентов. После проведенной терапии было отмечено снижение данного показателя до уровня здоровых лиц.

Показатель максимальной интенсивности свечения нейтрофилов, который характеризовал максимальную активность синтеза АФК клетками [18], был повышен у больных ХПРС до начала лечения препаратом интерферона гамма по сравнению со здоровыми людьми, что свидетельствует о гиперстимулированном состоянии нейтрофилов у данной группы пациентов. В результате лечения, у пациентов данный показатель значительно снижался, так что его уровень достоверно не отличался от показателей группы контроля. Показано, что интерферон гамма обладает различными иммунорегуляторными функциями, одной из которых является активация макрофагов, в том числе, активация завершенности фагоцитоза клетками [19]. Поэтому можно предположить, что за счет снижения вирусной нагрузки и количества патогенных микроорганизмов в организме больных ХПРС на фоне лечения препаратом интерферона гамма, часть из показателей функциональной активности нейтрофилов у пациентов нормализовалась и не была отличной от здоровых людей.

Несмотря на это, исследование времени выхода на максимум хемилюминесцентного свечения клеток показало более низкий его уровень у больных ХПРС до лечения по сравнению со здоровыми людьми. Это свидетельствовало о том, что нейтрофилы пациентов дают более быструю реакцию на стимулирующие агенты и в более короткие сроки начинается продукция АФК клетками, чем у здоровых доноров. Данный показатель достоверно не снижался и после проведенной терапии.

Показатели хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных ХПРС до и после лечения препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного (Mediana $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$)

Значения	Группа больных ХПРС до лечения (n = 35)	Группа больных ХПРС после лечения (n = 35)	Контрольная группа (n = 30)
$S_{\text{спонт.}}$ PPs	28,0 [16,0-38,0]	14,0 [9,9-16,7] $p_2=0,021$ $p_3=0,045$	25,3 [15,8-42,3]
$S_{\text{стим.}}$ PPs	771,0 [475,0-1039,0] $p_1=0,004$	460,7 [360,0-488,0] $p_3=0,041$	410,8 [280,1-577,5]
$I_{\text{max.}}$ PPs	1,3 [0,75-1,55] $p_1=0,000002$	0,39 [0,29-0,48] $p_3=0,01$	0,48 [0,32-0,61]
$T_{\text{max.}}$ с	2076 [2028-2172] $p_1=0,007$	1956 [1788-2088] $p_3=0,005$	2760 [2200-3350]
K_a	26,2 [19,5-33,2] $p_1=0,003$	30,8 [21,2-38,6] $p_2=0,001$	15,7 [9,6-24,5]

Примечание. p_1 – статистически значимые различия группы больных ХПРС до лечения и контрольной группы; p_2 – статистически значимые различия группы больных ХПРС после лечения и контрольной группы ($p<0,05$); p_3 – статистически значимые различия групп больных ХПРС до и после лечения ($p<0,05$).

Анализ коэффициента активации, отражающий внутриклеточный резерв для осуществления респираторного взрыва нейтрофилами, показал, что его уровень был повышенным у пациентов с ХПРС как до, так и после проведенного лечения препаратом интерферона гамма по сравнению со здоровыми лицами. Данный показатель вычислялся через отношение стимулированной продукции АФК нейтрофилами к спонтанной продукции [18]. Во время проведенной терапии у больных ХПРС наблюдалось снижение практически в два раза как базовой (спонтанной) продукции, так и продукции АФК клетками в ответ на стимулирующие агенты, в результате чего коэффициент активации нейтрофилов достоверно не различался между группами пациентов.

В доступных источниках научной литературы имеются данные о том, вирусная инфекция является одним из триггеров ХПРС, хотя не было выявлено ни одного патогена, являющегося прямым возбудителем заболевания. Доказано, что вирусы утяжеляют существующий хронический патологический процесс, а дефектный иммунный ответ и повышенное количество макрофагов со сниженной фагоцитарной активностью, дает возможность персистенции респираторных вирусов в слизистой оболочке околоносовых пазух [20-22]. Известно, что нейтрофилы способны быстро перемещаться в очаг воспаления и осуществлять фагоцитоз, который является одной из главных систем защиты организма от чужеродных агентов [23]. На поверхности макрофагов и нейтрофилов имеются рецепторы к интерферону гамма, за счет чего данный цитокин способствует активации эффекторных функций данных клеток, в частности, повышая их микробицидность и продукцию ими цитокинов, супероксидных и нитрооксидных радикалов, и тем самым вызывая гибель внутриклеточных патогенов [14,24]. Нарушения в функционировании врожденного иммунитета слизистой оболочки носа при ХПРС приводят к тому, что не осуществляется иммунная элиминация инфекционных агентов, в результате чего формируется повышенная восприимчивость к вирусным и бактериальным инфекциям, что ведет к хроническому воспалительному процессу [25]. В настоящее время в лечении больных

риносинуситами с успехом применяется иммуномодулирующая терапия [26-28]. Препарат интерферон гамма человеческий рекомбинантный имеет важное значение для лечения врожденного и приобретенного иммунитета, за счет того, что использование интраназальной формы данного препарата обеспечивает противовирусный барьер в носоглотке – месте внедрения патогенных агентов [29-30]. В проведенном исследовании на фоне терапии данным препаратом снижались показатели спонтанной продукции АФК нейтрофилами, ФМА+фМЛФ стимулированной продукции и максимальной интенсивности свечения клеток, вследствие чего происходила нормализация функциональной активности нейтрофилов у пациентов с ХПРС и снижение воспалительного процесса в целом.

Выводы

1. У больных ХПРС до лечения препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного в интраназальной форме выявлено повышение функциональных показателей нейтрофилов – стимулированной активности нейтрофилов, максимальной интенсивности свечения клеток, коэффициента активации и снижение времени выхода нейтрофилов на максимум свечения.

2. После проведенной терапии препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного у пациентов выявлено достоверное снижение спонтанной, стимулированной активности нейтрофилов и максимальной интенсивности свечения клеток.

3. Проведенное лечение больных ХПРС препаратом интерферона гамма человеческого рекомбинантного способствовало снижению показателей стимулированной продукции нейтрофилов и максимальной интенсивности свечения клеток до уровня контрольной группы, что свидетельствует о стабилизации функционального состояния нейтрофилов и снижении воспалительного процесса.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 5-9, 20,21 см. REFERENCES)

1. Савлевич Е.Л., Гаганов Л.Е., Егоров В.И., Курбачева О.М., Герасимов А.Н., Шачнев К.Н. Сравнительное пилотное исследование эндотипов хронического полипозного риносинусита у пациентов, проживающих в разных географических регионах российской федерации. *Иммунология*. 2018; 39(4): 208-13. DOI:10.18821/0206-4952-2018-39-4-208-213.
4. Кривопалов А.А. Определения, классификации, этиология и эпидемиология риносинуситов (обзор литературы). *Российская ринология*. 2016; 24(2): 39-45.
10. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Особенности нейтрофильных гранулоцитов у больных полипозным риносинуситом. *Медицинская иммунология*. 2014; 16(4): 385-90.
11. Савлевич Е.Л., Курбачева О.М., Хайдуков С.В., Герасимов А.Н., Амантурлиева М.Е., Симбирцев А.С. К вопросу о диагностической значимости иммунологических показателей при хроническом полипозном риносинусите. *Российский аллергологический журнал*. 2017; 14(4-5): 40-5.
12. Савлевич Е.Л., Курбачева О.М., Шачнев К.Н. Целесообразность применения иммуномодулирующих препаратов в лечении хронического полипозного риносинусита. *Российский ринологический журнал*. 2018; 26(3):41-6.
13. Гайнанова Е.Г., Скороходкина О.В., Фазылов В.Х. Особенности цитокинового профиля у пациентов с варицелла-зостер герпесвирусной инфекцией на фоне терапии Ингароном. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(4-5): 519.
14. Хрянин А.А., Решетников О.В. Интерферон-гамма: горизонты терапии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2016; 61: 3-46.
15. Сологуб Т.В., Ледванов М.Ю., Малый В.П., Стукова Н.Ю., Романцов М.Г., Бизенкова М.Н. Полякова Т.Д. Иммуноответ при вирусных инфекциях. *Успехи современного естествознания*. 2009; 2: 29-33.

16. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилюминесцентному анализу. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(4): 418-25.
17. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е. В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. *Успехи биологической химии*. 2009; 49: 341-88.
18. Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Борисов А.Г. Методы оценки и роль респираторного взрыва в патогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 327-40. DOI:10.15789/2220-7619-2017-4-327-340.
19. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб: Фолиант; 2018.
22. Бондарева Г.П., Терехова А.О. Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой. *Вестник оториноларингологии*. 2010; 3: 9-11.
23. Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И. и др. Взаимосвязь содержания Th- и T-регуляторных клеток в крови и хемилюминесцентной активности нейтрофилов у больных хроническим эндометритом и аднекситом. *Медицинская иммунология*. 2018; 20(1): 61-72. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-61-72.
24. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейер М., Лобзин Ю.В. Интерферон-γ: биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(4): 10-22.
25. Савлевич Е.Л., Хайдуков С.В., Курбачева О.М., Бондарева Г.П., Шачнев К.Н., Симбирцев А.С. Показатели клеточного иммунитета пациентов с хроническим полипозным риносинуситом. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(6): 731-8. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738.
26. Стагниева И.В., Симбирцев А.С. Эффективность иммуномодулирующей терапии у больных риносинуситом. *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (5): 423-30.
27. Кузнецова Л.В., Бабаджан В.Д., Кравчук П.Г., Елизарова Т.А., Шуляк М.А., Шейх Саджаде Мохаммад Реза и др. Современные представления об этиологии и патогенезе полипозных риносинуситов, протекающих на фоне круглогодичного аллергического ринита. Киев: Актавис Украина; 2015.
28. Глушкова Е.Ф., Суровенко Т.Н. Иммуномодулирующая терапия у пациентов с инфекциями верхних дыхательных путей и ЛОР-органов. *Медицинский совет*. 2016; 16: 80-6.
29. Сологуб Т.В., Мидикари А.С., Агафонов В.Н., Суздальцев А.А., Цветков В.В. Эффективность и целесообразность использования рекомбинантного интерферона гамма в комплексной терапии больных гриппом A(H1N1)pdm09. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(2): 58-63. DOI:10.18821/1560-9529-2017-2-58-63.
30. Никифоров В.В., Сологуб Т.В., Токин И.И., Цветков В.В., Ерофеева М.К., Зарубаев В.В. Возможность использования интерферона-γ при гриппозной инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(3): 11-6.

REFERENCES

1. Savlevich E.L., Gaganov L.E., Egorov V.I., Kurbacheva O.M., Gerasimov A.N., Shachnev K.N. Comparative Pilot Study of Endotypes of Chronic Polyposis Rhinosinusitis in Patients Residing in Different Geographical Regions of the Russian Federation. *Immunologiya*. 2018; 39(4): 208-13. DOI:10.18821/0206-4952-2018-39-4-208-213. (in Russian)
2. Raphael I., Nalawade S., Eagar T.N., Forsthube T.G. T-cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015; 74(1): 5-17. DOI: 10.1016/j.cyt.2014.09.011.
3. Xu M., Chen D., Zhou H., Zhang W., Xu J., Chen L. The role of periostin in the occurrence and progression of eosinophilic chronic sinusitis with nasal polyps. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 9479. DOI:10.1038/s41598-017-08375-2.
4. Krivopalov A.A. Definitions, classifications, etiology and epidemiology of rhinosinusitis (literature review). *Rossiyskaya rinologiya*. 2016; 24(2): 39-45. (in Russian)
5. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F. et al. EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and

- nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*. 2012; 50(1):1-12.
6. Dennis S.K., Lam K., Luong A. A review of classification schemes for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis endotypes. *Laryngoscope Invest Otolaryngol*. 2016; 1(5): 130-4. DOI: 10.1002/lio2.32.
7. Lou H., Meng Y., Piao Y., Zhang N., Bachert C., Wang C. et al. Cellular phenotyping of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology*. 2016; 54(2): 150-9. DOI: 10.4193/Rhino15.271.
8. Wen W., Liu W., Zhang L., Bai J., Fan Y., Xia W. et al. Increased neutrophilia in nasal polyps reduces the response to oral corticosteroid therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2012; 129(6):1522-8. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.01.079.
9. Wang X., Zhang N., Bo M., Holtappels G., Zheng M., Lou H. et al. Diversity of TH cytokine profiles in patients with chronic rhinosinusitis: a multicenter study in Europe, Asia, and Oceania. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016; 138(5): 1344-53. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.05.041. Epub 2016 Jul 15.
10. Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Peculiarities of neutrophil granulocytes in patients with polyposis rhinosinusitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2014; 16(4): 385-90. (in Russian)
11. Savlevich E.L., Kurbacheva O.M., Khaydukov S.V., Gerasimov A.N., Amanturliya M.E., Simbirtsev A.S. On the diagnostic significance of immunological parameters in chronic polyposis rhinosinusitis. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal*. 2017; 14 (4-5): 40-5. (in Russian)
12. Savlevich E.L., Kurbacheva O.M., Shachnev K.N. Feasibility of immunotropic drugs in the treatment of chronic polyposis rhinosinusitis. *Rossiyskiy rinologicheskii zhurnal*. 2018; 26(3):41-6. (in Russian)
13. Gaynanova E.G., Skorokhodkina O.V., Fazylov V.H. Features of cytokine profile in patients with varicella-zoster herpesvirus infection against the background of Ingaron therapy. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(4-5): 519. (in Russian)
14. Khryanin A.A., Reshetnikov O.V. Interferon-gamma: horizons of therapy. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2016; 61: 3-46. (in Russian)
15. Sologub T.V., Ledvanov M.Yu., Malyj V.P., Stukova N.Yu., Romantsov M.G., Bizenkova M.N., Polyakova T.D. Immune response in viral infections. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2009; 2: 29-33. (in Russian)
16. Obraztsov I.V., Godkov M.A., Polimova A.M., Demin E.M., Proskurnina E.V., Vladimirov Yu.A. Assessment of the functional activity of whole blood neutrophils by two-stage stimulation: a new approach to chemiluminescence analysis. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2015; 9(4): 418-25. (in Russian)
17. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E. V. Free radicals and cell chemiluminescence. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2009; 49: 341-88. (in Russian)
18. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of evaluation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(4): 327-40. DOI:10.15789/2220-7619-2017-4-327-340. (in Russian)
19. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. [Tsitokiny v patogeneze i lechenii zabolevaniy cheloveka]. St.Petersburg: Foliant; 2018. (in Russian)
20. Krysko O., Holtappels G., Zhang N., Kubica M., Deswarte K., Derycke L. et al. Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy*. 2011; 66(3): 396-403. DOI:10.1111/j.1398-9995.2010.02498.x.
21. Kato A., Favoreto S. Jr., Avila P.C., Schleimer R.P., Schleimer R. P. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J. Immunol.* 2007; 179(2):1080-7. DOI: 10.4049/jimmunol.179.2.1080.
22. Bondareva G.P., Terekhova A.O. Role of infection in the formation of polyposis rhinosinusitis in bronchial asthma patients. *Vestnik otorinolaringologii*. 2010; 3: 9-11. (in Russian)
23. Savchenko A.A., Kasparov Ye.V., Arutyunyan S.S., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I. et al. Relationship between the content of Th- and T-regulatory cells in blood and chemiluminescent activity of neutrophils in patients with chronic endometritis and adnexitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2018; 20(1): 61-72. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-1-61-72. (in Russian)
24. Lutskiy A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Meyrer M. et al. Interferon- γ : biological function and significance for the diagnosis of cellular immune response. *Zhurnal infekologii*. 2015; 7(4): 10-22. (in Russian)
25. Savlevich E.L., Haydukov S.V., Kurbacheva O.M., Bondareva G.P., Shachnev K.N., Simbirtsev A.S. Cellular immunity indexes in patients with chronic polyposis rhinosinusitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2017; 19(6): 731-8. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738. (in Russian)
26. Stagnieva I.V., Simbirtsev A.S. The effectiveness of immunomodulatory therapy in patients with rhinosinusitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17 (5): 423-30. (in Russian)
27. Kuznetsova L.V., Babadzhanyan V.D., Kravchun P.G., Elizarova T.A., Shulyak M.A., Shejh Sadzhade Mohammad Reza et al. Current views on the etiology and pathogenesis of polyposis rhinosinusitis with year-round allergic rhinitis [Sovremennye predstavleniya ob etiologii i patogeneze polipoznykh rinosinitov, protekayushchikh na fone kruglogodichnogo allergicheskogo rinita]. Kiev: Aktavis Ukraina; 2015. (in Russian)
28. Glushkova E.F., Surovenko T.N. Immunomodulatory therapy in patients with infections of the upper respiratory tract and ENT organs. *Meditsinskiy sovet*. 2016; 16: 80-6. (in Russian)
29. Sologub T.V., Midikari A.S., Agafonov V.N., Suzdal'tsev A.A., Tsvetkov V.V. Efficacy and appropriateness of recombinant interferon gamma in the treatment of influenza A(H1N1)pdm09 patients. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; 22(2): 58-63. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-2-58-63. (in Russian)
30. Nikiforov V.V., Sologub T.V., Tokin I.I., Tsvetkov V.V., Erofeeva M.K., Zarubaev V.V. The possibility of using interferon- γ in influenza infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2015; 20(3): 11-6. (in Russian)

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Базарный В.В., Мандра Ю.В., Сиденкова А.П., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Семенцова Е.А.,
Светлакова Е.Н., Насретдинова Н.Ю., Котикова А.Ю.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 620028, г. Екатеринбург, Россия

В последнее время идет активный поиск маркеров возрастзависимых процессов. Особую актуальность имеют неинвазивные методы, в частности, изучение буккального эпителия. Цель исследования – установить нормальные значения буккальной цитогаммы в разных возрастных группах, в том числе, у спортсменов. Обследованы 200 практически здоровых добровольцев разного возраста, которые в соответствии с классификацией возрастов ВОЗ были разделены на 4 группы. Кроме того, в исследовании приняли участие 125 профессиональных спортсменов. Всем пациентам было проведено комплексное стоматологическое обследование и стандартное цитологическое исследование буккальных мазков. Установлено, что цитологические характеристики буккальных эпителиоцитов, косвенно отражающие нарушения ядерного аппарата клетки, существенно не изменялись с возрастом, но отмечена некоторая тенденция к увеличению числа клеток с такими аномалиями, как микроядра, протрузии ядра. Также с возрастом незначительно увеличивается число двуядерных клеток и индекс апоптоза. Была выявлена высокая положительная корреляционная связь индекса апоптоза со старческим возрастом.

У спортсменов молодого возраста было установлено увеличение числа клеток буккального эпителия с перинуклеарной вакуолью – ранний признак повреждения клетки. Анализ результатов исследования буккальной цитогаммы у людей разных возрастных групп показал незначительное нарастание уровня цитологических аномалий в старческом возрасте, в частности, признаков апоптоза. Кроме того, у здоровых спортсменов молодого возраста (18 лет – 44 года) в буккальной цитогамме было выявлено повышение числа клеток с признаками дегенерации ядра, что, скорее всего, отражает повышенные механические нагрузки на челюстно-лицевой аппарат во время спортивных занятий.

Ключевые слова: буккальная цитогамма; возраст; старение; спортсмены.

Для цитирования: Базарный В.В., Мандра Ю.В., Сиденкова А.П., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Семенцова Е.А., Светлакова Е.Н., Насретдинова Н.Ю., Котикова А.Ю. Возрастные особенности буккального эпителия практически здоровых людей. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (6): 345-349. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-345-349>

Для корреспонденции: Максимова Арина Юрьевна, мл. науч. сотр. отд. общей патологии ЦНИЛ; e-mail: oreshok92@list.ru

Финансирование. Статья выполнена в рамках государственного задания «Предикторы старения в полости рта и возможность их использования для персонализации стоматологического лечения» (№ госрегистрации АААА-А18-118042890061-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.03.2022

Принята к печати 25.04.2022

Опубликовано 20.06.2022

Bazarnyi V.V., Mandra Yu.V., Sidenkova A.P., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Sementsova E.A., Svetlakova E.N., Nasretdinova N. Yu., Kotikova A. Yu.

AGE FEATURES OF BUCCAL EPITHELIUM IN PRACTICALLY HEALTHY PEOPLE

Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

Recently, buccal epithelium has been used to study age-dependent processes. This approach is of particular relevance due to its non-invasiveness. The purpose of this study is to establish the normal values of the buccal cytogram in different age groups, including athletes. 200 practically healthy volunteers of different ages were examined, who were divided into 5 groups in accordance with the WHO age classification. In addition, 125 professional athletes took part in the study. All patients underwent a comprehensive dental examination and a standard cytological examination of buccal smears. It has been established that the cytological characteristics of buccal epitheliocytes, indirectly reflecting disorders of the nuclear apparatus of the cell, did not change significantly with age, but there was a certain upward trend in the number of cells with such anomalies (micronucleus, protrusions). The number of binuclear cells and the apoptotic index also slightly increase with age.

At the same time, a high positive correlation was found between the apoptosis index and senile age. In young athletes, an increase in the number of buccal epitheliocytes with a perinuclear vacuole (an early sign of cell damage) was found. Analysis of the cytological examination results of the buccal epithelium in people a slight increase in the level of cytological abnormalities in old age, in particular, signs of apoptosis. In addition, in healthy young athletes (18 years old – 44 years old), an increase in the number of cells with signs of nuclear degradation, which most likely reflects increased mechanical stress on the maxillofacial apparatus during sports activities.

Key words: buccal cytology; age; aging; athletes.

For citation: Bazarnyi V.V., Mandra Yu.V., Sidenkova A.P., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Sementsova E.A., Svetlakova E.N., Nasretidinova N.Yu., Kotikova A.Yu. Age features of buccal epithelium in practically healthy people. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 345-349 (in Russ.).
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-345-349>

For correspondence: Maksimova A.Yu., junior Researcher, Department of General Pathology, Central Research Laboratory; e-mail: oreshk92@list.ru

Information about authors:

Bazarnyi V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>;
Mandra Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-8439-3272>;
Sidenkova A.P., <https://orcid.org/0000-0001-5142-3992>;
Polushina L.G., <https://orcid.org/0000-0002-4921-7222>;
Maksimova A.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8412-4315>;
Sementsova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-0296-8723>;
Svetlakova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-7592-8343>;
Nasretidinova N.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-7033-0687>;
Kotikova A.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-8810-2957>.

Acknowledgment. The article was completed out within the framework of the state task «Predictors of aging in the oral cavity and the possibility of their use for the personification of dental treatment» (state registration number AAAA-A18-118042890061-4).

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

Received 25.03.2022
Accepted 25.04.2022
Published 20.06.2022

Полость рта является доступным источником различных биологических субстратов для лабораторного исследования: буккального (щечного) эпителия, ротовой жидкости, десневой жидкости и других, что делает ее перспективным объектом для оценки состояния организма, в том числе, возрастных изменений. Например, ранее установлено, что при старении в тканях пародонта повышается экспрессия генов матриксных металлопротеиназ (ММП-2, ММП-8), провоспалительных генов (IL-1, IL-6, остеопротегерин, RANKL и др.), увеличивается резорбция костной ткани [1–3].

Буккальный эпителий (БЭ) также используется для изучения возрастзависимых процессов [4]. Существуют методы интегральной оценки состояния организма на основе электрокинетических характеристик БЭ, с помощью теломерного теста (определение длины теломер методом ПЦР), различных вариантов микроядерного теста, иммуногистохимического выявления маркера клеточного старения p16 (INK4a) и других [5–13].

Таким образом, исследование БЭ биофизическими, иммуноморфологическими и молекулярно-биологическими методами является важным инструментом мониторинга здоровья человека [14]. Вместе с тем, рутинное цитологическое исследование БЭ может также занять свое место в изучении процессов старения как один из экономичных, информативных и легко воспроизводимых методов, которому присущи все достоинства неинвазивной диагностики [15]. Возможно, это обеспечит поиск биомаркеров (предикторов) возрастзависимых процессов, что является актуальным в контексте персонализированного подхода к здоровью человека.

Цель исследования – установить нормальные значения буккальной цитограммы в разных возрастных группах, в том числе, у спортсменов.

Материал и методы. Работа основана на исследовании БЭ у 200 практически здоровых добровольцев разного возраста, которые были отобраны на профилактическом стоматологическом приеме. Эта группа была распределена с учетом рекомендаций по классификации возрастных периодов ВОЗ (1963 г.) и РАН [16] на подгруппы: 12–15 лет – детский возраст, $n = 54$; 18–44 года – молодой возраст, $n = 59$; 45–59 лет – средний возраст,

$n = 49$; 60–74 года – пожилой возраст, $n = 24$; 75–89 лет – старческий возраст, $n = 14$.

Соотношение женщины/мужчины в группах составило 1.2 – 1.4.

Кроме того в исследовании приняли участие 125 профессиональных спортсменов, среди них 84% ($n = 105$) мужчин и 16% ($n = 20$) женщин, в возрасте от 18 до 44 лет, в разные периоды тренировочного цикла. Средняя продолжительность профессиональным занятием спорта 15 лет. В предварительном исследовании все испытуемые были разделены на три подгруппы согласно Олимпийской классификации видов спорта: подгруппа занимающихся циклическими видами спорта (легкая атлетика, плавание, лыжный спорт и др.), скоростно-силовыми (теннис, бокс, тяжелая атлетика и др.), игровыми видами спорт (футбол, хоккей и другие).

Всем участникам исследования проводилось комплексное стоматологическое обследование, которое включало определение жалоб, сбор анамнеза, внешний осмотр, осмотр полости рта, и оценка стоматологических индексов: КПУ (сумма кариозных, пломбированных и удаленных зубов у одного пациента), ОНІ-S (упрощенный индекс гигиены полости рта), РМА (папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс). Кроме того, у всех оценивали буккальную цитограмму.

Для исследования БЭ материал собирали с внутренней поверхности щеки с помощью цитощетки и переносили на предметное стекло, равномерно распределяя биоматериал для рутинного приготовления препарата. Фиксацию и окрашивание препаратов осуществляли по Лейшману [17].

При подсчете 500 клеток БЭ определяли содержание клеток с кариологическими аномалиями: клетки с микроядрами, клетки с протрузиями, двуядерные клетки, клетки с признаками кариопикноза, кариорексиса, кариолизиса, клетки с апоптозными тельцами и перинуклеарной вакуолью, результат выражали в процентах.

С целью комплексной оценки цитограммы использовали расчетные индексы [18, 19]:

1. Индекс апоптоза (Ia) – сумма клеток с конденсацией хроматина, кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом и апоптозными тельцами.

2. Репаративный индекс (RI) – сумма клеток с кариорексисом и кариолизисом/сумма клеток с микроядрами и протрузиями ядра.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на основании принципов вариационной статистики. С помощью критерия Колмогорова-Смирнова установили, что выборки имеют неправильное распределение, поэтому использовали непараметрические критерии. Результаты лабораторных исследований сравнивали при помощи критерия Манна-Уитни, данные представлены как медиана (Me), 25-й; 75-й квартиль (Q1; Q3). Достоверность различий между группами оценивали по величине критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ использовали для установления взаимосвязей между параметрами. Расчет коэффициента производили методом Спирмена.

Для решения графических задач применяли электронные таблицы Excel 2007 (Windows 7). Для статистической обработки данных применен классический дискриминантный анализ на базе программного пакета статистического анализа Statistica 9.

При проведении исследований соблюдали этические принципы, принятые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2000). Проведение данного исследования было одобрено локальным этическим комитетом УГМУ (выписки из протокола № 10 от 16.12.2016 г., протокола № 3 от 19.03.2021 г.).

Результаты. Ранее было показано, что цитологическое исследование БЭ является надежным и объективным инструментом в лабораторном мониторинге различных па-

тологических процессов и воздействия факторов внешней среды на организм [19–22]. В данной работе мы приводим сравнительную оценку буккальных эпителиоцитов в возрастном аспекте у практически здоровых людей (табл. 1).

Количество клеток с микроядрами и протрузиями ядра (как в виде «языка», так и «разбитого яйца»), косвенно отражающее нарушения ядерного аппарата клетки [21, 22] существенно не изменяется с возрастом, но имеет некоторую тенденцию к увеличению.

С возрастом происходит кажущееся повышение числа клеток с микроядрами и протрузиями ядра (в сумме в 4 раза). Число двоядерных клеток существенно не меняется – незначительно увеличивается с возрастом.

Учитывая достаточно большое число показателей цитогаммы, мы анализировали не только каждый признак, но и рассчитывали интегральные индексы (табл. 2).

Конденсация хроматина, кариорексис, кариолизис, кариопикноз, появление апоптозных телец характеризуют разные стадии апоптоза. Для комплексной оценки этих процессов рассчитан индекс апоптоза. Он увеличивается с возрастом, что представляется логичным, поскольку имеются данные о связи процессов апоптоза и темпов старения [23]. Для установления взаимосвязи цитологических особенностей БЭ и возраста, был проведен корреляционный анализ (табл. 3).

Следовательно, в ходе проведенного исследования было установлено, что с возрастом в буккальном эпителии нарастает число кариологических аномалий (микроядра, протрузии) клеток. Выявленные изменения обусловлены, возможно, эффектом накопления. Поскольку

Таблица 1

Буккальная цитогамма в различных возрастных группах, Me (Q1;Q3)

Показатели	Возраст, годы				
	Детский, до 18 лет (n=34)	Молодой, 18-44 года (n=51)	Средний, 45-59 лет (n=62)	Пожилой, 60-74 года (n=38)	Старческий, 75-90 лет (n=15)
Клетки с микроядрами	0,1 (0-0,2)	0 (0-1,6) <i>p</i> =0,40	0,2 (0,1 – 3,9) <i>p</i> =0,04	0,3 (0-0,5) <i>p</i> =0,02	0,2 (0-0,4) <i>p</i> =0,05
Клетки с протрузиями	0 (0-0)	0,2 (0,1-1,5) <i>p</i> =0,03	0,1 (0-0,5) <i>p</i> =0,06	0,2 (0-0,4) <i>p</i> =0,03	0,5 (0,3-1,0) <i>p</i> =0,01
Двоядерные клетки	0,3 (0-0,6)	1,2 (0,8-2,0) <i>p</i> =0,01	0,9 (0,6 – 1,9) <i>p</i> =0,05	0,6 (0,2-1,0) <i>p</i> =0,04	1,0 (0,9-1,1) <i>p</i> =0,04
Конденсация хроматина	3,4 (2,7-3,8)	1,9 (0,8- 3,6) <i>p</i> =0,03	2,0 (0,6 – 3,0)	0,5 (0-0,9) <i>p</i> =0,01	0,5 (0-0,8) <i>p</i> =0,02
Клетки с признаками кариопикноза	0,2 (0-1,0)	0,8 (0,4- 1,4) <i>p</i> =0,04	0,8 (0,3-1,5) <i>p</i> =0,04	1,0 (1,0-2,0) <i>p</i> =0,05	1,5 (1,2-1,7) <i>p</i> =0,03
Клетки с признаками кариорексиса	0,1 (0-0,9)	0,6 (0-2,2) <i>p</i> =0,01	0,5 (0,1-1,7) <i>p</i> =0,04	1,2 (0,8-1,5) <i>p</i> =0,02	1,0 (0,8-1,1) <i>p</i> =0,04
Клетки с признаками кариолизиса	0,1 (0-0,3)	2,4 (1,1- 4,8) <i>p</i> =0,02	1,1 (0,6-1,9) <i>p</i> =0,04	1,4 (0,5-2,1) <i>p</i> =0,01	1,5 (0,8-1,9) <i>p</i> =0,03
Клетки с апоптозными тельцами	0 (0-0)	0,2 (0-0,6) <i>p</i> =0,07	0,1 (0-0,3) <i>p</i> =0,01	0,1 (0-0,3) <i>p</i> =0,01	0,2 (0-0,4) <i>p</i> =0,01
Клетки с перинуклеарной вакуолью	0 (0-0)	0,6 (0,2-1,0) <i>p</i> =0,04	0,5 (0,1-1,0) <i>p</i> =0,04	1,0 (0,6-1,5) <i>p</i> =0,02	1,6 (1,2-1,9) <i>p</i> =0,04

Примечание. Различия статистически достоверны, *p* ≤ 0,05. Здесь и в табл. 2,4: *n* – число обследованных.

Интегральные цитологические индексы у лиц разного возраста, Ме (Q1;Q3)

Показатели	Возраст, годы				
	Детский, до 18 лет (n=34)	Молодой, 18-44 года (n=51)	Средний, 45-59 лет (n=62)	Пожилой, 60-74 года (n=38)	Старческий, 75-90 лет (n=15)
Индекс апоптоза	3,3 (0,6-4,5)	4,0 (3,2-4,8) $p>0,05$	3,7 (2,9-4,0) $p>0,05$	4,0 (3,7-5,1) $p>0,05$	3,9 (1,7- 5,1) $p>0,05$
Репаративный индекс	0,1	2,1 $p<0,05$	2,8 $p<0,05$	3,5 $p<0,05$	2,9 $p<0,05$

Таблица 3

Корреляция цитологических параметров с возрастом у практически здоровых добровольцев

Возраст	Клетки с микроядрами	Двуядерные клетки	Ia	RI
Молодой	-0,6 $p=0,57$	-0,18 $p=0,17$	-0,21 $p=0,11$	0,03 $p=0,82$
Средний	0,48 $p=0,44$	0,57 $p=0,46$	0,14 $p=0,83$	0,49 $p=0,43$
Пожилой	-0,58 $p=0,34$	-0,57 $p=0,36$	0,99 $p=0,05$	-0,96 $p=0,03$
Старческий	0,98 $p=0,04$	-0,99 $p=0,06$	0,99 $p=0,05$	0,97 $p=0,04$

Таблица 4

Буккальная цитограмма, Ме (Q1;Q3)

Показатели	Молодой возраст (18–44 года)	
	Контрольная группа (n=51)	Группа спортсменов (n=125)
Клетки с микроядрами	0 (0-1,6)	0,1 (0-1,2); $p=0,09$
Клетки с протрузиями	0,2 (0,1-1,5)	0,1 (0-0,1); $p=0,08$
Двуядерные клетки	1,2 (0,8-2,0)	2 (0,1-3,2); $p=0,08$
Клетки с перинуклеарной вакуолью	0,6 (0,2-1,0)	1,2 (0,3-2,3); $p=0,04$
Конденсация хроматина	1,9 (0,8-3,6)	2,9 (0,4-3,6); $p=0,06$
Клетки с признаками кариопикноза	0,8 (0,4-1,4)	1,1 (0,9-1,8); $p=0,07$
Клетки с признаками кариорексиса	0,6 (0-2,2)	0,8 (0,1-1,2); $p=0,09$
Клетки с признаками кариолизиса	2,4 (1,1-4,8)	2,8 (1,6-3,1); $p=0,07$
Клетки с апоптозными тельцами	0,2 (0-0,6)	0,1 (0-0,3); $p=0,08$

реактивность буккальных эпителиоцитов очень высока, то воздействие на протяжении всей жизни факторов как внешней, так и внутренней среды находят отражение в БЭ [24–28].

Большой интерес вызывает особая группа здоровых людей – спортсменов. При проведении осмотра пациенты жалоб не предъявляли. В ходе оценки стоматологического статуса у лиц данной группы было выявлено механическое повреждение эмали зубов: из-за травматической окклюзии, гипертонуса и парафункции

жевательных мышц. Вместе с этим, имела место тенденция к повышению стоматологических индексов – КПУ, РМА, ОНІ-S.

Поэтому не удивительно, что некоторые цитологические характеристики БЭ спортсменов отличались от таковых в контрольной группе (здоровые люди того же возраста, 18 – 44 года) (табл. 4).

Исключение составили клетки с перинуклеарной вакуолью, уровень которых был выше в 2 раза. Большинство авторов данный признак связывают с ранними стадиями деструкции ядра, которые могут возникать как в результате апоптоза, так и некроза клетки. Повышение числа клеток с перинуклеарной вакуолью у здоровых спортсменов объясняют деструктивным психоэмоциональным состоянием, возникающим, как в ходе тренировок, так и во время соревнований [29]. В то же время было установлено, что в условиях современного спорта физические нагрузки приводят к более выраженным воспалительным процессам в слизистой оболочке ротовой полости и тканях пародонта [30]. Это может быть обусловлено длительным сдавливанием челюсти в ходе тренировки, а также и другими факторами.

Полученные нами данные, в целом, не противоречат результатам других исследований [24]. При анализе результатов в небольших группах спортсменов в зависимости от вида спорта, мы не выявили заметной разницы в цитологической картине БЭ.

Следовательно, анализ представленных результатов позволяет полагать, что увеличение числа буккальных эпителиоцитов с перинуклеарной вакуолью связано с физическими нагрузками и связанным с этим окклюзионным синдромом, что в дальнейшем можно учитывать при разработке лабораторного мониторинга спортсменов.

Заключение. В проведенном исследовании установлено, что с возрастом в буккальном эпителии нарастает число клеток с признаками дегенерации ядра – апоптозом. Индекс апоптоза имеет высокую положительную корреляционную связь со старческим возрастом. У спортсменов молодого возраста увеличено число буккальных эпителиоцитов с перинуклеарной вакуолью, что, скорее всего, отражает повышенные механические нагрузки на челюстно-лицевой аппарат во время спортивных занятий. Полученные данные требуют внимания специалистов при разработке алгоритма лабораторного мониторинга в целях персонализированного подхода к охране стоматологического здоровья спортсменов и лиц старших возрастных групп.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 4, 6 – 15, 19, 21 – 23, 25 – 28 см. REFERENCES)

- Седов Е.В., Линькова Н.С., Козлов К.Л., Кветная Т.В., Коновалов С.С. Буккальный эпителий как объект оценки биологического возраста и темпа старения организма. *Успехи геронтологии*. 2013; 26(4): 610–3.
- Залевская М.А. Возрастная периодизация в Российской Федерации в современных условиях. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2020; 102(12): 17–20.
- Клиническая лабораторная аналитика. Том 2. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Меньшиков В.В., ред. М.: Лабинформ-РАМЛД; 1999.
- Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека. *Гигиена и санитария*. 2012; (6): 68–72.

20. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Самоделкин А.Г., Белов А.А., Гушин В.А. Оценка генотоксических эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018;(12):297-301.
24. Калаев В.Н., Нечаева М.С. Аномалии ядра в клетках буккального эпителия спортсменов-единоборцев с разным уровнем агрессивности и полиморфизмом генов серотонинергической системы. Сборник научных статей Всероссийской с международным участием очно-заочной научно-практической конференции. *Физическая культура, спорт и здоровье в современном обществе*. Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга»; 2016: 360-6.
29. Калаев В.Н., Нечаева М.С. Изучение частоты клеток с аномалиями ядра в буккальном эпителии спортсменов в зависимости от места, занятого на спортивном соревновании. *Гигиена и санитария*. 2016;(10): 992-6.
30. Булкина Н.В. Взаимосвязь и взаимовлияние воспалительных заболеваний пародонта на сердечно-сосудистую систему и желудочно-кишечный тракт. *Клиническая стоматология*. 2010;(2): 28–9.
13. Selvi B., Demirtas H., Eroz R., Imamoglu N. Reduction of the argyrophilic nucleolar organizing region associated protein synthesis with age in buccal epithelial cells of healthy individuals. *Aging Clin. Exp. Res.* 2015;27(2):201-8. DOI: 10.1007/s40520-014-0263-6.
14. Carroll J.E., Mahrer N.E., Shalowitz M., Ramey S., Dunkel Schetter C. Prenatal maternal stress prospectively relates to shorter child buccal cell telomere length. *Psychoneuroendocrinology*. 2020;121:104841. DOI:10.1016/j.psyneuen.2020.104841.
15. Torres-Bugarin O., Zavala-Cerna M.G., Nava A., Flores-Garcia A., Ramos-Ibarra M.L. Potential uses, limitations, and basic procedures of micronuclei and nuclear abnormalities in buccal cells. *Dis. Markers*. 2014;956835. DOI: 10.1155/2014/956835.
16. Zalevskaya M.A.. Age periodization in the Russian Federation in modern conditions. *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2020: 102(12):17-20. (in Russian)
17. Clinical laboratory analytics. Private analytical technologies in the clinical laboratory. Vol.2. [Klinicheskaya laboratornaya analitika. Chastnye analiticheskie tekhnologii v klinicheskoy laboratorii. Tom 2]. Men'shikov V.V., ed. Moscow: Labinform-RAMLD; 1999. (in Russian)
18. Sycheva L.P. Cytogenetic monitoring to assess the safety of the human environment. *Gigiena i sanitariya*. 2012;6: 68–72. (in Russian)
19. Taghibakhsh M., Farhadi S., Babaei A., Sheikhi M. The effect of hookah use on buccal mucosa: evaluation of repair index. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2019;20(4):1109-12.
20. Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignat'ev P.S., Samodelkin A.G., Belov A.A., Gushchin V.A. Evaluation of genotoxic effects in the buccal epithelium in violation of the adaptive status of the organism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018: (12): 297-301. (in Russian)
21. Driessen H.E., Voorn S.M., Bourfiss M., Mirzad F., Mirzad F., On-sri L. E. et al. Buccal mucosa cells as a potential diagnostic tool to study onset and progression of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;21: 23(1):57. DOI: 10.3390/ijms23010057.
22. Reimann R H., Stopper H., Polak T., Lauer M., Herrmann M.J., Deckert J. et al. Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of patients with neurodegenerative diseases. *Sci. Rep.* 2020: 10(1): 22196. DOI: 10.1038/s41598-020-78832-y.
23. Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing. Res. Rev.* 2015: 23: 90-100. DOI: 10.1016/j.arr.2015.04.002.
24. Kalaev V.N., Nechaeva M.S. Nucleus anomalies in buccal epithelial cells of combat athletes with different levels of aggressiveness and polymorphism of serotonergic system genes. Collection of scientific articles of the All-Russian with international participation part-time scientific and practical conference. *Fizicheskaya kul'tura, sport i zdorov'e v sovremennom obshchestve*. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2016: 360-6. (in Russian)
25. Cuello-Almarales D.A., Almaguer-Mederos L.E., Vázquez-Mojena Y., Almaguer-Gotay D., Zayas-Feria P., Laffita-Mesa J.M. et al. Buccal cell micronucleus frequency is significantly elevated in patients with spinocerebellar ataxia type 2. *Archives of Medical Research*. 2017;48(3):297-302.
26. Gajaria P.K., Maheshwari U.M., Borkar D.B., Dhar R., Pancholi V. Buccal mucosa exfoliative cell prussian blue stain co-relates with iron overload in β -thalassemia major patients. *Indian Journal Hematology Blood Transfusion*. 2017;33(4):559-64.
27. Khan S., Khan A.U., Hasan S. Genotoxic assessment of chlorhexidine mouthwash on exfoliated buccal epithelial cells in chronic gingivitis patients. *Journal Indian Society Periodontology*. 2016;20(6):584-91.
28. Sahu M., Suryawanshi H., Nayak S., Kumar P. Cytomorphometric analysis of gingival epithelium and buccal mucosa cells in type 2 diabetes mellitus patients. *Journal Oral and Maxillofacial Pathology*. 2017;21(2): 224-8.
29. Kalaev V.N., Nechaeva M.S. The study of the frequency of cells with nuclear anomalies in the buccal epithelium of athletes, depending on the place occupied in a sports competition. *Gigiena i sanitariya*. 2016: (10): 992-6. (in Russian)
30. Bulkina N.V. The relationship and mutual influence of inflammatory periodontal diseases on the cardiovascular system and the gastrointestinal tract. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2010: (2): 28–9. (in Russian)

REFERENCES

1. Kim Y.G., Lee S.M., Bae S., Park T., Kim H., Jang Y. et al. Effect of Aging on Homeostasis in the Soft Tissue of the Periodontium: A Narrative Review. *J. Pers. Med.* 2021;11(1): 58.
2. Meschiari C.A., Ero O.K., Pan H., Finkel T., Lindsey M.L. The impact of aging on cardiac extracellular matrix. *Geroscience*. 2017: 39(1): 7-18. DOI: 10.1007/s11357-017-9959-9.
3. Song H.K., Noh E.M., Kim J.M., You Y.O., Kwon K.B., Lee Y.R. Reversine inhibits MMP-3, IL-6 and IL-8 expression through suppression of ROS and JNK AP-1 activation in interleukin-1 β -stimulated human gingival fibroblasts. *Arch. Oral Biol.* 2019;12:34-45.
4. Carbone A., Linkova N., Polyakova V., Mironova E., Hashimova U., Gadzhiev A. et al., Melatonin and sirtuins in buccal epithelium: potential biomarkers of aging and age-related pathologies. *Int. J. Mol. Sci.* 2020: 21(21): 8134. DOI: 10.3390/ijms21218134.
5. Sedov E.V., Lin'kova N.S., Kozlov K.L., Kvetnaya T.V., Kononov S.S. Buccal epithelium as an object for assessing the biological age and the rate of aging of the organism. *Uspekhi gerontologii*. 2013: 26 (4): 610–3. (in Russian)
6. Arul P., Shetty S., Masilamani S. Evaluation of micronucleus in exfoliated buccal epithelial cells using liquid-based cytology preparation in petrol station workers. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* 2017;38(3): 273–6.
7. Benvindo-Souza M., Assis R. A., Oliveira E. A.S., Borges R. E., Santos L. RS. The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017: 24 (36): 27724–30.
8. Franzke B., Schober-Halper B., Hofmann M., Oesen S., Tosevska A., Nersesyan A., et al. Chromosomal stability in buccal cells was linked to age but not affected by exercise and nutrients – Vienna Active Ageing Study (VAAS), a randomized controlled trial. *Redox. Biol.* 2020: 28:101362. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101362.
9. Finnicum C.T., Dolan C.V., Willemsen G., Weber Z.M., Petersen J.L., Beck J.J. et al. Relative telomere repeat mass in buccal and leukocyte-derived DNA. *PLoS. One*. 2017;26:12(1):e0170765. DOI: 10.1371/journal.pone.0170765.
10. Hautekiet P., Nawrot T.S., Janssen B.G., Martens D.S., De Clercq E.M., Dadvand P. et al. Child buccal telomere length and mitochondrial DNA content as biomolecular markers of ageing in association with air pollution. *Environ. Int.* 2021;147:106332. DOI: 10.1016/j.envint.
11. Hopf N.B., Danuser B., Bolognesi C., Wild P. Age related micronuclei frequency ranges in buccal and nasal cells in a healthy population. *Environ. Res.* 2020;180:108824.
12. Nallamala S., Guttikonda V. R., Manchikatl P. K., Taneeru S. Age estimation using exfoliative cytology and radiovisiography: A comparative study. *J. Forensic. Dent. Sci.* 2017;9 (3):144–8.

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЖИДКИХ ТРАНСПОРТНЫХ СРЕД В БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

Представлены результаты оценки эффективности использования жидких транспортных сред на преаналитическом этапе бактериологической диагностики дифтерийной инфекции. Использован типовой токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665. Использована лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), транспортная система с ворсистым зонд-тампоном (DELTALAB) и транспортная система Σ -Transwab® с Sigma-тампоном из пенистого полиуретана (Medical Wire & Equipment Co. (Bath) Ltd.). Тампоны пулировали 24-часовой бактериальной культурой *C. diphtheriae*, имитировали условия хранения в течение 6 и 24 ч: при комнатной температуре $+(20-25)^{\circ}\text{C}$, в холодильнике $+(4-8)^{\circ}\text{C}$, в термостате $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$, далее производили высеив на кровяной теллуритовый агар и подсчитывали КОЕ/мл. Хранение *C. diphtheriae* оптимально на двух жидких транспортных системах в холодильнике $+(4-8)^{\circ}\text{C}$ в течение 6 и 24 ч; при комнатной температуре $+(20-25)^{\circ}\text{C}$ отмечалось снижение высеваемости через 6 ч и потеря патологического материала через 24 ч, которая была более выражена с ворсистого зонд-тампона; в условиях термостата $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ на обеих транспортных системах отмечено снижение высеваемости через 6 ч и полная потеря патологического материала через 24 часа. Продемонстрирована эффективность использования жидкой транспортной среды Эймса, что обосновывает необходимость разработки отечественного аналога транспортной системы на основе жидкой среды Эймса с ворсистым тампоном для бактериологической диагностики дифтерийной инфекции.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; транспортные среды; жидкая среда Эймса; бактериологическая диагностика; условия хранения; биологический материал.

Для цитирования: Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С. Эффективность использования жидких транспортных сред в бактериологической диагностике дифтерийной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 350-354. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-350-354>

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций; e-mail: olgborisova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 28.03.2022

Принята к печати 30.03.2022

Опубликовано 20.06.2022

Gadua N.T., Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Afanasiev S.S.

EFFECTIVENESS OF USING LIQUID TRANSPORT MEDIA IN BACTERIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF DIPHTHERIA INFECTION

G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation

The results of evaluating the effectiveness of the use of liquid transport media at the preanalytical stage of bacteriological diagnosis of diphtheria infection are presented. A typical toxigenic strain of *C. diphtheriae* biovar *gravis* № 665 was used. The experiments were carried out using a laboratory-prepared medium based on GRM-broth (State research center for applied biotechnology and microbiology, Obolensk), a transport system with a fleecy probe swab (DELTALAB) and a transport system Σ -Transwab® with a polyurethane Sigma-swab (Medical Wire & Equipment Co. (Bath) Ltd.). The tampons were pooled with a 24-hour bacterial culture of *C. diphtheriae*, then immediately seeded on Tellurite-containing blood agar. Storage conditions were simulated for 6-24 hours: at room conditions $+(20-25)^{\circ}\text{C}$, in the refrigerator $+(4-8)^{\circ}\text{C}$, in a thermostat $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Storage of *C. diphtheriae* was most optimal on two liquid transport systems in a refrigerator $+(4-8)^{\circ}\text{C}$ for 6 and 24 hours; in room conditions $+(20-25)^{\circ}\text{C}$ – there was a decrease in seeding after 6 hours and loss of pathological material after 24 hours, more pronounced on a fleecy probe swab; under thermostat conditions $+(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ on both transport systems, a decrease in seeding was noted after 6 hours and a complete loss of pathological material after 24 hours. The results obtained demonstrated the efficiency of using the Amies liquid transport medium and justify the need to develop a domestic analogue of the transport system based on the Amies liquid medium for the bacteriological diagnosis of diphtheria infection.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; transport media; Amies liquid transport media; bacteriological diagnosis; storage conditions; biological material.

For citation: Gadua N.T., Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Afanasiev S.S. Effectiveness of using liquid transport media in bacteriological diagnostics of diphtheria infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 350-354 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-350-354>

For correspondence: Borisova O.Yu., doctor of medicine (MD), professor, head of laboratory of diagnostic of diphtheria and pertussis infections; e-mail: olgborisova@mail.ru

Information about authors:

Gadua N.T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Pimenova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Borisova O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;

Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Afanasyev S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>.

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

Acknowledgment. *The work was performed within the framework of the sectoral program of Rospotrebnadzor.*

Received 28.03.2022
Accepted 30.03.2022
Published 20.06.2022

Введение. Основной задачей бактериологической диагностики дифтерийной инфекции является идентификация возбудителя с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки (3-5 дней с момента обследования) СанПиН 3.3686-21¹ и МУК 4.2.3065-13².

Одним из важнейших этапов любого лабораторного, в том числе и бактериологического исследования, от которого зависит эффективность проведения и своевременность выдачи окончательного ответа, является преаналитический этап – взятие и доставка биологического материала. Правильность осуществления этого этапа определяет 80% эффективности самого бактериологического исследования и, соответственно, своевременность выдачи окончательного ответа [1]. Взятие биологического материала на дифтерию осуществляется двумя сухими стерильными тампонами, которые должны быть доставлены в бактериологическую лабораторию в течение 3 ч (МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции»). Соблюдение этих условий возможно только если материал у пациента забирается в первой половине рабочего дня. Вместе с тем взятие биологического материала на дифтерию в лечебно-профилактических организациях производится на протяжении всего рабочего дня. В связи с этим, с целью предотвращения потери патологического материала взятие его допускается в жидкие транспортные среды, приготовленные в лабораторных условиях, с последующим его термостатированием и доставкой в лабораторию на следующий день. Применение лабораторно-приготовленной транспортной среды сопряжено с определёнными трудностями, связанными с необходимостью приготовления этой среды по рецепту с добавлением дополнительных компонентов и ограничением срока хранения (не более 10 дней).

Транспортная жидкая среда Эймса используется в повседневной практике клинической микробиологии. Для того чтобы избежать потерь биологического материала на преаналитическом этапе при использовании транспортных сред важным является оценка функциональной активности транспортной среды и выживаемости различных видов микроорганизмов, в том числе, требовательных, на этих питательных средах [2]. В литературе опубликованы результаты культивирования на жидких транспортных средах с сохранением жизнеспособности таких микроорганизмов, как *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Prevotella melaninogenica*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides*

fragilis, *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Propionibacterium acnes* и др. [3–7]. Важное значение принадлежит материалу тампона, обладающему различными адсорбирующими свойствами, и условиям хранения до посева на плотные питательные среды в бактериологической лаборатории. В ряде исследований при моделировании транспортировки показаны преимущества условий холодной температуры по сравнению с таковыми при комнатной температуре [2–6]. Ранее нами проведены эксперименты по хранению биологического материала в транспортной системе «Тупферы для мазков в пробирке со средой Эймса без угля» (Σ-Transwab®), которые показали возможность её использования для взятия материала на дифтерию [8].

Цель работы – оценка влияния использования жидких транспортных сред с различными видами тампонов и условий их хранения на высеваемость возбудителя дифтерии в рамках бактериологической диагностики.

Материал и методы. Использован контрольный токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) биовара *gravis* № 665 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК»).

Бактериальную культуру *C. diphtheriae* выращивали на кровяно-теллуритовом агаре (КТА) на основе 2% агара (ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ООО «ЛейТран», Москва), 0,02% теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с инкубацией при температуре +(37±1)°С в течение 24-48 часов.

Использована лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), приготовленная согласно МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции», транспортная система с ворсистым зонд-тампоном с точкой слома 80 мм (DELTALAB) и транспортная система Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса и универсальным Sigma-тампоном из пенистого полиуретана (Medical Wire & Equipment Co. (Bath) Ltd.).

Результаты. С целью оценки влияния жидких транспортных сред на эффективность бактериологической диагностики дифтерийной инфекции готовили три линейки последовательных десятикратных разведений бактериальной культуры типового токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 в стерильном физиологическом растворе в соответствии со стандартным образцом 10 ЕД мутности (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ, Москва) – согласно МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Все разведения контролировались путём посева по 100 мкл из каждого разведения на три чашки Петри с КТА. Засеянные чашки инкубировали при +(37±1)°С в течение 24-48 ч и подсчитывали число выросших колоний (КОЕ / мл) (табл. 1).

Эффективность оценивалась в модельных экспериментах на иммитантах клинических образцов. В лабо-

¹СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний» (раздел XXXVIII «Профилактика дифтерии»).

²Методические указания МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

раторных условиях на тампоны, используя стерильный наконечник с аэрозольным барьером, наносили (пулпировали) 100 мкл бактериальной взвеси типового контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара gravis № 665 с различной концентрацией микробных клеток в 1 мл (табл. 1). Использованы три концентрации бактериальной взвеси – 5×10^4 , 5×10^3 , 10^3 м.к. Бактериальную взвесь каждой концентрации наносили (пулпировали) на тампоны и помещали в транспортные среды: в лабораторно-приготовленную транспортную среду на основе ГРМ-бульона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), транспортную систему (DELTA LAB), транспортную систему Σ -Transwab®. «Имитировали» условия работы медицинских организаций по хранению тампонов с биологическим материалом на дифтерию до их транспортировки в бактериологическую лабораторию в течение 6 и 24 ч: на столе при комнатной температуре $+(20-25)^\circ\text{C}$, в холодильнике $+(4-8)^\circ\text{C}$, в термостате $+(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. После пулпирования бактериальной взвеси, первую партию тампонов оставляли на столе при комнатной температуре $+(20-25)^\circ\text{C}$ на 6 ч; вторую партию – в холодильнике при $+(4-8)^\circ\text{C}$ на 6 ч; третью партию – в термостате при $+(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 6 ч; четвёртую партию – на столе при комнатной температуре $+(20-25)^\circ\text{C}$ на 24 ч; пятую – в холодильнике при $+(4-8)^\circ\text{C}$ на 24 ч; шестую партию – в термостате при $+(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 24 часа. После инкубации все тампоны засеивали в трёх повторях на КТА. Высев на КТА осуществляли штриховыми движениями по всей поверхности агара с четырёхкратным поворачиваем чашки Петри на 60° . Учёт культурально-морфологических свойств выросших колоний проводили через 24 и 48 ч роста, согласно МУК 4.2.3065-13 раздела контроля качества питательных сред для первичного посева биологического материала, где питательная среда считается пригодной для использования при наличии роста колоний из концентрации 5×10^3 м.к. и единичных колоний из концентрации 10^3 м.к. В качестве сравнения использована лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона, регламентированная МУК 4.2.3065-13.

При имитации условий хранения биологического материала в течение 6 ч в двух жидких транспортных системах получены следующие результаты: при хранении в холодильнике $+(4-8)^\circ\text{C}$ отмечена хорошая высеваемость возбудителя дифтерии как из высоких концентраций микробной взвеси (5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 м.к.), так и из низкой концентрации 10^3 м.к., что соответствует требованиям по качеству питательных сред для первичного посева биологического материала на дифтерию; при хранении в комнатных условиях $+(20-25)^\circ\text{C}$ и в условиях термостата $+(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ рост колоний наблюдался из разведений 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 м.к. и отсутствовал – из концентрации 10^3 м.к. (табл. 2). При использовании лабораторно-приготовленной среды и её хранении в условиях холодильника $+(4-8)^\circ\text{C}$ и термостата $+(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ рост колоний отмечен из всех концентраций, при хранении в комнатных условиях $+(20-25)^\circ\text{C}$ рост возбудителя сопоставим с таким же, как в жидких транспортных системах.

При увеличении интервала исследования до 24 ч оказалось, что после хранения в условиях холодильника $+(4-8)^\circ\text{C}$ хорошая высеваемость возбудителя дифтерии наблюдалась из всех испытуемых концентраций бактериальной взвеси в транспортных системах, в лабораторно-приготовленной среде рост колоний отсутствовал из концентрации 10^3 м.к.; в комнатных условиях $+(20-25)^\circ\text{C}$ рост возбудителя в транспортной системе с ворсистым зонд-тампоном был только из высокой концентрации бактериальной взвеси

Таблица 1

Приготовление разведений и учёт КОЕ/мл на КТА

Разведение	Количество м.к. в 1 мл взвеси	Среднее количество КОЕ в 1 мл	
		24 ч	48 ч
–1	5×10^8	спл / рост	спл / рост
–2	5×10^7	спл / рост	спл / рост
–3	5×10^6	гст / рост	мнж / рост
–4	5×10^5	$5,52 \times 10^2$	$5,52 \times 10^2$
–5	5×10^4	$5,91 \times 10^2$	$6,42 \times 10^2$
–6	5×10^3	$1,14 \times 10^2$	$1,29 \times 10^2$
–7	10^3	$1,35 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1$

Примечание. спл / рост – сплошной рост, гст / рост – густой рост, мнж / рост – множественный рост.

си (5×10^5 м.к.) и отсутствовал из всех других концентраций, в транспортной системе Σ -Transwab® рост отмечался из высоких концентраций (5×10^5 – 5×10^3 м.к.) и отсутствовал из концентрации 10^3 м.к.; хранение возбудителя в условиях термостата $+(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ вело к полной потере патологического материала, как из высоких, так и из низких концентраций микробной взвеси, в то время как хранение в лабораторно-приготовленной среде в комнатных условиях и в термостате способствовало массивному росту возбудителя (табл. 2).

Обсуждение. По данным аналитических материалов по организации исследований на дифтерию, собранных в рамках работы Референс-центра по мониторингу за возбудителями кори, краснухи, эпидемического паротита, коклюша и дифтерии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, для взятия биологического материала в ряде регионов России используются коммерческие транспортные агаризованные среды Стюарта и Эймса, предназначенные для изучения микрофлоры ротоглотки [9–12]. Нами ранее проведены исследования [12, 13], которые показали, что при помещении биологического материала в агаризованные транспортные среды Эймса и Стюарта и их хранении в условиях комнатной температуры и холодильника в течение 6 ч рост единичных колоний токсигенного штамма *C. diphtheriae* получен только из большой концентрации микробной взвеси (5×10^4 м.к.); выдерживание материала при комнатной температуре и в холодильнике в течение 20 ч вело к полной потере патологического материала; подраживание материала в термостате в течение 6 ч не даёт положительных результатов и не позволяет увеличить высеваемость возбудителя дифтерии. Несколько лучшие результаты получены при подраживании материала в этих условиях в течение 18–20 ч, когда удалось идентифицировать единичные колонии возбудителя дифтерии из концентрации 5×10^3 м.к., но отсутствие роста из концентрации 10^3 м.к. При добавлении в бактериальную взвесь *Staphylococcus aureus* и пулпирование тампонов смешанной бактериальной культурой вело к массовому росту стафилококков, которые «забивали» рост возбудителя дифтерии. Следовательно, взятие биологического материала в агаризованные среды Эймса и Стюарта может вести к потере патологического материала и, соответственно, к снижению высеваемости и выделяемости возбудителя дифтерии, что, в целом, негативно скажется на качестве проведения исследований на дифтерию.

Проведенные исследования показали, что транспортные системы на основе жидкой среды Эймса могут быть

Таблица 2

Высев бактериальной суспензии на КТА из транспортных сред

Посев с тампона через 6 ч после его заражения / условия хранения +(4-8)° С						
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон					
	Лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона и вязкозный тампон		тупферы с ворсистым зонд-тампоном с жидкой средой Эймса (тампон / осадок)		Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса со стандартным аппликатором (полиуретан)	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
5×10^5	$4,12 \times 10^2$	$4,48 \times 10^2$	$3,04 \times 10^2 / 2,52 \times 10^2$	$3,04 \times 10^2 / 3,20 \times 10^2$	$2,85 \times 10^3$	$2,87 \times 10^3$
5×10^4	$2,6 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$	$5,2 \times 10^1 / 6,3 \times 10^1$	$5,2 \times 10^1 / 6,5 \times 10^1$	$4,2 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$
5×10^3	6	6	6 / 6	7 / 7	$1,1 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$
10^3	4	4	1 / 1	1 / 1	1	1
Посев с тампона через 6 ч после его заражения / условия хранения + (20 – 25) °С						
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон					
	Лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона и вязкозный тампон		тупферы с ворсистым зонд-тампоном с жидкой средой Эймса		Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса со стандартным аппликатором (полиуретан)	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
5×10^5	мнж / рост	мнж / рост	$1,68 \times 10^2 / 7,2 \times 10^1$	$2,16 \times 10^2 / 8,8 \times 10^1$	$1,6 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$
5×10^4	$6,52 \times 10^2$	$7,68 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1 / 3,0 \times 10^1$	$2,9 \times 10^1 / 3,2 \times 10^1$	3×10^1	4×10^1
5×10^3	$6,6 \times 10^1$	$6,6 \times 10^1$	1 / 2	2 / 3	2	8
10^3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0	0
Посев с тампона через 6 ч после его заражения / условия хранения + (37 ± 1) °С						
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон					
	Лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона и вязкозный тампон		тупферы с ворсистым зонд-тампоном с жидкой средой Эймса		Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса со стандартным апплика- тором (полиуретан)	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
5×10^5	спл / рост	спл / рост	$5,3 \times 10^1 / 2,7 \times 10^1$	$7,1 \times 10^1 / 3,2 \times 10^1$	$3,3 \times 10^2$	$3,5 \times 10^2$
5×10^4	мнж / рост	мнж / рост	9 / 11	$1,0 \times 10^1 / 1,7 \times 10^1$	9×10^1	1×10^2
5×10^3	$4,00 \times 10^2$	$4,16 \times 10^2$	1 / 1	1 / 1	2	2
10^3	$1,35 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	0 / 0	0 / 0	0	1
Посев с тампона через 24 ч после его заражения / условия хранения + (4 – 8) °С						
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон					
	Лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона и вязкозный тампон		тупферы с ворсистым зонд-тампоном с жидкой средой Эймса		Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса со стандартным аппликатором (полиуретан)	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
5×10^5	$1,72 \times 10^2$	$2,44 \times 10^2$	$1,76 \times 10^2 / 2,64 \times 10^2$	$1,84 \times 10^2 / 4,24 \times 10^2$	$1,36 \times 10^3$	$1,58 \times 10^3$
5×10^4	$2,1 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$	$8,0 \times 10^1 / 1,02 \times 10^2$	$9,2 \times 10^1 / 1,06 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$
5×10^3	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	2 / 5	4 / 5	4×10^1	6×10^1
10^3	0	0	1 / 5	1 / 5	4	6
Посев с тампона через 24 ч после его заражения / условия хранения + (20 – 25) °С						
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон					
	Лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона и вязкозный тампон		тупферы с ворсистым зонд-тампоном с жидкой средой Эймса		Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса со стандартным аппликатором (полиуретан)	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
5×10^5	спл / рост	спл / рост	4 / 0	4 / 0	$1,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
5×10^4	мнж / рост	спл / рост	0 / 0	0 / 0	1×10^1	$1,3 \times 10^1$
5×10^3	мнж / рост	спл / рост	0 / 0	0 / 0	0	6
10^3	гст / рост	гст / рост	0 / 0	0 / 0	0	0
Посев с тампона через 24 ч после его заражения / условия хранения + (37 ± 1) °С						
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон					
	Лабораторно-приготовленная среда на основе ГРМ-бульона и вязкозный тампон		тупферы с ворсистым зонд-тампоном с жидкой средой Эймса		Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса со стандартным апплика- тором (полиуретан)	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
5×10^5	спл / рост	спл / рост	0 / 0	0 / 0	0	0
5×10^4	спл / рост	спл / рост	0 / 0	0 / 0	0	0
5×10^3	мнж / рост	спл / рост	0 / 0	0 / 0	0	0
10^3	гст / рост	гст / рост	0 / 0	0 / 0	0	0

Примечание. спл / рост – сплошной рост, гст / рост – густой рост, мнж / рост – множественный рост.

использованы для взятия биологического материала на дифтерию, в частности, во второй половине рабочего дня. Наилучшая высеваемость возбудителя дифтерии регистрировалась при его хранении в условиях холодильника $+(4-8)^{\circ}\text{C}$ в течение 6 или 24 часов. Лабораторно-приготовленная транспортная среда обладает хорошими ростовыми свойствами, однако ограничения по её приготовлению и срокам хранения делает возможным её использование только в условиях лаборатории для пассажа бактериальных культур.

Отмечено, что ворсистый тампон обладает лучшими адсорбирующими свойствами (хорошо впитывает и отдаёт бактериальную взвесь), в то время как тампон из пенополиуретана более гидрофобен и плохо адсорбирует бактериальную взвесь. Наличие шва на пенополиуретановом тампоне вызывает повреждение агара при посеве. При использовании ворсистого зонд-тампона патологический материал сохраняется как на тампоне, который может быть засян на плотные питательные среды первичного посева, так и осаждаётся в виде осадка. При высева материала с ворсистого зонд-тампона и осадка получены идентичные результаты. Наличие роста возбудителя дифтерии с ворсистого зонд-тампона и из осадка свидетельствует о возможности использования этого зонд-тампона для взятия биоматериала для бактериологических исследований (при его посеве на среды первичного посева) и одновременно в генодиагностике дифтерии (при использовании осадка).

Полученные результаты послужили обоснованием правил хранения биологического материала в жидких транспортных средах в медицинских организациях до его доставки в лабораторию, которые вошли в проект нового нормативного методического документа «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Заключение. Транспортные среды с жидкой средой Эймса могут быть использованы для взятия и транспортирования биологического материала на дифтерию во второй половине рабочего дня с лучшими ростовыми свойствами при хранении в условиях холодильника. Полученные результаты обосновывают необходимость разработки отечественного аналога транспортной системы на основе жидкой среды Эймса с ворсистым зонд-тампоном для бактериологической диагностики дифтерийной инфекции [14, 15].

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-7 см. REFERENCES)

1. Методики клинических лабораторных исследований. Том 3. Меншиков В.В., ред. М.: Лабора; 2009.
8. Чагина И.А., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С., Скворцов А.Г. Возможности применения жидкой транспортной среды для взятия патологического материала при лабораторной диагностике дифтерийной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (12): 783-7.
9. О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и серологической диагностике дифтерии в Российской Федерации в 2019 году. Информационное письмо Роспотребнадзора от 03.09.2019 г. № 02/12550-2019-32.
10. О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и серологической диагностике дифтерии в Российской Федерации в 2020 году. Информационное письмо Роспотребнадзора от 16.11.2020 г. № 02/23440-2020-27.
11. О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и серологической диагностике дифтерии в Российской Федерации в 2021 году. Информационное письмо Роспотребнадзора от 12.10.2021 г. № 02/20615-2021-27.
12. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Миронов А.Ю. и др. Состояние и проблемы бактериологической диагностики дифтерийной инфекции в Российской Федера-

- ции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 717-23.
13. Борисова О.Ю., Чагина И.А., Гадуа Н.Т. К вопросу о применении коммерческих транспортных сред для взятия патологического материала при обследовании на дифтерию. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. 2014; 3: 21-3.
14. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (6): 63-5.
15. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (8): 61-5.

REFERENCES

1. Methods of clinical laboratory research. Vol. 3. Menshikov V.V., ed. [Metodiki klinicheskikh laboratornykh issledovaniy. Tom 3. Men'shikov V.V., ed.]. Moscow: Labora; 2009. (in Russian)
2. Avolio M., Camporese A. Liquid based microbiological transport systems: conformity assessment of two commercial devices. *J. Microbiol. methods*. 2015; 115: 42-4.
3. Arbiq J.C., Forward K.R., LeBlanc J. Evaluation of four commercial transport media for the survival of *Neisseria gonorrhoeae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2000; 36 (3): 163-8.
4. Buchan B.W., Olson W.J., Mackey T.L., Ledebor N.A. Clinical evaluation of the walk-away specimen processor and ESwab for recovery of *Streptococcus agalactiae* isolates in prenatal screening specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52 (6): 2166-8.
5. Hirvonen J.J., Kaukoranta S.S. Comparison of FecalSwab and ESwab devices for storage and transportation of diarrheagenic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52 (7): 2334-9.
6. Nys S., Vijgen S., Magerman K., Cartuyvels R. Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 29 (4): 453-6.
7. Van Horn K.G., Audette C.D., Tucker K.A., Sebeck D. Comparison of 3 van transport systems for direct release and recovery of aerobic and anaerobic bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62 (4): 471-3.
8. Чагина И.А., Борисова О. Ю., Гадуа Н.Т., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С., Скворцов А.Г. Возможности использования жидкой транспортной среды для взятия патологического материала в лабораторной диагностике дифтерийной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (12): 783-7. (in Russian)
9. On the results of external quality control of studies on bacteriological diagnostics of diphtheria and pertussis and serological diagnostics of diphtheria in Russian Federation in 2019. Information letter of Rosptrebnadzor dated 03.09.2019. No. 02/12550-2019-32. [O rezul'tatah provedeniya vneshnego kontrolya kachestva issledovaniy po bakteriologicheskoy diagnostike difterii i koklyusha i serologicheskoy diagnostike difterii v Rossijskoj Federacii v 2019 godu. Informacionnoe pis'mo Rosptrebnadzora ot 03.09.2019 g. № 02/12550-2019-32.] (in Russian)
10. On the results of external quality control of studies on bacteriological diagnostics of diphtheria and pertussis and serological diagnostics of diphtheria in Russian Federation in 2020. Information letter of Rosptrebnadzor dated 16.11.2020. No. 02/23440-2020-27. [O rezul'tatah provedeniya vneshnego kontrolya kachestva issledovaniy po bakteriologicheskoy diagnostike difterii i koklyusha i serologicheskoy diagnostike difterii v Rossijskoj Federacii v 2020 godu. Informacionnoe pis'mo Rosptrebnadzora ot 16.11.2020 g. № 02/23440-2020-27.] (in Russian)
11. On the results of external quality control of studies on bacteriological diagnostics of diphtheria and pertussis and serological diagnostics of diphtheria in Russian Federation in 2021. Information letter of Rosptrebnadzor dated 12.10.2021. No. 02/20615-2021-27. [O rezul'tatah provedeniya vneshnego kontrolya kachestva issledovaniy po bakteriologicheskoy diagnostike difterii i koklyusha i serologicheskoy diagnostike difterii v Rossijskoj Federacii v 2021 godu. Informacionnoe pis'mo Rosptrebnadzora ot 12.10.2021 g. № 02/20615-2021-27.] (in Russian)
12. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Afanasiev S.S., Afanasiev M.S., Mironov A. Yu. et al. State and problems of bacteriological diagnosis of diphtheria infection in Russian Federation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (11): 717-23. (in Russian)
13. Borisova O.Yu., Chagina I.A., Gadua N.T. On the use of commercial transport media for taking pathological material when examining for diphtheria. *Meditsinskiy alfavit. Sovremennaya laboratoriya*. 2014; 3: 21-3. (in Russian)
14. Shepelin A. P., Domotenko L. V., Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Aleshkin V. A. The actual approaches to problem of import substitution in the field of production growth medium. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60 (6): 63-5. (in Russian)
15. Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Shepelin A. P., Aleshkin V. A. The condition and tendencies of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60 (8): 61-5. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Каргальцева Н.М.¹, Борисова О.Ю.¹, Миронов А.Ю.¹, Кочеровец В.И.², Пименова А.С.¹, Гадуа Н.Т.¹

ИНФЕКЦИЯ КРОВОТОКА У ГОСПИТАЛЬНЫХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;
²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ», 119991, Москва, Россия

*Инфекция кровотока (ИК) является причиной высокой летальности. Госпитальная инфекция кровотока (ГИК) осложняет гемодиализ, пневмонию, онкогематологические заболевания. Получение положительной гемокультуры зависит от объёма посева крови, количества проб крови, времени инкубации. Цель исследования: апробировать принципы микробиологической культивации в диагностике ИК у госпитальных больных терапевтического профиля. В исследование включены 848 госпитальных кардиологических пациентов, обследованных с подозрением на ИК. Внутривенно отбирали 10 мл крови шприцом, вносили кровь в 200 мл сердечно-мозговой среды (СМС) в анаэробный флакон. Инкубировали 7 и более суток в термостате при +37° С. При парном взятии крови с интервалом в 30 мин гемокультуры получены в 64,3% случаев, увеличение количества проб крови снижало эффективность получения гемокультур до 9,1%. При инкубации флаконов более 7 дней дополнительно получено 200 гемокультур, содержащих 239 штаммов микроорганизмов. Эпизоды ГИК чаще наблюдали при заболеваниях системы кровообращения (77,8%), включая инфекционный эндокардит (ИЭ) (47,0%), ревматизм (22,1%), миокардит (14,6%). Эпизоды ГИК чаще случались у мужчин при ИЭ и ишемической болезни сердца, у женщин – при ревматизме и миокардите. К группе риска ГИК отнесены пациенты 45-75 лет с вероятностью осложнения ГИК до 73,7% случаев. При исследовании крови 848 госпитальных пациентов кардиологического профиля выявили ГИК в 38,3% случаев. Среди клинических изолятов преобладали грамположительные кокки с лидерством *S. epidermidis*. Полимикробные гемокультуры (16,3%) характеризовались двумя и тремя ассоциантами в одной пробе крови. Среди гематологических показателей при ГИК отмечены: лейкоцитоз, повышенное СОЭ, лимфоцитоз, снижение гемоглобина; повышенные значения фибриногена, СРБ, γ -глобулина, α_2 -глобулина, сниженные уровни общего белка и А/Г коэффициента. Использованы приёмы микробиологической культивации. ГИК диагностирована у 38,3% терапевтических больных кардиологического профиля. Этиология ГИК характеризовалась полимикробностью в 16,3% случаев. Определены гематологические маркеры ГИК.*

Ключевые слова: терапевтические больные; госпитальная инфекция кровотока; гемокультура, маркеры госпитальной инфекции кровотока.

Для цитирования: Каргальцева Н.М., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Кочеровец В.И., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Инфекция кровотока у госпитальных терапевтических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 355-361. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-355-361>

Для корреспонденции: Каргальцева Наталья Михайловна, канд. мед. наук, науч. сотр.; e-mail: kargaltseva@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках плановой НИР ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.04.2022

Принята к печати 06.04.2022

Опубликовано 20.06.2022

Kargaltseva N.M.¹, Borisova O.Yu.¹, Kocherovets V.I.², Mironov A.Yu.¹, Pimenova A.S.¹, Gadua N.T.¹

BLOODSTREAM INFECTION IN HOSPITAL THERAPEUTIC PATIENTS

¹G. N. Gabrichevskii Moscow research institute for epidemiology and microbiology for Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia

*Bloodstream infection (BI) is the cause of high mortality. Hospital bloodstream infection (HBI) complicates hemodialysis, pneumonia, oncohematological diseases. Positive hemoculture obtaining depends on the volume of blood inoculation, the number of blood samples, the incubation time. To test the principles of microbiological culturomics in the diagnosis BI of hospital patients with a therapeutic profile. 848 hospital cardiac patients with suspected BI were included. 10 ml of blood were taken intravenously with a syringe, blood was inoculated into 200 ml of the heart-brain medium (HBM) in an anaerobic bottle. It was incubated for 7 or more days in a thermostat at +37° C. The hemocultures were obtained in 64.3% of cases with paired blood sampling with an interval of 30 minutes whereas an increase in the number of blood samples reduced the effectiveness of obtaining hemocultures to 9.1%. When incubating bottles for more than 7 days there were obtained 200 additional hemocultures containing 239 strains of microorganisms. Episodes of HBI were observed more often in the cases of the circulatory system (77.8%), including infectious endocarditis (IE) (47.0%), rheumatism (22.1%), myocarditis (14.6%). Episodes of HBI occurred more often in men with IE and coronary heart disease, in women – with rheumatism and myocarditis. Patients aged 45-75 were in the group of risk with a probability of complications of HBI up to 73.7%. When examining the blood of 848 hospital patients of cardiological profile HBI was detected in 38.3% of cases. Among clinical isolates gram-positive cocci with a great number *S. epidermidis* prevailed. Polymicrobial hemocultures (16.3%) were characterized by two and three associates in one blood sample. Among the hematological indicators in HBI there were: leukocytosis, increased ESR, lymphocytosis, decreased hemoglobin; increased values of fibrinogen, CRP, γ -globulin, α_2 -globulin, low levels of total protein and A/G coefficient. The techniques of microbiological culturomics were used. HBI was diagnosed in 38.3% of the therapeutic patients of cardiological profile. The etiology of HBI was characterized by polymicrobicity in 16.3% of cases. Hematological markers of HBI were identified.*

Key words: therapeutic patients; hospital bloodstream infection; hemoculture, markers of hospital bloodstream infection.

For citation: Kargaltseva N.M., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Kocherovets V.I., Pimenova A.S., Gadua N.T. Bloodstream infection in hospital therapeutic patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 355-361 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-355-361>

For correspondence: Kargaltseva N.M.; Ph.D. (Medicine), researcher; e-mail: kargaltseva@mail.ru

Information about authors:

Kargaltseva N. M., <https://orcid.org/0000-0002-3245-5486>;
Borisova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-523>;
Kocherovets V. I., <https://orcid.org/0000-0001-7720-670X>;
Pimenova A. S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Gadua N. T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 01.04.2022

Accepted 06.04.2022

Published 20.06.2022

Введение. Инфекция кровотока (ИК), как нозологическая единица, не включена в международную классификацию болезней (МКБ-10, МКБ-11), но является причиной летальности в Европе (48%) и в странах Африки (18,1%) [1–3]. ИК ведёт к летальному исходу при гемодиализе (16%), инвазивных микозах (20%), целлюлите (37%), нерациональной эмпирической антибиотикотерапии (21%), эпизодах повторных бактериемий (34%) [4, 5]. В России при ИК летальность чаще отмечают у больных онкогематологическими заболеваниями и иммунодефицитами (57%), инфекционным эндокардитом (25%), пневмонией (63%) [6–9]. ИК осложняет терапевтические заболевания: пневмонию (9,6%), периодонтит (42,5%), атопический дерматит, фарингит, острый пиелонефрит, колит, хроническую почечную недостаточность, онкогематологические заболевания [7, 10–13]. COVID-19 имеет тенденцию осложняться бактериальной инфекцией и микозами, среди которых чаще отмечают вторичную инфекцию кровотока (ВИК) (2–6%) [14]. Одним из факторов риска развития ВИК является поступление больного с COVID-19 в блок интенсивной терапии (66,7%) [14], где через 10 дней развиваются эпизоды ВИК в 67,4% случаев [15–18]. При исследовании крови больных с COVID-19 получены положительные гемокультуры бактерий в 91,4% случаев и грибов в 5,5%. Спектр возбудителей представлен: *Staphylococcus epidermidis* (24%), *S. aureus* (13%), *Enterococcus faecalis* (18%), *viridians Streptococcus* spp. (7%), *Enterobacter aerogenes* (9%), *Escherichia coli*, *Candida albicans* (7%), *C. glabrata*, *Sporothrix schenckii*, *Fusobacterium nucleatum* [16, 19–21]. Госпитализированные с COVID-19 и ВИК имели летальность в 53,1% случаев [19].

В России лабораторные приёмы для микробиологического исследования крови до 2020 г. регламентировались приказом Минздрава СССР № 535¹ от 22.04.1985 г., отечественными методическими, клиническими рекомендациями и учебными пособиями [22, 23]. В развивающихся странах используются методы ручного гемокультивирования [24, 25]. В развитых странах применяются полуавтоматизированные и автоматизированные системы гемокультивирования [25–27].

Получение положительной гемокультуры зависит от объёма инокулированной во флакон крови, так как каждый мл крови повышает вероятность роста микроорганизмов в питательной среде. К параметрам получения гемокультуры относят количество проб крови, время инкубации. Руководство CLSI² рекомендует 2–3 сета, по 10 мл крови в каждый флакон для диагностики 90–95% госпитальной инфекции кровотока (ГИК) [28]. При ИК в кровяном русле циркулирует небольшое количество микроорганизмов, от 1 до 1×10^4 КОЕ/мл, рекомендуется отбирать 20–30 мл крови при одной венопункции или увеличить посевной объём до 40–80 мл крови [29]. При добавлении к питательным средам смол, древесного угля соотношение объёмов крови к питательной среде допускается как 1:5 [30, 31]. При ручном гемокультивировании посеvy крови рекомендуется выдерживать до 7 дней, в автоматизированных системах – до 5 суток.

В рутинной практике применяются простые питательные среды: жидкая питательная среда, полужидкий питательный агар, полужидкая тиогликолевая среда, мясо-пептонный агар. Флаконы для автоматизированных гемокультуральных систем в большинстве случаев содержат триптозо-соевую питательную среду.

По данным Европейской рабочей группы по ГИК ведущими возбудителями являются: *S. epidermidis*, другие КНС, *S. aureus*, ассоциации микроорганизмов (22%) [32]. В России ведущими возбудителями ГИК являются *S. epidermidis* (11,0–39,1%) и *S. aureus* (23,5–27,5%) [7].

Цель исследования: апробировать принципы микробиологической культуромики в диагностике инфекции кровотока у госпитальных больных терапевтического профиля.

Материал и методы. В исследование включены пациенты, проходившие лечение в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России в период с 1985–2019 гг. Терапевтические пациенты ($n=848$) с кардиологическими диагнозами: инфекционный эндокардит (ИЭ), ревматизм, врождённые пороки сердца (ВПС), миокардит, ишемическая болезнь сердца (ИБС), лихорадка неясного происхождения (ЛНП) обследованы с подозрением на ИК. Для сбора информации использована разработанная карта, включающая данные анамнеза, клинические, клинико-лабораторные, бактериологические показатели.

¹Приказ Минздрава СССР № 535 от 22.04.1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

²«Principles and procedures for blood cultures; approved guideline». In: CLSI document M47-A: Wayne, PA, USA; 2007.

Оценены отклонения гематологических и биохимических показателей крови в роли клинико-лабораторных маркеров ИК.

При посеве цельной крови придерживались приказа Минздрава СССР № 535 от 1985 г.; Методических рекомендаций^{3,4}; рекомендаций иностранных руководств [33]. Внутривенно отбирали 10 мл крови шприцом, проколом вносили кровь в 200 мл сердечно-мозговой среды (СМС) в анаэробный флакон, закрытый резиновой пробкой, завальцованный металлическим колпачком и содержащий инертный газ-азот. Инкубировали 7 и более суток в термостате при температуре +37° С. При наличии признаков роста микроорганизмов во флаконе материал «кровь-среда» для субкультивирования высевали на 7% сердечно-мозговой гемагар (СМА) [34], культивировали в аэробных и анаэробных условиях при температуре +37° С для получения чистой культуры с последующей идентификацией и определением чувствительности к антибиотикам. Выросшие колонии микроорганизмов изучали с использованием стереоскопических микроскопов МСП-1 (ЛОМО, Россия), SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия), объектив PlanApo S 1,0×FWD 60 mm и окуляр PI 10×23 Bg foc. Культуральные свойства оценивали по характеру и размерам выросших колоний, наличию гемолиза; морфологические свойства – микроскопией мазков из колоний, окрашенных по Граму. Биохимические свойства определяли по выявлению сахаролитической и протеолитической ферментативной активности, с помощью биохимических тест-систем: набор реагентов «ДС-ДИФ-СТАФИ-16» (НПО «Диагностические системы», Н. Новгород), «СТАФИтест-16», «СТРЕПТОтест-16» (ERBA Lachema, Чехия). Для идентификации микроорганизмов использован бактериологический анализатор Auto SCAN-4 (Siemens Health-care Diagnostics, Германия), метод MALDI-ToF масс-спектрометрии при помощи VITEK® MS (bioMérieux, Франция) и анализатора микробиологического «VastoSCREEN» («Литех», Россия), включающий MALDI масс-спектрометр и программное обеспечение для управления анализом и идентификации микроорганизмов «VastoSCREEN-ID». В случае отсутствия видимых признаков роста микроорганизмов флаконы инкубировали более 7 суток, учитывая наличие медленно растущих микроорганизмов в пробе крови.

При статистической обработке данных исследования использовали пакет программ статистического анализа Statistica 10. При сравнении использовали критерий χ^2 (хи-квадрат) или критерий Фишера.

Результаты. Для оценки влияния количества проб крови на результат получения гемокультуры проанализированы 810 проб крови от 325 госпитальных терапевтических больных с подтверждённой ГИК, где на одного больного приходилось 2,5 пробы крови. У больных кровь отбирали однократно, двукратно с интервалом в 30 мин или более раз, до 16 проб крови.

Одна проба может быть результативной, при парном взятии крови гемокультуры получены в 64,3% случаев,

при 5 пробах – 45,0%, при 7 пробах – 50,0%, 16 пробах – 37,5% случаев. Увеличение количества проб крови снижало эффективность получения гемокультур до 9,1%. При анализе 287 парных проб крови получена гемокультура в одном флаконе в 55,4% и в двух флаконах – в 25,4% случаев. В 19,2% случаев получены отрицательные результаты в парных посевах. Последовательность роста микроорганизмов по флаконам показала наличие роста в первом флаконе чаще, чем во втором (58,2% и 42,8%, соответственно). Гемокультуры в парных пробах крови неоднородны: 73 парных флакона содержали микроорганизмы одного вида (64,0%), в 37,0% случаев выделена микробная ассоциация.

Для оценки целесообразности дополнительного времени инкубации флаконов, некоторые флаконы выдерживали в термостате более 7 суток. Полученные 438 положительные гемокультуры включали 238 гемокультур, полученных в пределах 7 сут (54,3%) и 200 – более 7 суток (45,7%) инкубации.

Чаще микроорганизмы давали видимый рост через 48 ч инкубации (14,4%), некоторые – через 96 (8,9%) и 168 (8,4%) часов. Флаконы без видимого роста микроорганизмов выдерживали более 7 сут и получили дополнительно 200 положительных гемокультур, содержащих 239 штаммов микроорганизмов: аэробных – 214 (89,5%), анаэробных – 23 (9,6%), грибов – 2 (0,9%). Рост микроорганизмов при субкультивировании получен в аэробных (33%), анаэробных (41%), одновременно в аэробных и анаэробных (26%) условиях. Анаэробные условия повысили диагностическую эффективность ГИК на 41%. Гемокультуры характеризовались моновидовым и смешанным составом (84% и 16% соответственно) (табл. 1).

80 клинических изолятов (33,5%) относились к приоритетным патогенам ИК, включая: *S. aureus*, *E. coli*, анаэробы, грамотрицательные палочки, *Candida* spp. Аэробные микроорганизмы (214 штаммов) включали грамположительные бактерии (87,4%) с преобладанием *Staphylococcus* spp. (63,6%) и грамотрицательные бактерии (12,6%) сем. *Enterobacteriaceae* (66,7%).

Эпизоды ГИК отмечены чаще при болезнях системы кровообращения (77,8%), ЛНП (19,3%), реже при другой соматической патологии. Чаще ГИК осложняет ИЭ (47%), ревматизм (22,1%), миокардит (14,6%), в редких случаях – ИБС (8,7%) и ВПС (7,5%).

У больных ГИК сопровождалась повышенной температурой тела (61,8%) и ознобом (92,9%). Эпизоды ГИК чаще случались у мужчин, чем у женщин при ИЭ (50% и 42,5%, соответственно) и при ИБС (11,2% и 5,8%, соответственно). У женщин чаще, чем у мужчин, отмечены эпизоды ГИК при ревматизме (26,7% и 17,9%, соответственно) и при миокардите (18,3% и 11,9%, соответственно). Больные с положительной гемокультурой (325) распределены на группы согласно возрастной классификации ВОЗ [35]: 1-я группа больных – от 10 до 44 лет (молодая), которая составляла 58,7%; 2-я группа – от 45 до 60 лет (средняя) – 73%; 3-я группа – от 61 до 75 лет (пожилая) – 73,7%; 4-я группа – от 76 до 90 лет (старческая) – 4 человека. К группе риска ГИК отнесено трудоспособное население (45-75 лет) с вероятностью осложнения ГИК до 73,7% случаев. Частота эпизодов ГИК у кардиологических больных по трём возрастным группам представлена на рисунке.

ГИК чаще осложняла ИЭ и миокардит у молодых больных в возрасте до 44 лет (49% и 17%, соответственно), ревматизм – у больных среднего возраста от 45 до

³Методические рекомендации Минздрава РСФСР «Принципы бактериологического исследования крови больных инфекционным эндокардитом»; 1990.

⁴Методические рекомендации Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга «Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока»; 2010.

MICROBIOLOGY

60 лет (22,9%), ВПС и ИБС – у пожилых людей от 61 до 75 лет (8,7% и 26,1%, соответственно).

При исследовании крови 848 госпитальных пациентов кардиологического профиля ГИК выявлена в 38,3% случаев. При выполнении 1594 проб крови гемокультура получена в 27,4% случаев. Видовой спектр возбудителей ГИК представлен 519 штаммами микроорганизмов (табл. 2).

Выделенные микроорганизмы относились к 32 родам и 54 видам, включали аэробные (89,4%), анаэробные

(9,4%) бактерии и грибы (1,2%) Эпизоды грамположительной ГИК отмечены чаще, чем грамотрицательной (88,1% и 11,9% соответственно; $p<0,001$), грамположительные кокки преобладали над грамположительными палочками (64,5% и 23,6% соответственно; $p<0,001$). Различий по частоте выделения дрожжеподобных и плесневых грибов не выявлено. Среди аэробов лидировали грамположительные кокки (70,7%) с преобладанием *S. epidermidis* (32,2%). Индекс встречаемости (ИВ) подтвердил частоту грамположительной кокковой по отношению к грамотрицательным палочкам (75,2% и 10,3%, соответственно) этиологии ГИК. ИВ *E. coli* ниже ИВ *S. epidermidis* (4,1% и 38,3%, соответственно), что подтверждает ведущую роль *S. epidermidis* в этиологии ИК. ГИК протекала чаще в виде моновида, чем смешанной инфекции (83,7% и 16,3%, соответственно; $p<0,001$) (табл. 3).

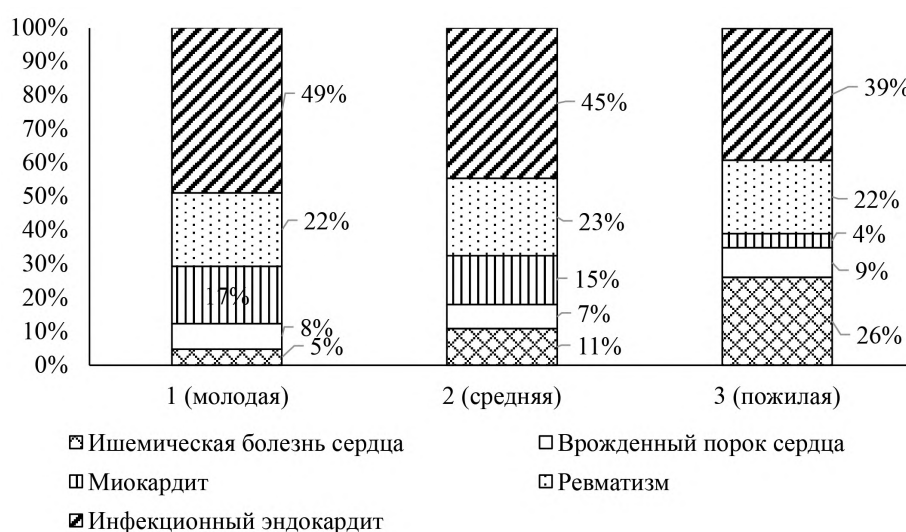
Полимикробные гемокультуры характеризовались двумя и тремя ассоциантами в одной пробе крови (85,9% и 14,1%, соответственно; $p<0,001$) и различными сочетаниями: разные виды аэробов (81,7%), аэробы и анаэробы (16,9%), бактерии и грибы (1,4%).

Клинико-лабораторные показатели крови показали себя в роли маркёров ГИК, так, среди гематологических показателей чаще отмечали: лейкоцитоз (ИЭ, ВПС), повышенное СОЭ (ИЭ, ревматизм, ВПС), лимфоцитоз (ИЭ, миокардит), снижение гемоглобина (миокардит). При ГИК большинство белковых показателей крови имели повышенные значения: фибриноген (97,4%), СРБ (100%), γ -глобулин (88,9%), α_2 -глобулин (85%) и сниженные уровни показателей: общий белок (90,5%), А/Г коэффициент (100%). При грамположительной ГИК наблюдалось повышение количества фибриногена (45,7%) и γ -глобулина (20,9%) на фоне снижения А/Г коэффициента (93,0%). При грамотрицательной ИК – повышение СРБ (30,7%) и α_2 -глобулина (18,2%) на фоне снижения количества общего белка (27,3%). При мономикробной ГИК отмечено повышение уровня α_2 -глобулина (14,8%) и снижение А/Г коэффициента (92,6%). При полимикробной – на фоне повышения СРБ (34,5%), фибриногена (48,3%), γ -глобулина (37,5%) происходило снижение количества общего белка (37,5%).

Таблица 1

Гемокультуры, полученные при инкубации свыше 7 суток

Вид микроорганизмов (n=239)	Количество штаммов	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	4,2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	18	7,5
Коагулазонегативные стафилококки	91	38,1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,4
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	0,4
<i>Streptococcus mitis</i>	32	13,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	2,1
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	4	1,7
<i>Corynebacterium</i> spp.	22	9,2
<i>Bacillus subtilis</i>	1	0,4
<i>Escherichia coli</i>	9	3,8
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	9	3,8
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4	1,7
<i>Acinetobacter</i> spp.	5	2,1
<i>Nocardia</i> spp.	1	0,4
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	0,4
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	0,8
<i>Peptococcus</i> spp.	2	0,8
<i>Actinomyces</i> spp.	2	0,8
<i>Veillonella parvula</i>	2	0,8
<i>Cutibacterium acnes</i>	13	5,4
<i>Clostridium</i> spp.	2	0,8
<i>Candida</i> spp.	2	0,8



ГИК при кардиологических заболеваниях у пациентов трёх возрастных групп.

Таблица 2

Видовой спектр возбудителей ГИК

Вид микроорганизмов	Количество штаммов (n=519)		Индекс встречаемости ИВ, % (n=436)
	Абс.	%	
Аэробные микроорганизмы, в том числе:	464	89,4	106,4
Грамположительные кокки:	328	63,2	75,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	4,0	4,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	167	32,2	38,3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	34	6,6	7,8
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15	2,9	3,4
<i>Staphylococcus sciuri</i>	6	1,2	1,4
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	0,4	0,5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	0,4	0,5
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2	0,4	0,5
<i>Staphylococcus hyicus</i>	4	0,8	0,9
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0,2	0,2
<i>Streptococcus mitis</i>	54	10,4	12,4
<i>Streptococcus mutans</i>	7	1,3	1,6
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	0,4	0,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,2	0,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	1,9	2,3
Грамположительные палочки:	60	11,6	13,8
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	14	2,7	3,2
<i>Corynebacterium bovis</i>	2	0,4	0,5
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	9	1,7	2,1
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	6	1,2	1,4
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1	0,2	0,2
<i>Corynebacterium xerosis</i>	5	1,0	1,1
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	5	1,0	1,1
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	3	0,6	0,7
Род <i>Kurthia</i>	9	1,7	2,1
Грамположительные аэробы:	1	0,2	0,2
<i>Nocardia</i> spp.	2	0,4	0,5
<i>Actinomyces viscosus</i>	1	0,2	0,2
<i>Actinomyces</i> spp.	1	0,2	0,2
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	0,2	0,2
Грамположительные споровые палочки:	20	3,9	4,6
<i>Bacillus cereus</i>	9	1,7	2,1
<i>Bacillus subtilis</i>	6	1,2	1,4
<i>Bacillus polymyxa</i>	1	0,2	0,2
<i>Bacillus megaterium</i>	2	0,4	0,5
<i>Bacillus</i> spp.	2	0,4	0,5
Грамотрицательные кокки и коккобактерии:	11	2,1	2,5
<i>Neisseria flavescens</i>	1	0,2	0,2
<i>Branhamella catarrhalis</i> ***	4	0,8	0,9
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	6	1,2	1,4
Грамотрицательные палочки:	45	8,7	10,3
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	0,2	0,2
<i>Escherichia coli</i>	18	3,5	4,1
<i>Klebsiella aerogenes</i> *	1	0,2	0,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0,4	0,5
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0,2	0,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0,4	0,5
<i>Pantoea agglomerans</i> **	5	1,0	1,1
<i>Klebsiella freundii</i>	1	0,2	0,2
<i>Citrobacter</i> spp.	1	0,2	0,2
<i>Providencia stuartii</i>	3	0,6	0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0,2	0,2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,2	0,2
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2	0,4	0,5
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0,4	0,5
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	4	0,8	0,9
Анаэробы, в том числе:	49	9,4	11,2
Грамположительные кокки:	3	0,6	0,7
<i>Peptococcus</i> spp.	3	0,6	0,7
Грамположительные палочки:	37	7,1	8,5
<i>Actinomyces israelii</i>	1	0,2	0,2
<i>Cutibacterium acnes</i> ****	36	6,9	8,3
Грамположительные споровые палочки:	4	0,8	0,9
<i>Clostridium formicaceticum</i>	3	0,6	0,7
<i>Clostridium</i> spp.	1	0,2	0,2
Грамотрицательные палочки:	2	0,4	0,5
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	0,4	0,5
Грамотрицательные кокки:	3	0,6	0,7
<i>Veillonella parvula</i>	3	0,6	0,7
Грибы, в том числе:	6	1,2	1,4
<i>Candida albicans</i>	3	0,6	0,7
<i>Aspergillus niger</i>	3	0,6	0,7

Примечание. * – *Klebsiella aerogenes* (до 2017 г. *K. mobilis*); ** – *Pantoea agglomerans* (до 1989 г. *Enterobacter agglomerans*); *** – *Branhamella catarrhalis* (до 1980 г. *Moraxella catarrhalis*); **** – *Cutibacterium acnes* (до 2016 г. *Propionibacterium acnes*).

Таблица 3

Смешанные гемокультуры, выделенные от госпитальных больных

Показатели смешанных гемокультур (n=71)	Число ассоциантов		p
	2	3	
Количество	61	10	
%	85,9	14,1	<0,001
95% ДИ	76,0-92,2	7,8-24,0	
	Характеристики ассоциантов (n=71)		
	аэроб+аэроб	аэроб+анаэроб	бактерия+гриб
Количество	58	12	1
%	81,7	16,9	1,4
95% ДИ	71,2-89,0	9,9-27,3	0,2-7,6

Обсуждение. С целью повышения эффективности диагностики ГИК у госпитальных терапевтических больных использованы приёмы микробиологической культуры: оптимальный объём инокулируемой крови (10 мл), соотношение объёма крови к объёму питательной среды как 1:20, сердечно-мозговые среды (СМС и СМА), создание анаэробных условий на всем протяжении цикла гемокультивирования, удлинение сроков инкубации первичного посева крови, что позволило диагностировать ГИК у 38,3% терапевтических пациентов кардиологического профиля и выделить 519 штаммов микроорганизмов, включая аэробные (89,4%) и анаэробные (9,4%) бактерии и грибы (1,2%).

До 2007 г. к приоритетным патогенам ГИК относились *E. coli* (25-33%), коагулазонегативные стафилококки (КНС) (31%), *Streptococcus pneumoniae* (8,9-22%), *Staphylococcus aureus* (14,2-25,1%) [31]. С 2016 г. стали лидировать: КНС (32%), *E. coli* (20,5-27%), *S. aureus* (16,9-21,3%), грибы (8%). Увеличилась частота обнаружения КНС, энтерококков. Этиология современной ГИК характеризуется грамположительными (47-58%), грамотрицательными бактериями (35,8-39%), анаэробами (5%), грибами (2-6,2%), полимикробными ассоциациями (7-25,8%). Ведущими возбудителями ГИК являются: КНС (17,8%), *S. aureus* (15,1%), *Enterococcus spp.* (12%), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* (по 14,5%), *Burkholderia cepacia*, грибы рода *Candida* (по 4,6%), анаэробы (1,3%), полимикробные ассоциации в 22% случаев [32].

Из числа аэробных микроорганизмов преобладали грамположительные кокки (63,2%), среди которых лидировал *S. epidermidis* (32,2%). Этиология ГИК характеризовалась полимикробностью в 16,3% случаев с двумя или тремя ассоциантами. Частота осложнений ГИК кардиологических заболеваний составляла: ревматизм (42,4%), миокардит (40,7%), ИЭ (38,9%), ВПС (34,5%), ИБС (32,4%), ЛНП (36%). Гематологическими маркерами ГИК при терапевтических заболеваниях являются: лейкоциты, лимфоциты, гемоглобин, СОЭ. Повышенные значения фибриногена и γ -глобулина являются маркерами грамположительной полимикробной ИК. Появление СРБ и снижение количества общего белка характерно для грамотрицательной полимикробной ИК. Маркером грамположительной моновицовой ИК является снижение показателей А/Г коэффициента, для грамотрицательной моновицовой ИК характерно повышение уровней α_2 -глобулина.

Заключение. Частота взятия пробы крови не влияет на повышение эффективности получения гемокультуры. Использование одной пробы крови при соблюдении оптимальных условий микробиологической культуры достаточно для получения гемокультуры, применение двух парных флаконов с интервалом в 30 мин обеспечивает выделение гемокультуры в 64,9% случаях.

Выделение факультативно-анаэробных микроорганизмов при продолжительном времени инкубации крови является доказательством перехода микроорганизмов на анаэробный тип дыхания при циркуляции в кровотоке в течение длительного периода времени, что подтверждается дополнительно выделенными 200 гемокультурами и 239 штаммами клинически значимых микроорганизмов из анаэробных флаконов, инкубированных более 7 дней.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-5, 11-21, 24-33 см. REFERENCES)

1. Полибин Р.В., Миндлина А.Я., Герасимов А.А., Брико Н.И. Сравнительный анализ смертности от инфекционных болезней в Российской Федерации и некоторых странах Европы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 94(3): 4-10.
6. Дворецкий, Л.И., Яковлев С.В. Инфекционная патология в клинике внутренних болезней. *Терапевтический архив*. 2018; 11: 112-9.
7. Честнова Т.В., Серегина Н.В., Дешко И.В. Сравнительный анализ микробного пейзажа возбудителей, выделенных из крови лихорадящих больных. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012; 19(2): 63-5.
8. Татульян А.А., Кондратьева Е.И., Клещенко Е.И., Трёмбач А.В. Анализ выявленных бактериемий у пациентов с онкогематологической патологией в многопрофильном детском стационаре Краснодар. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016; 45(3): 68-73.
9. Чеботкевич В.Н., Бессмельцев С.С., Киселева Е.Е., Стижак Н.П., Кайтанджан Е.И., Бурылев В.В. Клинико-микробиологическая характеристика инфекции кровотока у онкогематологических больных. *Онкогематология*. 2016; 11(3): 58-67.
10. Дмитриева, Н.В., Агинова В.В., Петухова И.Н., Григорьевская З.В., Дмитриева А.И., Багирова Н.С. и др. Нозокомиальные инфекции, вызванные бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, в онкологической клинике. *Сибирский онкологический журнал*. 2019; 18(1): 36-42.
22. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н. и др. 3-е издание, исправленное. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
23. Миронов А.Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А. Микрофлора гнойно-септических заболеваний у больных в Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 5: 11-5.
34. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Миронов А.Ю., Борисова О.Ю. Сердечно-мозговые среды для гемокультур. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(6): 375-81. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-6-375-381.
35. Асфандиярова Н.С., Дашкевич О.В., Заикина Е.В., Сучкова Е.И., Хотеевкова Н.В., Якубенко А.Н. и др. Гендерная и возрастная структура множественных хронических заболеваний пациентов Рязанской области. *Клиницист*. 2017; 11(3-4): 65-72.

REFERENCES

1. Polibin R.V., Mindlina A.Ya., Gerasimov A.A., Briko N.I. Comparative analysis of mortality from infectious diseases in the Russian Federation and some European countries. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2017; 94(3): 4-10. (in Russian)
2. Mc Namara J.K., Righi E., Wright H., Hartel G.F., Harris P.N.A., Paterson D.L. Long-term morbidity and mortality following bloodstream infection: A systematic literature review. *J. Infection*. 2018; 77(1): 1-8.
3. Robineau O., Robert J., Rabaud C., Bedos J-P., Varon E., Pean Y. et al. Management and outcome of bloodstream infections: a prospective survey in 121 french hospitals (SPA-BACT survey). *Infection Drug Resistance*. 2018; 11: 1359-68.
4. Dalgaard L.S., Norgaard M., Jespersen B., Jensen-Fangel S., Ostergaard L.J., Schonheyder H.C. et al. Risk and prognosis of bloodstream infections among patients on chronic hemodialysis: a population-based cohort study. *Plos One*. 2015; 10(4): 1-14.
5. Fracchiolla N.S., Fracchiolla N.S., Sciume M., Orofino N., Guidotti F., A. Grancini A. et al. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections in hematological malignancies: Results from a single-centre study. *PLoS One*. 2019; 14(5): e0216715.
6. Dvoretzkiy L.I., Yakovlev S.V. Infectious pathology in the clinic of internal diseases. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2018; 11: 112-9. (in Russian)

7. Chestnova T.V., Seregina N.V., Deshko I.V. Comparative analysis of the microbial landscape of pathogens isolated from the blood of febrile patients. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2012; 19(2): 63-5. (in Russian)
8. Tatul'yan A.A., Kondratyeva E.I., Kleshchenko E.I., Trembach A.V. Analysis of detected bacteremia in patients with oncohematological pathology in a multidisciplinary children's hospital in Krasnodar. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2016; 45(3): 68-73. (in Russian)
9. Chebotkevich V.N., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.E., Stizhak N.P., Kaytandzhan E.I., Burylev V.V. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infection in oncohematological patients. *Onkogematologiya*. 2016; 11(3): 58-67. (in Russian)
10. Dmitrieva N.V., Aginova V.V., Petuhova I.N., Grigorevskaja Z.V., Dmitrieva A.I., Bagirova N.S. et al. Nosocomial infections caused by bacteria of the Enterobacteriaceae family in an oncology clinic. *Sibirskiy onkologitseskii zhurnal*. 2019; 18(1): 36-42. (in Russian)
11. Dhotre S., Jahagirdar V., Suryawanshi N., Davane M., Patil R., Nagoba B. Assessment of periodontitis and its role in viridians streptococcal bacteremia and infective endocarditis *Indian Heart. J.* 2018; 70(2): 225-32.
12. Kwon H.J., Jahagirdar V., Suryawanshi N., Davane M., Patil R., Nagoba B. Megalocytic interstitial nephritis following acute pyelonephritis with *Escherichia coli* bacteremia: a case report. *J. Korean Med. Sci.* 2015; 30: 110-4.
13. Maraj B., Huang A., Patel S. Acute colitis in a patient with *Streptococcus pyogenes* bacteremia. *Am. J. Medicine*. 2018; 131(1): 13-4.
14. Adelman M.W., Bhamidipati D.R., Hernandez-Romieu A.C., Babiker A., Woodworth M.H., Robichaux C. et al. Secondary bacterial pneumonias and bloodstream infections in patients hospitalized with COVID-19. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2021; DOI: 10.1513/AnnalsATS.202009-1093RL.
15. Bonazzetti C., Morena V., Giacomelli A., Oreni L., Casalini G., Galimberti L.R. et al. Unexpectedly high frequency of Enterococcal bloodstream infections in coronavirus disease 2019 patients admitted to an Italian ICU: An observational study. *Critical Care Medicine*. 2021; 49(1): e31-e40.
16. Buetti N., Ruckly S., de Montmollin E., Reignier J., Terzi N., Cohen Y. et al. COVID-19 increased the risk of ICU-acquired bloodstream infections: a case-cohort study from the multicentric IUTCO-MEREA network. *Intensive Care Med.* 2021; 47(1): 180-7.
17. Giacobbe D.R., Battaglini D., Ball L., Brunetti L., Bruzzese B., Codda G. et al. Bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19. *Eur. J. Clin. Invest.* 2020; 50(10): e13319.
18. Sogaard K.K., Baetting V., Osthoff M., Marsch S., Leuzinger K., Schweitzer M. et al. Community-acquired and hospital-acquired respiratory tract infection and bloodstream infection in patients hospitalized with COVID-19 pneumonia. *J. Intensive Care*. 2021; 9(1): 1-10.
19. Bhatt P.J., Shiao S., Brunetti L., Xie Y., Solanki K., Khalid S. et al. Risk factors and outcomes of hospitalized patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) and secondary bloodstream infections: a multicenter case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 2020; XX(XX): 1-9.
20. Catalya S., Shariat C., Cloud M.C. COVID-19 with *Sporotrichosis* (aka *Sporothrix schenckii*) and *Fusobacterium* bloodstream infections (BSI). *J. Infect. Dis. Epidemiol.* 2021; 7(5): 210-2.
21. Wolff L., Martiny D., Deyi V.Y.M., Maillart E., Clevenbergh P., Dauby N. COVID-19-Associated *Fusobacterium nucleatum* bacteremia, Belgium. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(3): 975-7.
22. Medical Microbiology, Virology and Immunology: A Textbook for Medical Students Vorob'ev A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N. et al. 3rd ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian)
23. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'ev A.A. Microflora of purulent-septic diseases in patients in the Moscow region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 5: 11-5. (in Russian)
24. Dailey P.J., Osborn J., Ashley E.A., Baron E.J., Dance D.A.B., Fusco D. et al. Defining system requirements for simplified blood culture to enable widespread use in resource-limited settings. *Diagnostics*. 2019; 9(10): 1-12.
25. Ombelet S., Barbe B., Affolabi D., Ronat J-B., Lompo P., Lunguya O. et al. Best practices of blood cultures in low-and middle-income countries. *Front Med.* 2019; 6: 1-27.
26. Elantamilan D., Lyngdoh W.V., Banik A., Khyriem A.B., Bhattacharyya P., Rajbongshi J. et al. Comparative evaluation of conventional (manual) blood culture system and BacT/ALERT 3D (automated) blood culture system in a tertiary care hospital. *Sch. J. App. Med. Sci.* 2017; 5(2D): 544-9.
27. Li G., Sun J., Pan S., Li W., Zhang S., Wang Y. et al. Comparison of the performance of three blood culture systems in a Chinese tertiary-care hospital. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2019; 9: 285-94.
28. Towns M.L., Jarvis W.R., Hsueh P.R. Guidelines on blood cultures. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2010; 43(4): 347-9.
29. Opota O., Croxatto A., Prodrom G., Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21: 313-22.
30. Lamy B., Dargere S., Arendrup M.C., Parienti J-J., Tattevin P. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1-13.
31. Sogaard M., Engebjerg M.C., Lundbye-Christensen S., Schonheyder H.C. Changes in blood culture methodology have an impact on time trends of bacteraemia: a 26-year regional study *Epidemiol. Infect.* 2011; 139: 772-6.
32. Bouza E., Perez-Molina J., Munoz P. Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 studies. Blood stream infections in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 1999; 5: 2S1-2S12.
33. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Procop G.W., Church D.L., Hall G.S., Janda W.M., Koneman E.W., Schreckenberger P.C. et al. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. ISBN 9781451116595.
34. Kargaltseva N.M., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu. Brain-heart media for blood cultures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(6): 375-81. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-6-375-381. (in Russian)
35. Asfandiyarova N.S., Dashkevich O.V., Zaikina E.V., Suchkova E.I., Hoteenkova N.V., Yakubenko A.N. et al. Gender and age structure of multiple chronic diseases in patients in the Ryazan region. *Klinitsist.* 2017; 11(3-4): 65-72. (in Russian)

Алексеева Е.А.¹, Миронов А.Ю.^{2,4}, Полосенко О.В.³, Шепелин А.П.³, Храмов М.В.³

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИСТЕРИЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Вологодской области», 160001, г. Вологда, Россия;

²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

³ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Оболensk, Россия;

⁴ФГБУ Академия постдипломного образования ФНКС ФМБА России, 115682, Москва, Россия

*Представлены результаты исследований по выделению, идентификации, изучению биологических свойств клинических изолятов *L. monocytogenes* и тест-штаммов *Listeria spp.* Изучены особенности применения современных методов исследования при индикации и идентификации патогенных листерий с целью повышения качества лабораторных исследований клинического материала. Культуральный метод гарантирует достоверные результаты микробиологических анализов при выявлении *Listeria spp.* Описанный перечень и алгоритм методов лабораторной диагностики может быть использован в качестве основы для разработки нормативных документов для проведения микробиологического исследования биологического материала на наличие бактерий рода *Listeria spp.* и вида *L. monocytogenes* в биологическом материале.*

Ключевые слова: клиническая лабораторная диагностика; идентификация; *Listeria spp.*; культуральный метод.

Для цитирования Алексеева Е.А., Миронов А.Ю., Полосенко О.В., Шепелин А.П., Храмов М.В. Выделение и идентификация листерий из клинического материала. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 362-368.

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-362-368>

Для корреспонденции: Полосенко Ольга Вадимовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. сектора микробиологических исследований; e-mail polosenko.olga@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.04.2022

Принята к печати 25.04.2022

Опубликовано 20.06.2022

Alekseeva E.A.¹, Mironov A.Yu.^{2,4}, Polosenko O.V.³, Shepelin A.P.³, Khramov M.V.³

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LISTERIA IN CLINICAL MATERIAL

¹ FBUS «Center of Hygiene and Epidemiology in the Vologda region», 160001, Vologda, Russia;

² FBIS «Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky», Rosпотребнадзор, 125212, Moscow, Russia;

³ FBIS «State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» Rosпотребнадзор, 142279, Obolensk, Russia;

⁴ FSBI «Academy of Postgraduate Education within FNKC FMBA of Russia», 115682, Moscow, Russia

*Results from research on isolation, identification, and study of biological properties of *L. monocytogenes* clinical isolates and *Listeria spp* test strains are presented. Peculiarities of modern research methods for indicating and identifying pathogenic listeria to improve the quality of laboratory studies of clinical material are studied. The culture method provides reliable results of microbiological analyses upon detecting *Listeria spp*. The presented list and algorithm of the laboratory diagnostic methods can be used as a basis for elaborating regulatory documents for carrying out microbiological research on any biological material for the presence of bacteria of the genus *Listeria spp.* and *L. monocytogenes* species in it.*

Key words: clinical laboratory diagnostics, identification, *Listeria spp.*, culture method

For citation: Alekseeva E.A., Mironov A.Yu., Polosenko O.V., Shepelin A.P., Khramov M.V. Isolation and identification of listeria in clinical material. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 362-368 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-362-368>

For correspondence: Polosenko Olga Vadimovna, PhD (Biol), leading researcher, microbiology research unit; e-mail polosenko.olga@yandex.ru

Information on authors:

Alekseeva E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7199-2180>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

Polosenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-5961-9041>;

Shepelin A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>;

Khramov M.V., <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>.

Acknowledgment. The research was carried out within the sectoral program of Rosпотребнадзор.

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

Received 04.04.2022

Accepted 25.04.2022

Published 20.06.2022

Введение. Листериоз – сапрозоонозное инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое бактериями рода *Listeria*, характеризуется разнообразием источников и резервуаров возбудителя инфекции, множеством механизмов, путей и факторов передачи возбудителя, полиморфизмом клинических проявлений, высокой летальностью у новорожденных и лиц с иммунодефицитами. Чаще всего выявляют клинические формы, связанные с поражением центральной нервной системы, проявляющиеся менингитом или менингоэнцефалитом. Описаны случаи с необычными клиническими проявлениями на фоне сопутствующих заболеваний, иммунодепрессивной терапии, у лиц пожилого возраста: эндокардит, перитонит, остеомиелит, абсцессы и др. В группе риска по листериозам находятся беременные женщины, новорожденные дети, лица пожилого возраста, иммунокомпрометированные лица [1]. Растёт число сопутствующих заболеваний и групп риска, на фоне которых проявляется листериозная инфекция, общей для которых является депрессия клеточного иммунитета, что подтверждает полиэтиологическую роль листерий как микроба-оппортуниста [2].

Значение листериоза в патологии человека, животных не только не уменьшилось, а даже возросло. Особая опасность листериоза возникла в конце XX века, в связи с установленной контаминацией пищевых продуктов листериями. В связи с этим, листериоз получил наименование «пищевой инфекции» и клиницисты и эпидемиологи нашей страны с 1992 г. стали признавать его как инфекцию, склонную к эпидемическому распространению [3]. Отмечается увеличение количества случаев листериоза с тяжёлым течением в Москве за последние годы [4].

Многочисленные вспышки листериоза в ряде стран мира и его широкое распространение в окружающей среде требуют разработки новых подходов к типированию листерий с целью выявления клинически значимых штаммов [1, 5-9].

Длительное время при подборе селективных питательных сред для выделения листерий возникали трудности и разброс результатов при выделении и типировании *L. monocytogenes* [3]. В одном из первых исследований проб от овец и кроликов и чистых культур обнаружено, что задержка роста листерий происходит на питательных средах, содержащих 0,05-0,1% теллурида калия [10]. Сообщалось об использовании гуанофурацина, как селективного агента для выделения *L. monocytogenes* из проб назальных выделений и фекалий овец [11]. Описано использование обогащённого бульона, содержащего фурацин, с последующим высевом на селективную, содержащую кровь питательную среду, состоящую из фенилэтанол-агаровой основы с 0,05% хлористого лития и 1% глицина в качестве селективных агентов, с целью повысить селективность и снизить задержку роста *L. monocytogenes* [12].

Описан селективный рост *L. monocytogenes*, стрептококков и *Erysipelothrix* на питательной среде, содержащей 40 мкг/мл налидиксовой кислоты [3].

Использовались и другие ингибиторы роста: хлористый литий, ацетат таллия и трёхокись хрома и бихромат калия. Для ингибирования роста *Enterococcus faecalis* предложен селективный бульон, содержащий 40 мкг/мл налидиксовой кислоты, 3 мкг/мл полимиксина В, 0,02 мкг/мл метиленового голубого [13]. Эта питательная среда эффективна для выделения *L. monocytogenes*

из проб фекалий, взятых от матерей заражённых плодов или заражённых детей. Акридин или акрифлавин и другие красители (включая индигокармин, метиленовый голубой, пиронин, тионин) часто вводятся в селективные питательные среды для *L. monocytogenes*.

Более поздние составы питательных сред (используемые и в настоящее время), представляют комбинации налидиксовой кислоты, полимиксина В, акрифлавина в качестве ингибирующих рост агентов [3].

В настоящее время при исследованиях на листериоз, в случаях, высокой контаминации материала сопутствующей микрофлорой и низкого содержания листерий, удаётся, тем не менее, выделить и идентифицировать *Listeria* spp. Широкое применение для выделения листерий находят питательные среды, в состав которых в качестве индикаторной добавки входит эскулин в сочетании с цитратом железистого аммония. Цвет питательной среды в результате реакции продуктов гидролиза эскулина с цитратом железистого аммония меняется, что приводит к почернению бульона (бульон Фрейзера) и росту колоний с почернением среды (ПАЛ, ПАЛКАМ) [7-8, 14].

Листерии ферментируют глюкозу, оксидазоотрицательны, образуют цитохромы. Некислотоустойчивы, не образуют спор и капсул, факультативные анаэробы, хемоорганогетеротрофы. Каталазаположительны, редко встречаются каталазоотрицательные штаммы [3, 18].

Продукция кислоты при ферментации галактозы, лактозы, мелезитозы, сорбитола, крахмала, сахарозы, трегалозы вариабельна. Кислота почти никогда не вырабатывается при ферментации адонитола, арабинозы, дульцита, эритритола, гликогена, инозитола, инулина, мелибиозы, раффинозы, сорбозы. Фенилаламиндиамин-аза-, орнитин-, лизин- и аргинин-декарбоксилазы не образуются. Сероводород и индол не образуют, мочевины не гидролизуют, слабо восстанавливают нитраты до нитритов [3, 18].

Все виды *Listeria* фенотипически сходны, дифференцируются с применением тестов: на гемолиз, выработку кислоты из D-ксилозы, L-рамнозы, α-метил-β-маннозида, маннитола [18]. Фенотипическое сходство согласуются с высокой геномной гомологией между различными видами. Ключевой характеристикой при определении вида и наиболее сложной в плане обнаружения, является гемолиз. Высокий процент ошибок при идентификации *L. seeligeri* и *L. ivanovii* обусловлен неточным прочтением результатов CAMP-теста и гемолиза [3]. Изоляты *L. monocytogenes* и *L. seeligeri* образуют узкие, слегка прозрачные зоны β-гемолиза. *L. ivanovii* образуют широкие, чётко очерченные зоны β-гемолиза. *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* не являются гемолитическими. *L. innocua* на ряде питательных сред способны образовывать зону гемолиза с зеленоватым оттенком. *L. monocytogenes* лизируют эритроциты овец, лошадей, крупного рогатого скота, морских свинок, кролика, поросят, человека.

Для постановки окончательного диагноза листериозной инфекции необходимо выделить чистую культуру *L. monocytogenes* и её идентифицировать. Молекулярно-биологические методы исследования для выявления ДНК-патогена (ПЦР) могут быть использованы в качестве дополнительного метода при исследовании клинического материала. Серологические методы – реакция связывания комплемента (РСК), реакция непрямой гемагглютинации с эритроцитарным диагностикумом (РНГА),

Культуральное исследование клинического материала

№ п/п	Клинический материал	Алгоритм исследования	Выделенная культура
1.	Мазок с папулы кожи	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ-агар, кровяной агар	<i>L. monocytogenes</i>
2.	Околоплодные воды	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
3.	Плацента	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
4.	Мазок из цервикального канала	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
5.	Кровь на стерильность Секционный материал:	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
6.	Мозг	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
7.	Печень	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
8.	Селезёнка	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
9.	Кровь	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>
10.	Почки	Бульон Фрейзера I и II, высев на хромогенный агар ALOA, ПАЛ агар, ПАЛКАМ	<i>L. monocytogenes</i>

метод определения антилистериозных антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) позволяют установить предполагаемый диагноз листериозной инфекции, требующий бактериологического подтверждения¹.

Для микробиологов, занимающихся лабораторной диагностикой листериоза, важно иметь в своем арсенале методы, позволяющие быстро и эффективно проводить мониторинг листериоза, выявляя патогенные для человека листерии. Новые методы позволяют проводить исследования в более широком масштабе, что вырисовывает картину реального распространения листерий в различных продуктах и их связь с болезнью [15-16]. Культуральный метод остается незаменимым при диагностике листериозной инфекции [9, 14, 18]. Культуральное исследование позволяет определить чувствительность к антибиотикам, что позволяет лечащему врачу выбрать эффективные препараты для лечения пациента.

Наличие *L. monocytogenes* в пищевых продуктах регламентируется документами Евразийского экономического союза^{2,3}. Для её выявления на территории РФ имеются утверждённые методы определения в пищевых продуктах (ГОСТ, МУК)^{4,5}. Для определения *Listeria* spp. и *L. monocytogenes* в биологическом материале регламентированный метод отсутствует. Бактерии рода *Listeria* и вида *L. monocytogenes* обнаруживаются и выделяются попутно при диагностических исследованиях клинического материала на наличие микроорганизмов других групп.

Цель работы – оптимизировать культуральный метод диагностики листериоза с целью повышения качества лабораторных исследований клинического материала.

Материал и методы. Использованы 10 культур листерий, выделенных из клинического материала от пациентов: околоплодные воды, мазок с папулы кожи, плацента, кровь, секционный материал Городской больницы № 1 и Областной клинической детской больницы г. Вологда, выделенных в период с 2018 по 2020 гг.; музейные штаммы из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ, Оболенск) – 5 тест-штаммов: *L. monocytogenes* 766, *L. monocytogenes* NCTC11994, *L. ivanovii* ATCC19119, *L. innocua* NCTC 11288, *L. seeligeri* ATCC 35967. Для определения САМР-теста использованы тест-штаммы: *Rhodococcus equi* 1621 и *Staphylococcus aureus* Wood-46. Для накопления листерий использован селективный накопительный бульон «ПБЛ» и «Бульон Фрейзера, основа» (ФБУН ГНЦ ПМБ). В качестве дифференциально-диагностических применены среды «*Listeria* agar (base) асс. OTTAVIANI and AGOSTI» (ALOA-агар) (Merck), «ПАЛ» и «ПАЛКАМ агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Для определения ферментативных свойств листерий использованы среды Гисса с рамнозой, ксилитом, маннитом с бромкрезоловым пурпурным (ФБУН ГНЦ ПМБ), тест-система «API *Listeria* идентификация рода *Listeria*» (БиоМерье, Франция). Серотип определяли в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле с помощью теста «Латексный тест *Listeria monocytogenes*» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Определение гемолитической активности проводилось на чашках Петри с 7%-м кровяным агаром. Для САМР-теста применён кровяной агар на основе питательной среды № 1 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ) и крови барана 7%.

Для определения лецитиназной активности использована питательная среда № 1 ГРМ с внесением *ex tempore* 5% желточной эмульсии и питательная среда № 1 ГРМ с внесением активированного угля в концентрациях 0,3-0,6% с внесением *ex tempore* 5% желточной эмульсии.

Исследования проведены с использованием методов, рекомендованных СП 3.1.7.2817-10⁶, МУК 4.2.1122-02, ГОСТ 32031-2012.

Данные исследований обработаны с помощью прикладной программы «STATISTICA» (StatSoftRussia) и BIostat.

¹СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Зарегистрировано в Минюсте РФ 15.02. 2021 г.

²Технический регламент Таможенного союза. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011. Введены 2013-07-01. М.: РосТест; 2013.

³Технический регламент Таможенного союза о безопасности молока и молочной продукции ТР ТС 033/2013. Введены 2014-05-01. Москва; 2013.

⁴ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. – Москва: Стандартинформ; 2014.

⁵МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах».

⁶Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2817-10. Профилактика листериоза у людей (в настоящее время утратили силу).

Результаты и обсуждение. Для выделения листерий биоматериал предварительно обогащали посевом в жидкую селективную питательную среду с последующим пересевом выросших микроорганизмов на плотные дифференциально-диагностические среды, выделением и идентификацией чистых культур. У исследуемых культур листерий изучены культуральные свойства, показавшие принадлежность 10 культур к виду *L. monocytogenes* (табл. 1).

На этапе селективного обогащения все культуры засевали в 10 мл среды для накопления листерий: ПБЛ I и Бульон Фрейзера I. Посевы инкубировали в термостате при температуре 30° С в течение 24 часов. При необходимости инкубацию посевов биоматериала продлевали до 48-72 часов. При росте микроорганизмов рода *Listeria* в бульоне Фрейзера, наблюдалось слабое помутнение среды. Рост листерий в среде ПБЛ I регистрировался в виде слабого помутнения среды, при встряхивании которой наблюдались муаровые волны.

Через 24 ч после предварительного обогащения пересевали 0,1 мл материала в 9 мл среды для вторичного накопления – питательный бульон для выделения и культивирования листерий (ПБЛ II) с последующей инкубацией в термостате при температуре 37° С в течение 24 часов. Штаммы бактерий рода *Listeria* при селективном обогащении вызывали помутнение питательной среды с образованием слизистого осадка. Бульон Фрейзера II на 2-е сутки инкубации обеспечивал рост в виде помутнения и окрашивания питательной среды в тёмно-коричневый цвет.

Через 24-48 ч инкубации из пробирок с посевами с верхнего слоя питательных бульонов материал пересевали на плотные селективные питательные среды для выделения листерий: ALOA агар, ПАЛ агар, ПАЛКАМ-агар, кровяной агар.

На среде ПАЛ через 24 ч инкубации листерии формировали мелкие, серовато-зелёные или жёлто-зелёные колонии с чёрным ореолом, диаметром 0,5-1,0 мм, иногда с чёрным центром. Через 48 ч колонии имели диаметр 1,0-2,0 мм зелёной окраски с углублёнными центрами, окружёнными чёрным ореолом. На ПАЛКАМ агаре через 24 ч инкубации вырастали колонии серо-зелёного цвета, с образованием вокруг колоний чёрной зоны, на вторые сутки колонии имели диаметр 1,4-1,8 мм.

На ALOA-агаре вырастали колонии сине-зелёного цвета, окружённые непрозрачным ореолом – типичные колонии *Listeria monocytogenes* – диаметром 0,6-0,8 мм на первые сутки инкубации посевов и диаметром до 2,0мм – на вторые сутки.

На кровяном агаре через 18 ч инкубации вокруг колоний наблюдалась узкая зона гемолиза.

CAMP-тест проводили с использованием культур гемолитических штаммов *S. aureus* и *R. equi*, тест-штамма *L. ivanovii* и всех испытуемых клинических изолятов *L. monocytogenes*. При посеве на кровяной агар с 5% эритроцитами барана получены результаты без существенных различий. После инкубации посевов в течение 24 ч при 37° С отмечены зоны гемолиза перпендикулярных посевов испытуемых культур около параллельных линий посевов штрихом *S. aureus* и *R. equi*. Все тестируемые культуры *L. monocytogenes* показали расширение зоны гемолиза около роста *S. aureus* (положительный CAMP-тест) и отсутствие изменений зоны гемолиза рядом с ростом *R. equi* (отрицательный CAMP-тест). Характерное усиление и увеличение зоны гемолиза около роста *R. equi* и *S. aureus* наблюдалось у культуры *L. ivanovii*.

Морфологические и тинкториальные свойства всех выросших на импортных и отечественных питательных средах культур листерий идентичны. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдались грамположительные, короткие палочки с закруглёнными концами, располагающиеся поодиночке или в виде коротких цепочек; спор и капсул не образующие.

Клинические изоляты и музейные штаммы листерий исследованы по биохимическим и антигенным свойствам в условиях равнозначности с использованием различных тестов.

Для установления принадлежности выделенной культуры к патогенному виду определялась лецитиназная активность исследуемых клинических изолятов листерий. Для этого исследуемые культуры листерий высевали короткими параллельными штрихами на питательную среду ГРМ № 1 с добавлением активированного угля в концентрациях 0,3; 0,4; 0,5, 0,6% и внесением *ex tempore* 5% желточной эмульсии. Эти же культуры сеяли на питательную среду ГРМ № 1 с добавлением *ex tempore* 5% желточной эмульсии, но без добавления активированного угля. Лецитиназную активность предварительно определяли через 18 ч инкубации посевов, окончательно – через 48 ч по появлению зон помутнения вокруг штрихов.

Показано, что для удаления секретируемого листериями продукта, выполняющего функции ауторепрессора, можно применить гидрофобный сорбент, в частности, активированный уголь [17]. При этом происходит экспрессия генов патогенности и, соответственно, увеличение уровня ферментов агрессии в питательной среде, в том числе лецитиназы. Использование питательной среды № 1 ГРМ с добавлением 5% желточной эмульсии и активированного угля показало, что оптимальными являются концентрации активированного угля 0,4% и 0,5% при росте тест-штаммов *L. monocytogenes* 766, *L. monocytogenes* NCTC 11994 и клинических изолятов *L. monocytogenes*, демонстрирующие ярко выраженную зону лецитиназной активности питательной среды уже через 18-20 ч инкубации посевов при визуальном просмотре и позволяющие дифференцировать *L. monocytogenes* от непатогенных видов листерий. Концентрация активированного угля 0,6% не позволяет чётко видеть зону лецитиназной активности ввиду интенсивного почернения питательной среды.

При определении биохимических свойств клинических изолятов *L. monocytogenes* при использовании тест-системы «API *Listeria* идентификация рода *Listeria*» показано, что клинические штаммы не образуют индол и сероводород, не восстанавливают нитраты в нитриты, желатин не разжижают, ферментируют с образованием кислоты глюкозу, левулёзу, трегалозу, медленно и непостоянно – мальтозу, лактозу, сахарозу, декстрин, салицин, рамнозу, растворимый крахмал.

Для определения способности сбраживать углеводы все клинические и музейные штаммы пересевали на среде Гисса с бромкрезоловым пурпурным. Посевы инкубировали в термостате 48 ч при 37° С, наличие ферментативной активности в отношении углеводов определяли по изменению окраски среды за счёт образования кислоты.

Использование сред Гисса позволило установить, что ферментация ксилоты наблюдалась при посеве тест-штаммов: *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. seeligeri* ATCC 35967, ферментация рамнозы – у всех клинических изолятов патогенных листерий и тест-штаммов *L. monocytogenes* 766, *L. monocytogenes* NCTC 11994, *L. innocua* NCTC 11288 (слабая) (табл. 2).

Свойства клинических изолятов и тест-штаммов листерий

№ п/п	Питательные среды	Наблюдаемый эффект					
		Посев клинических образцов, типизация изолятов	Посев тест-штаммов				
			<i>L. monocytogenes</i> 766	<i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994	<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	<i>L. seeligeri</i> ATCC 35967	<i>L. innocua</i> NCTC 11288
1.	ПБЛ I	Рост виде слабого помутнения среды, при встряхивании наблюдаются муаровые волны	Рост в виде слабого помутнения среды, при встряхивании наблюдаются муаровые волны				
2.	Булльон Фрейзера I	Рост виде помутнения и окрашивания среды в тёмно-коричневый цвет	Рост в виде помутнения и окрашивания среды в тёмно-коричневый цвет (гидролиз эскулина)				
3.	Среда ПАЛ I	Рост мелких, серовато-жёлтых колоний с чёрным ореолом	Рост мелких, серовато-жёлтых колоний с чёрным ореолом (гидролиз эскулина)				
4.	Среда ПАЛ-КАМ агар	Рост колоний серо-зелёного цвета, с образованием вокруг колоний чёрной зоны (Гидролиз эскулина)	Рост колоний серо-зелёного цвета, с образованием вокруг колоний чёрной зоны (гидролиз эскулина)				
5.	ALOA агар	Рост сине-зелёных колоний, окружённых непрозрачным ореолом	Рост сине-зелёных колоний, окруженных непрозрачным ореолом (фосфолипазная активность)			Рост сине-зелёных колоний	
6.	Кровяной агар	Рост колоний с образованием узкой зоны просветления	Рост колоний с образованием узкой зоны просветления (β-гемолитическая активность)				Рост колоний без образования зоны просветления
7.	Кровяной агар для CAMP-теста	Усиление гемолиза около штриха <i>S. aureus</i>	Усиление гемолиза около штриха <i>S. aureus</i>		Усиление гемолиза около штриха <i>R. equi</i>	Усиление гемолиза около штриха <i>S. aureus</i>	Без гемолиза
8.	Среда № 1 ГРМ с активированным углём 0,4% и желточной эмульсией	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)		Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Без зоны помутнения вокруг колоний	Без зоны помутнения вокруг колоний
	Среда № 1 ГРМ с активированным углём 0,5% и желточной эмульсией	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)		Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний (лецитиназная активность)	Без зоны помутнения вокруг колоний	Без зоны помутнения вокруг колоний
	Среда № 1 ГРМ с активированным углём 0,6% и желточной эмульсией	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Зона помутнения вокруг колоний не визуализируется	Без зоны помутнения вокруг колоний	Без зоны помутнения вокруг колоний
9.	Питательная среда № 1 ГРМ с добавлением желточной эмульсии (без угля)	Отсутствие зоны помутнения	Отсутствие зоны помутнения	Отсутствие зоны помутнения	Наличие плотной зоны помутнения вокруг колоний	Отсутствие зоны помутнения	Отсутствие зоны помутнения
10.	Среда Гисса с бромкрезоловым пурпурным (с ксилозой)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует ксилозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует ксилозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует ксилозу)
11.	Среда Гисса с бромкрезоловым пурпурным (с рамнозой)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует рамнозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует рамнозу)	Изменение цвета среды в жёлтый (ферментирует рамнозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует рамнозу)	Без изменения цвета среды (не ферментирует рамнозу)	Слабое изменения цвета среды (ферментирует рамнозу слабо)

Все выросшие изолированные колонии культур *Listeria* на чашках со всеми дифференциально-диагностическими средами, пересеивались на питательную среду № 1 ГРМ, подвергались исследованию в реакции латекс-агглютинации (ЛАГ) на стекле. В ЛАГ клетки *L. monocytogenes*, присутствующие в исследуемой пробе, взаимодействуя с частицами латекса, сенсибилизированными антителами против углеводной фракции ЛПС *L. monocytogenes*, образовывали видимые агглютинаты.

Бактериологическим методом подтверждена родовая и видовая принадлежность листерий для всех клинических изолятов.

Действующие нормативные документы: ГОСТ 32031-2012 и МУК 4.2.1122-02 распространяются на пищевые продукты и устанавливают методы выявления *L. monocytogenes*. Лабораторная диагностика листериоза у людей в данной работе осуществлялась в соответствии с действующими нормативными документами на пищевые продукты.

Действующие Методические рекомендации⁷ по лабораторной диагностике листериоза животных и людей, регламентирующие устаревшие методы исследований, приборы, низкоселективные дифференциально-диагностические питательные среды, требуют изменений и дополнений. Специалистам аккредитованных микробиологических лабораторий необходима современная методология исследований по индикации и идентификации листерий в клиническом материале.

СанПиН 3.3686-21 регламентирует для диагностики листериоза использовать бактериологический и серологический методы. ПЦР может быть использована для быстрого выявления генетического материала возбудителя в ликворе, ткани плаценты, секционном материале. Мультилокусное или полногеномное секвенирование используется для типирования клинических изолятов листерий и их сравнения с культурами листерий, выделенных из продуктов питания.

Последовательное соблюдение алгоритма исследования и использование различных методов микробиологической диагностики позволит проводить лабораторные исследования в клинической микробиологии с целью выделения листерий из исследуемого материала. От выбора метода диагностики зависит возможность реализации исследования – его проведения и получения определённого результата.

Исследовав и оценив возможности выделения из клинического материала листерий и их идентификацию современными методами, можно сделать вывод о применении как ручных тестов идентификации патогенов (наборы мультимикротестов, серологические тесты), так и методов амплификации нуклеиновых кислот (как дополнительный метод при исследовании биологического материала). Выделение и идентификация листерий требует получения чистых культур с использованием стандартных питательных сред [16, 18-20].

Во многом применение того или иного метода при диагностике листериоза зависит от оснащённости лаборатории. «Золотым стандартом» диагностики листериозной инфекции является культуральный метод.

Заключение. Современный этап развития клинической лабораторной диагностики инфекционной болезни характеризуется применением высокоточных методов лабораторного анализа. Полученные данные могут быть использованы в качестве основы для разработки методических указаний, рекомендаций, других документов для проведения микробиологического исследования биологического материала на наличие бактерий рода *Listeria* spp. и вида *L. monocytogenes* в биологическом материале. Многолетний опыт применения качественных питательных сред гарантирует потребителям обеспечение достоверных результатов микробиологических анализов при выявлении *Listeria* spp. Использование комплекса методов и препаратов для выявления и идентификации листерий позволит в полном объёме удовлетворить потребности клинической и санитарной микробиологии в России, что обеспечит санитарно-эпидемическое благополучие населения Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 10-13 см. REFERENCES)

1. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Монография. М.: Медицина для всех; 2001.
2. Бакулин Н.И., Батуро А.П., Блинкова Л. П. Бузова С.А., Воробьева С.Д., Гавристова И.А. и др. Клиническая лабораторная аналитика: Клиническая лабораторная аналитика в 5-ти томах. М.: ООО «Агат-Мед»; 2003.
3. Бакулов И.А., Васильев Д.А., Ковалева Е.Н., Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О. Листерии и листериоз. Монография. Ульяновск: НИИЦМиБ; 2016 (2): 49-62.
4. Ковалёв В.А., Филатов Н.Н., Алёшина Е.Н., Симонова Е.Г., Заболевает ли листериозом в Российской Федерации. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019;7(4): 509-17.
5. Фертиков В. И., Тихонов А. Н., Хрипунов Е. М., Егорова И. Ю. К формированию бактерий рода *Listeria* в эпоху позднего плейстоцена: факты и гипотезы. *Сельскохозяйственная биология*. 2009 (6): 18-26.
7. Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Фурсова Н.К. Выявления в сточных водах Вологодской области *Listeria monocytogenes* с уникальным сиквенс-типом ST7, ST20 и ST425. *Бактериология*. 2021; 6(3):14-5.
8. Алексеева Е.А., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Опыт выделения *Listeria monocytogenes* на территории Вологодской области. *Бактериология*. 2019; 4(2): 31-6.
9. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Дятлов И.А. Листерии. Современный подход к проблеме выделения листерий с использованием питательных сред. *Справочник заведующего КДЛ*. 2018; (7): 33-48.
14. Полосенко О.В., Шепелин А.П., Марчихина И.И., Шолохова Л.П. Разработка питательных сред для выделения листерий. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6 (3): 92.
15. Стародумова С.М., Зайцева Е.А. Способ быстрой идентификации бактерий рода *Listeria* и патогенного вида *Listeria monocytogenes* с помощью мультиплексной ПЦР. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014; 1(55): 95-7.
16. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Попова А.Ю., Дятлов И.А., ред. М.: Династия; 2020.
17. Ермолаева С.А., Карпова Т.И., Тартаковский И.С., Вазкес Боланд Хоце Антонио. Способ дифференциации культуры *Listeria monocytogenes*. Патент РФ № 2196827; 2001.
18. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н. Несвижский Ю.В., Дратвин С.А., Пашков Е.П. и др. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство; 2022.
19. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алешкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.

⁷Методические рекомендации по лабораторной диагностике листериоза животных и людей (утв. Минздравом СССР и Госагропромом СССР 04.09.1986 г. и 13.02.1987 г.).

20. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алешкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63-5.

REFERENCES

1. Tartakovskiy I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. Listeria: the role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. Monograph. [Listerii: rol' v infektsionnoj patologii cheloveka i laboratornaya diagnostika. Monografiya]. Moscow: Meditsina dlya vseh; 2001. (in Russian)
2. Bakulin N.I., Baturo A.P., Blinkova L.P., Burova S.A., Voropayeva S.D., Gavristova I.A. et al. Clinical Laboratory Analytics: Clinical Laboratory Analytics in 5 volumes. [Klinicheskaya laboratornaya analitika: Klinicheskaya laboratornaya analitika v 5 tomakh]. Moscow: «Agat-Med»; 2003. (in Russian)
3. Bakulov I.A., Vasil'ev D.A., Kovaleva E.N., Egorova I.Yu., Selyaninov Yu.O. Listeria and listeriosis. *Monograph* [Listerii i listerioz. Monografiya]. Ul'yanovsk: NIICMiB; 2016 (2): 49-62. (in Russian)
4. Kovalev V.A., Filatov N.N., Aleshina E.N., Simonova E.G. Sickness of listeriosis in Russian Federation. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)* 2019;7(4): 509-17. (in Russian)
5. Fertikov V.I., Tikhonov A.N., Hripunov E.M., Egorova I.Yu. On the occasion of formation of bacteria of Listeria genus in epoch of late pleistocene: the facts and hypothesis. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2009; (6): 18-26. (in Russian)
6. Lepe J. A. Current aspects of listeriosis. *Med. Clin. (Barc)*. 2020; 154(11): 453-8.
7. Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Fursova N.K. Detection of Listeria monocytogenes in wastewater of the Vologda region with a unique sequence type ST7, ST20 I ST425. *Bakteriologiya*. 2021; 6(3):14-5. (in Russian)
8. Alekseeva E.A., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Experience a selection of Listeria monocytogenes in the territory of the Vologda region. *Bakteriologiya*. 2019; 4(2): 31-6. (in Russian)
9. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Dyatlov I.A. A modern approach to the problem of listeria isolation using nutrient media. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2018; (7): 33-48. (in Russian)
10. Gray M.L., Stafseth H.J., Thorp F. Jr. The use of potassium tellurite, sodium azide, and acetic acid in a selective medium for the isolation of Listeria monocytogenes. *J. Bacteriol.* 1950; 59(3): 443-4.
11. Shimizu K., Otsuka G., Oka M. Guanofuracin media for isolation of *L. monocytogenes* and its practical application. *Japn. J. Vet. Res.* 1954; (2): 3-10.
12. Mc Bride M.E., Girard K.F. A selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. *J. Lab. Clin. Med.* 1960; 55: 153-7.
13. Despieres M. Isolation de *Listeria monocytogenes* dans un milieu defavorable a *Streptococcus faecalis*. *Ann. Inst. Pasteur.* 1971; (121): 493-501.
14. Polosenko O.V., Shepelin A.P., Marchihina I.I., Sholokhova L.P. Development of nutrient media for the isolation of listeria. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6 (3): 92. (in Russian)
15. Starodumova S.M., Zaytseva E.A. The way of a quick identification of bacteria genus Listeria and pathogenic species of Listeria monocytogenes by means of the multiplex polymerase chain reaction. *Tikhookeanskiy meditsinskij zhurnal*. 2014; 1(55): 95-7. (in Russian)
16. Microbiological quality control of food products. Collective monograph [Mikrobiologicheskij kontrol' kachestva pishchevoy produktii. Kollektivnaya monografiya]. Popova A.Yu., Dyatlov I.A., eds. Moscow: Dinastiya; 2020. (in Russian)
17. Ermolaeva S.A., Karpova T.I., Tartakovskiy I.S., Vazkes Boland Hose Antonio. A way to differentiate culture Listeria monocytogenes. Patent RF № 2196827; 2001. (in Russian)
18. Vorob'yov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N., Nesvizhsky Yu.V., Dratvin S.A., Pashkov E.P. et al. Medical Microbiology, Virology and Immunology: Textbook for medical university students. [Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: Uchebnik dlya studentov meditsinskih vuzov]. Moscow: MIA; 2022. (in Russian)
19. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. The condition and tendencies of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)
20. Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A. et al. The actual approaches to problem of import substitution in the field of production growth medium. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian).

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Игнатова Н.И., Елагин В.В., Иванова Т.С., Харитонов Т.М., Антонян А.Э., Стрельцова О.С.

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КОНКРЕМЕНТАМИ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия

В связи с распространённостью послеоперационных осложнений при лечении мочекаменной болезни, большую значимость в лабораторно-диагностической практике представляет исследование обсеменённости камней почек и мочевого пузыря и потенциальной патогенности изолированных бактерий. Показано, что уропатогенные бактерии обнаруживаются в составе мочевых камней в 65±7,1% случаев, преимущественно, представители семейств Enterobacteriaceae и Staphylococcaceae. Наиболее часто обнаруживались бактерии родов Escherichia, Enterococcus, Staphylococcus. Проведён анализ биоплёночной активности и резистентности к антибиотикам у 50 уропатогенных штаммов. Все исследуемые штаммы обладали резистентностью хотя бы к двум тестируемым препаратам, среднее значение индекса множественной резистентности составило 0,51. При культивировании на питательном агаре с Конго красным показано, что более чем половина тестируемых штаммов обладает высокой биоплёночной активностью и около 80% потенциальной способностью к биоплёнокообразованию. Наибольшая биоплёночная активность отмечена у бактерий родов Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Staphylococcus.

Ключевые слова: уроинфекции; мочекаменная болезнь; конкременты; уропатогенные бактерии; антибиотикорезистентность; биоплёнокообразование.

Для цитирования: Игнатова Н.И., Елагин В.В., Иванова Т.С., Харитонов Т.М., Антонян А.Э., Стрельцова О.С. Оценка потенциальной патогенности микроорганизмов, ассоциированных с мочевыми конкрементами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 369-373. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-369-373>

Для корреспонденции: Игнатова Надежда Ивановна, канд. биол. наук, доц. каф. эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины; e-mail: n.i.evteeva@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 21-15-00371.

Поступила 15.03.2022

Принята к печати 28.03.2022

Опубликовано 20.06.2022

Ignatova N.I., Elagin V.V., Ivanova T.S., Kharitonova T.M., Antonyan A.E., Streltsova O.S.

EVALUATION OF THE POTENTIAL PATHOGENICITY OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH URINARY CALCULI

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia

Due to the prevalence of postoperative complications in the treatment of urolithiasis, the study of the contamination of urinary calculi and the potential pathogenicity of isolated bacteria is of great importance in laboratory diagnostic practice. It has been shown that uropathogenic bacteria are found in the composition of urinary stones in 65±7.1% of cases, mainly representatives of the Enterobacteriaceae and Staphylococcaceae families. Bacteria of the genera Escherichia, Enterococcus, Staphylococcus were most frequently detected. The analysis of biofilm activity and antibiotic resistance in 50 uropathogenic strains was carried out. It was shown that all the studied strains were resistant to at least two tested drugs, and the average value of the multiple resistance index was 0.51. When cultured on nutrient agar with Congo red, it was shown that more than half of the tested strains have high biofilm activity and about 80% potential for biofilm formation. The greatest biofilm activity was observed in bacteria of the genera Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Staphylococcus.

Key words: uroinfections; urolithiasis; calculi; uropathogenic bacteria; antibiotic resistance; biofilm formation.

For citation: Ignatova N.I., Elagin V.V., Ivanova T.S., Kharitonova T.M., Antonyan A.E., Streltsova O.S. Evaluation of the potential pathogenicity of microorganisms associated with urinary calculi. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; (6): 369-373 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-369-373>

For correspondence: Ignatova N.I., PhD, Associate Professor, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine; e-mail: n.i.evteeva@gmail.com

Information about authors:

Ignatova N.I., <https://orcid.org/0000-0002-4570-9342>;
Elagin V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2676-5661>;
Ivanova T.S., <https://orcid.org/0000-0002-5303-0313>;
Kharitonova T.M., <https://orcid.org/0000-0003-3989-9087>;
Antonyan A.E., <https://orcid.org/0000-0001-6494-7277>;
Streltsova O.S., <https://orcid.org/0000-0002-9097-0267>.

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

Acknowledgment. This research was funded by the Russian Science Foundation under grant No. 21-15-00371.

Received 15.03.2022

Accepted 28.03.2022

Published 20.06.2022

Введение. Мочекаменная болезнь (МКБ) является широко распространённым заболеванием мочевыделительной системы у лиц среднего и старшего возраста. По ежегодным затратам на диагностику, лечение, госпитализацию МКБ занимает второе место среди всех инфекций, связанных с мочевыделительной системой [1]. Особенно остро стоит вопрос в странах с высоким уровнем жизни, где частота образования камней в почках значительна (>10-30%) [2]. Урологи особо обеспокоены камнями, образующимися в ходе персистенции микроорганизмов в мочевыводящей системе, которые составляют до 15% камней в почках [3]. Бактерии, расщепляющие мочевины, такие, как *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Providencia* spp., *Ureaplasma urealyticum*, обычно ответственны за струвитные камни [4,5]. При дроблении таких камней, микроорганизмы могут вызывать послеоперационные осложнения, такие как пиелонефрит, синдром системной воспалительной реакции, уросепсис [6]. Многие патогены антибиотикорезистентны, что обуславливает их персистенцию при лечении послеоперационных осложнений. Широкая распространённость хронических заболеваний мочевыводящих путей, катетер-ассоциированных инфекций и других патологий, имеющих в своей основе биоплёночный процесс [7], определяет актуальность исследования потенциальной способности штаммов к биоплёнокообразованию. Биоплёнка представляет сообщество взаимодействующих бактерий, погруженных в слизисто-полимерный матрикс, что делает данные микроорганизмы более устойчивыми к воздействию ряда факторов, в том числе, к антимикробным препаратам (АМП) [8]. Применение АМП является основным способом лечения и профилактики послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений. Представляет интерес изучение спектра антибиотикочувствительности бактерий, ассоциированных с камнями мочевыделительной системы и их способности к биоплёнокообразованию, что и явилось целью данного исследования.

Материал и методы. Материалом для исследования служили 50 штаммов бактерий, изолированных из камней мочевыделительной системы пациентов с МКБ, госпитализированных в ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н. А. Семашко». Смывы с измельченных конкрементов высевали на дифференци-

ально-диагностические среды: желточно-солевой агар, энтерококк агар, среду Эндо. Посевы культивировали 24 ч, при 37° С. Видовая идентификация представителей *Staphylococcaceae* и *Enterobacteriaceae* проводилась с помощью наборов биохимической идентификации бактерий (Диагностические системы, Нижний Новгород, Россия) и оксидазного теста (Диагностические системы, Нижний Новгород, Россия). Чувствительность к АМП (офлоксацину, норфлоксацину, ампициллину, амоксицилину с клавулановой кислотой, цефтриаксону, ципрофлоксацину, цефтазидиму, цефотаксиму, триметоприму с сульфаметоксазолом) определяли диско-диффузионным методом. Диаметры зон задержки роста интерпретировались в соответствии с инструкцией производителя (NISC, Санкт-Петербург, Россия).

Определение способности микроорганизмов к биоплёнокообразованию проводили путём посева исследуемых штаммов на агар, содержащий Конго красный [9]. Принцип метода заключается в способности Конго красного окрашивать полисахарид, входящий в состав матрикса биоплёнки. Штаммы, с высокой способностью к биоплёнокообразованию, окрашивают среду вокруг колоний в чёрный цвет. Для штаммов со средней способностью биоплёнокообразования характерно окрашивание колоний в чёрный или коричневый цвет, при этом среда остается неокрашенной, штаммы не способные к образованию биоплёнки не имеют окрашивания колоний или среды.

Статистическая обработка данных. Частота обнаружения различных штаммов бактерий в мочевых камнях выражена в процентах по отношению к общему числу штаммов. Индекс множественной резистентности (ИМР) к АМП рассчитывался соотношением количества резистентных штаммов к общему числу тестируемых АМП.

Результаты. Изолировано 50 штаммов бактерий. Количество инфицированных проб составило 65% от общего числа анализируемых конкрементов, из 44% проб изолирован один штамм, из 21% проб – 2 и более штаммов. Определены представители 9 родов микроорганизмов, большая часть которых относилась к семейству *Enterobacteriaceae* (7 родов). Наиболее часто выделялись представители родов *Staphylococcus* (26%), *Escherichia* (24%), *Enterococcus* (14%) (рис. 1).

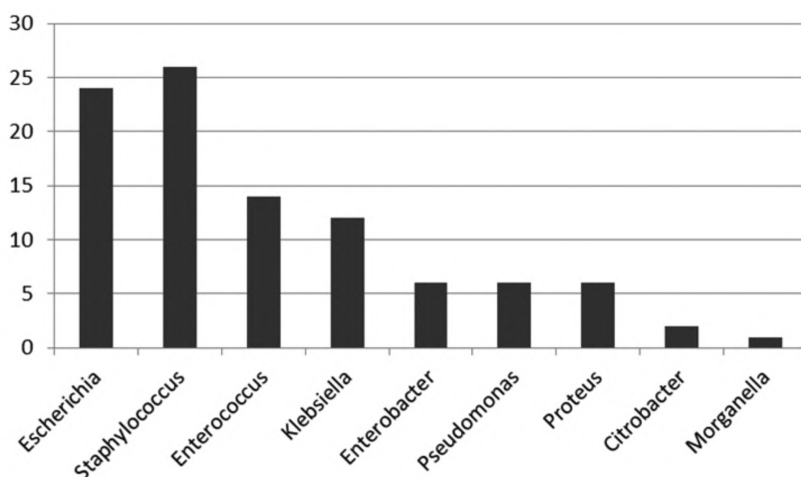


Рис. 1. Видовой состав микроорганизмов, изолированных из конкрементов мочевыделительной системы (% от общего числа штаммов).

Анализ чувствительности изолированных штаммов к АМП, рекомендуемым для терапии урологических инфекций, показал, что практически для всех АМП наблюдается примерно равное количество чувствительных и резистентных штаммов. Исключение составляют ампициллин и сульфаметоксазон, для которых преобладают резистентные штаммы, и цефтазидим с незначительным преобладанием чувствительных штаммов. Среди представителей рода *Escherichia* только один выделенный штамм обладал чувствительностью ко всем АМП. Для остальных штаммов среднее значение ИМП составило 0,54 (рис. 2).

К офлоксацину, ампициллину, цiproфлоксацину наблюдалось наибольшее количество резистентных штаммов рода *Escherichia*. Среди *Staphylococcus aureus* один штамм обладал чувствительностью ко всем АМП, кроме ампициллина, для всех остальных характерна мультирезистентность (среднее значение ИМП 0,63). Наибольшее количество резистентных штаммов отмечено для ампициллина, офлоксацина, норфлоксацина, цефотаксима. Один штамм *Staphylococcus xylosum* резистентен ко всем

АМП, другой к пяти. Среди штаммов *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus intermedius* устойчивость обнаружена к двум, трём, шести АМП. Наибольшее количество штаммов демонстрировало резистентность к ампициллину, амоксициллину/клавуланату, триметоприму/сульфаметоксазону. Штаммы *Enterococcus faecalis* имели среднее значение ИМП 0,25. Для *Enterococcus faecium* значение ИМП составляло 0,6; один штамм чувствителен только ко одному АМП, один резистентен ко всем. Наименее эффективны ампициллин, амоксициллин/клавуланат, триметоприм/сульфаметоксазон. Один штамм *Klebsiella planticola* устойчив ко всем исследованным АМП, один штамм *Klebsiella pneumoniae* чувствителен ко всем АМП. Для остальных представителей рода *Klebsiella* значение ИМП 0,33. Наибольшая устойчивость выявлена к ампициллину и триметоприму/сульфаметоксазону (рис. 3).

Один из трёх представителей рода *Enterobacter* имел чувствительность ко всем АМП, второй – к норфлоксацину и цефтазидиму, третий – устойчив ко всем АМП. Один штамм *Pseudomonas aeruginosa* устойчив ко всем

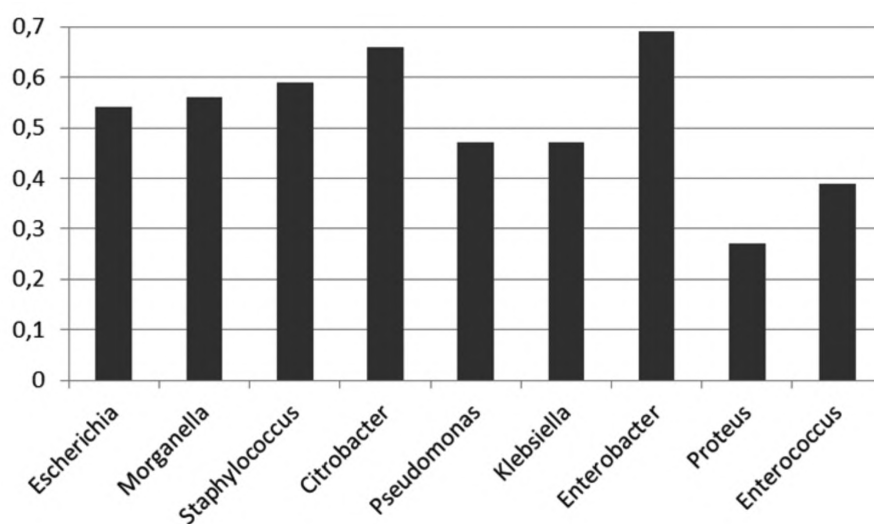


Рис. 2. Значения среднего ИМП для наиболее часто встречающихся уропатогенов.

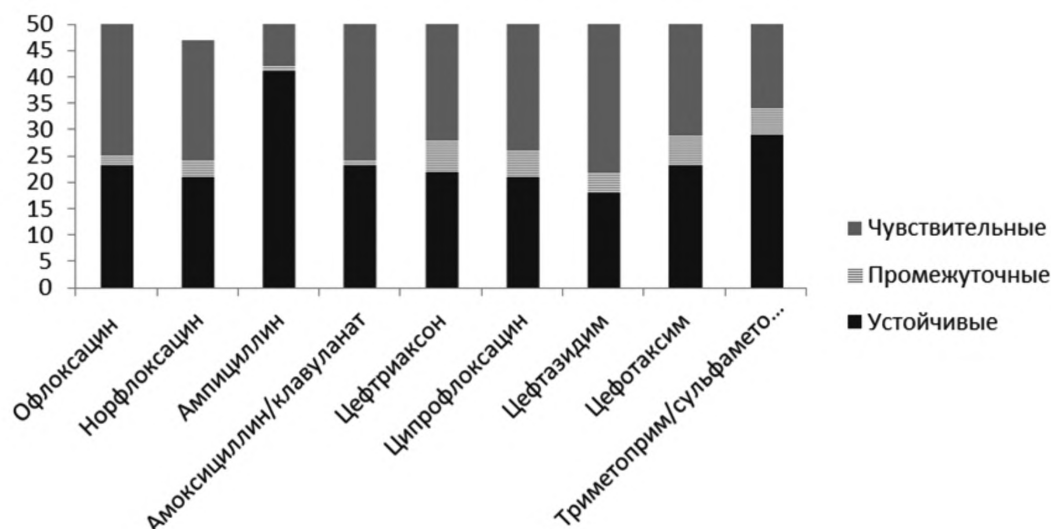


Рис. 3. Спектр чувствительности штаммов уропатогенов к АМП.

исследованным АМП, два других имели ИМП 0,22. Наименьшую эффективность при этом продемонстрировали триметоприм/сульфаметоксазон, норфлоксацин, ампициллин. Один из штаммов *Proteus mirabilis* чувствителен ко всем АМП, второй устойчив только к ципрофлоксацину. Третий штамм устойчив к ампициллину, цефтриаксону, ципрофлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазону. Среди представителей *Citrobacter* один штамм устойчив ко всем АМП, второй – к ампициллину, цефтриаксону, цефотаксиму. Единственный представитель рода *Morganella* чувствителен к амоксициллину/клавуланату, цефтриаксону, цефтазидиму, цефотаксиму.

Из 50 исследуемых штаммов более половины (54%) составляли штаммы с высокой способностью к биоплёнокообразованию, 23% показали низкую способность, 23% не образовывали биоплёнки.

Наибольшей способностью к образованию биоплёнок обладали штаммы *Escherichia coli* (рис. 4). Из 12 исследованных штаммов только два не образовывали биоплёнки. Среди представителей рода *Staphylococcus* один штамм не формировал биоплёнки, 5 штаммов обладали высокой способностью к формированию биоплёнок, 6 – имели среднюю способность. Из шести штаммов *Enterococcus* половина имела высокую способность образовывать биоплёнки (*Enterococcus faecalis*), другая половина – среднюю (*Enterococcus faecium*). Среди представителей рода *Klebsiella* 3 штамма имели высокую способность формировать биоплёнки, 1 – среднюю. Все выделенные штаммы *Morganella* и *Enterobacter* характеризовались высокой биоплёночной активностью. *Pseudomonas* и *Citrobacter* не обладали способностью формировать биоплёнки. Среди представителей рода *Proteus* только один штамм обладал высокой биоплёночной активностью (рис. 4). Около 80% штаммов уропатогенов обладало способностью к биоплёнокообразованию.

Обсуждение. Существует два варианта связи МКБ с инфекциями мочевыводительной системы: образование камней может возникать на фоне инфекционного процесса или камни могут быть инфицированы после их формирования [10]. В обоих случаях камни могут выступать источником вторичной инфекции, что определяет важность исследования потенциальной патогенности микроорганизмов, ассоциированных с ними.

Патогенность микроорганизмов определялась по их способности формировать биоплёнки и устойчивости к АМП. В первую очередь, мы начали с определения частоты встречаемости микроорганизмов на камнях. Из всех исследованных образцов 65% конкрементов содержали микроорганизмы. Согласно данным литературы, этот показатель может составлять от 15 до 70% [11], и во многом зависит от химического состава камня [12]. В 21% случаев на камнях присутствуют более одного вида микроорганизмов. Поскольку разные штаммы могут иметь разную чувствительность к АМП и разную способность формировать биоплёнки, это повышает вероятность развития вторичной инфекции. В исследовании выделено 17 видов микроорганизмов, относящихся к 9 родам. Больше всего выделено штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium*. Согласно предыдущим исследованиям, наиболее часто выделяются *E. coli*, следующими по частоте могут быть представители *Proteus* или *Pseudomonas*, далее *Klebsiella* [12, 13]. Такое различие в видовом разнообразии микроорганизмов, выделенных с камней, определяется экологическими особенностями регионов проживания пациентов и доступностью АМП.

Анализ резистентности выделенных микроорганизмов к АМП, как одного из факторов их патогенности, показал, что только 3 штамма являлись чувствительными ко всем исследованным АМП, ещё 3 штамма устойчивы к одному АМП. Остальные штаммы обладали мультирезистентностью. При оценке резистентности к АМП с одинаковым механизмом действия показано некоторое сходство, что свидетельствует об одинаковых механизмах защиты со стороны бактерий. К норфлоксацину и офлоксацину – практически одинаковая чувствительность. АМП цефалоспоринового ряда показали сходную чувствительность. При сравнении ампициллина и амоксициллина, усиленного клавулановой кислотой, заметна эффективность добавления ингибитора β -лактамаз. Наибольшее количество штаммов *E. coli* и *S. aureus* резистентны к бета-лактамам АМП, устойчивость к которым связана с продукцией β -лактамаз [14]. К цефтриаксону, наиболее часто назначаемому АМП при инфекциях мочевыводительной системы, резистентность демонстрируют 44% от всех выделенных штаммов, а 12% штаммов проявляют промежуточную чувствитель-

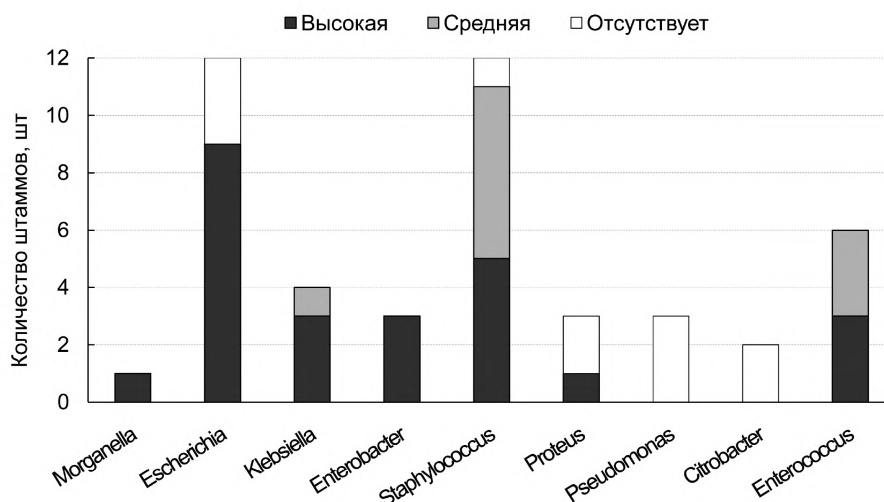


Рис. 4. Способность уропатогенов к формированию биоплёнок.

ность. Становится очевидным, что более чем в половине случаев назначения данного АМП пациентам, терапия не будет иметь эффекта. Выявленная мультирезистентность может быть обусловлена не только наличием у бактерий механизмов нейтрализации или удаления из клетки АМП, но и высокой способностью формировать биоплёнки. В исследовании данной корреляции не выявлено, что может быть обусловлено малым количеством анализируемых штаммов и ещё меньшим количеством штаммов, чувствительных к АМП.

Использование питательной среды с добавлением Конго красного показало, что почти 80% штаммов способны образовывать биоплёнки. Наиболее часто эта способность встречается среди грамотрицательных уропатогенов семейства *Enterobacteriaceae*. Это можно объяснить тем, что бактериальные сообщества используют систему кворум сенсинг (QS) для контроля образования биоплёнки. Механизм функционирует посредством аутоиндукторов, которые наиболее активно продуцируются именно у грамотрицательных бактерий. Образую биоплёнку, бактерии создают устойчивую систему защиты, в том числе, и от действия АМП [7,8], что может стать причиной хронической инфекционной патологии или способствовать развитию внутрибольничных инфекций [15]. Исследование чувствительности к АМП проведено не на биоплёнках, однако, необходимо учесть следующее обстоятельство. Краситель Конго красный окрашивает полисахарид, входящий в состав матрикса биоплёнки. В случае штаммов, обладающих высокой способностью к формированию биоплёнок, наблюдается окрашивание питательной среды вокруг колоний. Это позволяет предположить, что данные бактерии секретируют полисахарид в окружающее пространство, и тем самым затрудняют проникновение АМП внутрь клеток. У штаммов со средней способностью к формированию биоплёнок, Конго красным окрашиваются только колонии. В этом случае, полисахарид, вероятно, находится в составе клеточной стенки и препятствует проникновению АМП в клетку.

Более 80% выделенных из конкрементов мочевыведительной системы штаммов являются потенциально патогенными, поскольку способны формировать биоплёнки и обладают резистентностью к используемым АМП. Подобные штаммы могут вызвать послеоперационные осложнения, что необходимо учитывать при планировании лечения МКБ.

Заключение. Исследование подчеркивает важность микробиологического анализа камней для достижения стерильности мочевыведительной системы и предотвращения инфекционных осложнений при лечении МКБ. Поскольку большинство штаммов, изолированных из камней, являются мультирезистентными, возникает необходимость пересмотра устоявшихся схем лечения, разработки новых АМП или способов терапии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-5, 8-15 см. REFERENCES)

1. Клинические рекомендации. Мочекаменная болезнь; 2020 (01.06.2020 г.). Утверждены Минздравом РФ. http://disuria.ru/_ld/7/733_kr20N20mz.pdf.
2. Стяжкина С.Н., Азимова Е.Л., Жернакова А.Е., Завьялова Н.А. Осложненное течение мочекаменной болезни в хирургической практике. Научно-образовательный журнал для студентов и преподавателей «StudNet». 2021; 5: 1-6. <https://cyberleninka.ru/article/n/oslozhnennoe-techenie-mochekamennoy-bolezni-v-hirurgicheskoy-praktike>.

3. article/n/oslozhnennoe-techenie-mochekamennoy-bolezni-v-hirurgicheskoy-praktike.
4. Мусейбов Е.А. Клинические проявления воспалительно-инфекционных осложнений при мочекаменной болезни. *Евразийский Союз Ученых*. 2019; 3(12): (69). <https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-proyavleniya-vospalitelno-infektsionnyh-oslozhneniy-pri-mochekamennoy-bolezni>.
5. Немцева Н.В. Биоплёнки – феномен формирования резистентности микроорганизмов в различных экосистемах. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019; 3. <https://cyberleninka.ru/article/n/bioplénki-fenomen-formirovaniya-rezistentnosti-mikroorganizmov-v-razlichnyh-ekosistemah>.

REFERENCES

1. Clinical recommendations. Urolithiasis 2020 (01.06.20). Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation. http://disuria.ru/_ld/7/733_kr20N20mz.pdf. (in Russian)
2. Styazhkina S.N., Azimova E.L., Zhernakova A.E., Zavyalova N.A. Complicated course of urolithiasis in surgical practice. *StudNet*. 2021; 5: 1-6. <https://cyberleninka.ru/article/n/oslozhnennoe-techenie-mochekamennoy-bolezni-v-hirurgicheskoy-praktike>. (in Russian)
3. Bazin D., André G., Weil R., Matzen G., Emmanuel V., Carpentier X. et al. Absence of bacterial imprints on struvite-containing kidney stones: a structural investigation at the mesoscopic and atomic scale. *Urology*. 2012; 79(4):786-90.
4. Shah P., Baral R., Agrawal C.S., Lamsal M., Baral D., Khanal B. Urinary Calculi: A Microbiological and Biochemical Analysis at a Tertiary Care Hospital in Eastern Nepal. *Int. J. Microbiol* 2020; 8880403.12. DOI:10.1155/2020/8880403.
5. Flannigan R., Choy W.H., Chew B., Lange D. Renal struvite stones-pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nat. Rev. Urol*. 2014; 11(6):333-41. DOI: 10.1038/nrurol.2014.99.
6. Museibov E.A. Clinical manifestations of inflammatory and infectious complications in urolithiasis. *Evrasiyskiy soyuz uchennykh*. 2019; 3 (12): 69. <https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-proyavleniya-vospalitelno-infektsionnyh-oslozhneniy-pri-mochekamennoy-bolezni>. (in Russian)
7. Nemtseva N.V. Biofilms – the phenomenon of the formation of resistance of microorganisms in various ecosystems. *Bulleten` Orenburgskogo nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk*. 2019; 3. <https://cyberleninka.ru/article/n/bioplénki-fenomen-formirovaniya-rezistentnosti-mikroorganizmov-v-razlichnyh-ekosistemah>. (in Russian)
8. Mahato S., Mandal P., Machato A. Biofilm production by uropathogens like *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp. and their antibiotic susceptibility. *Birat. Journal of Health Sciences*. 2020; 5(1):902-6. DOI: 10.3126/bjhs.v5i1.29609.
9. Saxena N., Naheshwari D., Dadhich D., Singh S. Evaluation of congo red agar for detection of biofilm production by various clinical candida isolates. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. 2014; 3 (59):13234-8. DOI: 10.14260/jemds/2014/3761.
10. Miano R., Germani S., Vespasiani G. Stones and urinary tract infections. *Urol. Int*. 2007; 79 (Suppl. 1):32-6.
11. Schwaderer A.L., Wolfe A.J. The association between bacteria and urinary stones. *Ann. Transl. Med*. 2017; 5(2):32.
12. Golechha S., Solanki A. Bacteriology and chemical composition of renal calculi accompanying urinary tract infection. *Indian J. Urol*. 2001; 17:111-7.
13. Tavichakorntrakool R., Prasongwattana V., Sungkeeree S. Extensive characterizations of bacteria isolated from catheterized urine and stone matrices in patients with nephrolithiasis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2012;27(11):4125-30.
14. Guo Wu., Son G., Sun M., Wang J., Wang Ya. Prevalence and treatment methods of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00107.
15. Vuotto C., Longo F., Pascolini C., Donelli G., Balice M.P., Libori M.F. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol*. 2017; 123: 1003-18. DOI: 10.1111/jam.13533.

Старикова Д.В., Богачева Н.В., Макарова И.А.

ПРОБЛЕМА РИСКА РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ АКУШЕРСКОЙ РАНЫ ПОСЛЕ КЕСАРЕВА СЕЧЕНИЯ У ЖЕНЩИН КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 610027, Киров, Россия

За последнее десятилетие частота абдоминального родоразрешения в России возросла в среднем до 25 %. Широкое распространение абдоминального родоразрешения не обошлось без увеличения частоты осложнений. Среди них инфекционное осложнение хирургической акушерской раны (МКБ О86.1) на передней брюшной стенке после кесарева сечения, которое в некоторых регионах достигает 43 %. Развитию осложнений способствуют различные клинико-лабораторные факторы риска, анализу которых у женщин Кировской области и посвящена данная статья. Анализ клинико-лабораторных факторов риска был проведен на основании данных, представленных в историях болезни женщин, находящихся на госпитализации гинекологических отделениях г. Кирова. Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере с использованием статистической программы R-4.0.2 и электронных таблиц Excel. При оценке актуальности проблемы для Кировской области было установлено, что частота кесарева сечения за последние 10 лет с 2011 по 2021 г. увеличилась с 27 % до 34 %. Частоту встречаемости инфекционных осложнений в Кировской области можно представить следующим образом: инфекция хирургической акушерской раны (МКБ О86.1) на передней брюшной стенке после кесарева сечения – 27 %; перитонит после кесарева сечения – 0,94 %-1,01 %; разлитой сепсис – 0,93 %-0,97 %. Немаловажную роль, по данным отчетов, в присоединении инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения играет общая заболеваемость и акушерский анамнез у женщин с абдоминальным родоразрешением, подробный статистический анализ которых представлен в материалах статьи. Результаты исследования обосновали проблему развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения для здравоохранения Кировской области, сравнимую с таковой для здравоохранения всей РФ. Проведенный анализ клинико-лабораторных факторов риска показал целесообразность использования комплексного анализа инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения на ранней стадии ее развития для быстрого разрешения осложнения, сокращения длительности госпитализации женщин после кесарева сечения, а также сохранения в последующем репродуктивной функции женщины.

Ключевые слова: абдоминальное родоразрешение; кесарево сечение; несостоятельность швов на передней брюшной стенке; инфекция хирургической акушерской раны; перитонит; разлитой сепсис; клинико-лабораторные факторы риска.

Для цитирования: Старикова Д.В., Богачева Н.В., Макарова И.А. Проблема риска развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения у женщин Кировской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (6): 374-379. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-374-379>

Для корреспонденции: Старикова Дарья Валерьевна, аспирант каф. микробиологии и вирусологии; e-mail: d_valerevna@list.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2022

Принята к печати 20.03.2022

Опубликовано 20.06.2022

Starikova D.V., Bogacheva N.V., Makarova I.A.

THE PROBLEM OF THE RISK OF DEVELOPMENT OF INFECTION OF SURGICAL OBSTETRIC WOUND AFTER CESARIAN SECTION IN WOMEN OF THE KIROV REGION

Kirov State Medical University, 610998, Kirov, Russia

Over the past decade, the frequency of abdominal delivery in Russia has increased to an average of 25 %. The widespread use of abdominal delivery has not been without an increase in the incidence of complications. Among them is an infectious complication of a surgical obstetric wound (ICD O86.1) on the anterior abdominal wall after a caesarean section, which in some regions reaches 43 %. The development of complications is facilitated by various clinical and laboratory risk factors, the analysis of which in women of the Kirov region is the subject of this article. The analysis of clinical and laboratory risk factors was carried out on the basis of the data presented in the case histories of women hospitalized in the gynecological departments of the city of Kirov. Statistical data processing was carried out on a personal computer using the R-4.0.2 statistical program and Excel spreadsheets. When assessing the relevance of the problem for the Kirov region, it was found that the frequency of caesarean section over the past 10 years from 2011 to 2021 increased from 27,0 % to 34,0 %. The incidence of infectious complications in the Kirov region can be presented as follows: infection of the surgical obstetric wound (ICD O86.1) on the anterior abdominal wall after caesarean section – 27,0 %; peritonitis after caesarean section – 0,94 %-1,01 %; diffuse sepsis – 0,93 %-0,97 %. An important role, according to reports, in the addition of an infection of a surgical obstetric wound after cesarean section is played by the general morbidity and obstetric history in women with abdominal delivery, a detailed statistical analysis of which is presented in the materials of the article. The results of the study substantiated the problem of the development of an infection of a surgical obstetric wound after a caesarean section for the healthcare of the Kirov region, comparable to that for the healthcare of the entire Russian Federation. The analysis of clinical and laboratory risk factors showed the feasibility of using a comprehensive analysis of infection of a surgical wound after cesarean section at an early stage of its development to quickly resolve complications, reduce the duration of hospitalization of women after cesarean section, and subsequently preserve the reproductive function of a woman.

Key words: abdominal delivery; cesarean section; inconsistency of sutures on the anterior abdominal wall; infection of a surgical obstetric wound; peritonitis; diffuse sepsis; clinical and laboratory risk factors.

For citation: Starikova D.V., Bogacheva N.V., Makarova I.A. The problem of the risk of development of infection of surgical obstetric wound after cesarian section in women of the Kirov region. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 374-379 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-374-379

For correspondence: Starikova D.V., postgraduate student of the Department of Microbiology and virology; e-mail: d_valerev-na@list.ru

Information about authors:

Starikova D.V., <https://orcid.org/0000-0002-6522-0157>;

Bogacheva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-7021-6232>;

Makarova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-2930-8215>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 14.01.2022

Accepted 20.03.2022

Published 20.06.2022

Введение. В настоящее время кесарево сечение является самой востребованной операцией среди абдоминальных операций во всем мире. Своевременно выполненное абдоминальное родоразрешение во многих ситуациях является одним из способов сохранения материнского и детского здоровья. За последнее десятилетие частота абдоминального родоразрешения в России возросла в среднем до 25 % и ежегодно увеличивается на 1 % [1]. Несмотря на широкое распространение, абдоминальное родоразрешение относится к разряду сложных хирургических вмешательств с достаточно высокой частотой осложнений.

Так, частота встречаемости инфекционных осложнений, таких как несостоятельность швов на передней брюшной стенке, классифицируемая по МКБ О86.1 – осложнения хирургической акушерской раны после кесарева сечения, достигает в некоторых регионах 43 % [2].

При нагноении раны передней брюшной стенки после кесарева сечения, если процесс своевременно не остановить, возможен переход гнойного воспаления в забрюшинное пространство и брюшную полость с генерализацией инфекции. Одним из критических осложнений раневой инфекции послеоперационного шва на передней брюшной стенке является послеродовой перитонит. Частота перитонита после кесарева сечения варьирует от 0,1 % до 1,5 % [3, 4]. Кроме перитонита тяжелым осложнением после кесарева сечения является разлитой сепсис [3, 4].

Развитию вышеописанных осложнений способствуют различные факторы риска. Среди значимых выделяют такие как хронические заболевания различных органов; эндокринные патологии; гинекологические заболеваниями воспалительного характера – вагинит и хронический цервицит; отягощенный акушерский анамнез и др. [5]. В 40 % случаев этиологической причиной несостоятельности швов на передней брюшной стенке является микробная контаминация. Немаловажным фактором в оценке риска развития несостоятельности швов при абдоминальном родоразрешении является анализ лабораторных показателей [6].

Однако, чтобы оценивать риск развития возможных послеоперационных осложнений, необходимо рассматривать в совокупности predisposing факторы риска у данной категории женщин – стартовый ресурс здоровья, риск развития скрытых патологий, которые могут проявляться на фоне беременности, а также проанализировать возможные риски развития осложнений при последующих беременностях, с целью сохранения не только общего здоровья женщины, но и преумножения ее репродуктивной функции, повышения рождаемости и снижения перинатальной смертности.

Цель исследования – оценить проблему развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения у женщин Кировской области по анализу частоты развития клиничко-лабораторных факторов риска, способствующих формированию осложнения.

Материал и методы. Анализ частоты развития инфекции акушерской хирургической раны после кесарева сечения у женщин Кировской области был проведен на основании анализа данных сборника, включающего информацию по всем регионам Российской Федерации, «Основные показатели здоровья матери и ребенка, деятельность службы охраны детства и родовспоможения в РФ» с 2011 по 2021 гг. Сборник подготовлен специалистами Департамента мониторинга, анализа и стратегического развития здравоохранения Минздрава Российской Федерации и специалистами «Центрального научно-исследовательского института организации и информатизации здравоохранения» Минздрава Российской Федерации [7].

Анализ клиничко-лабораторных факторов риска был проведен на основании данных, представленных в историях болезни женщин, находящихся ранее на госпитализации гинекологических отделениях КОГБУЗ «Кировская областная клиническая больница», КОГКБУЗ «Больница скорой медицинской помощи», а также КОГБУЗ «Кировский областной клинический перинатальный центр» г. Кирова за период с 2017-2021 гг. Все пациентки при госпитализации подписывали информированное добровольное согласие на исследование.

За данный период были проанализированы истории болезни 139 пациенток в возрасте от 16 до 41 года, средний возраст составил $27,22 \pm 0,69$ лет. Все пациентки были разделены на две группы. В 1-ю группу вошли пациентки без инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения (МКБ О82.1), во 2-ю группу – пациентки с инфекцией хирургической акушерской раны после кесарева сечения (МКБ О86.1).

В 1-ю группу вошли 71 пациентка в возрасте от 17 до 38 лет, средний возраст составил $27,48 \pm 0,77$. Во 2-ю группу – 68 пациенток в возрасте 16 до 41 года (средний возраст – $26,26 \pm 1,41$).

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере с использованием статистической программы R-4.0.2 и электронных таблиц Excel. Нормальность распределения количественных признаков проверялась с помощью теста Колмогорова-Смирнова и визуальной оценки графиков квантиль-квантиль. Для количественных признаков, имеющих нормальное распределение, вычисляли среднее значение (M), стандартная ошибка среднего (SE). Для количественных признаков, не имеющих нормальное распределение, вычисляли медиану (Me) и интерквартильный размах (IQR). Достоверность различия распределения нормально распределенных количественных признаков оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для признаков, имеющих распределение отличное от нормального, применялись непараметрические методы (критерий Манна-Уитни). Для оценки различия распределения качественных характеристик использовался критерий согласия χ^2 (хи-квадрат) или точный

критерий Фишера. Для определения факторов риска развития инфекции хирургической акушерской раны на передней брюшной стенке после кесарева сечения был проведен однофакторный регрессионный анализ.

Результаты. На первом этапе оценили частоту абдоминального родоразрешения у женщин в Кировской области. Результаты анализа показали, что в Кировской области частота кесарева сечения за последние 10 лет с 2011 по 2021 г. увеличилась с 27 % до 34 % [2].

Если, по данным научных исследований частота встречаемости инфекционных осложнений хирургической акушерской раны (МКБ О86.1) на передней брюшной стенке после кесарева сечения достигает в некоторых регионах 43% [7], то в Кировской области данный показатель достигает уровня 27 % [7].

Одним из критических осложнений раневой инфекции послеоперационного шва на передней брюшной стенке является послеродовой перитонит. Частота перитонита после кесарева сечения по ряду исследований варьирует от 0,1 % до 1,5 % [7]. В Кировской области данный показатель на протяжении 10 лет зарегистрирован на уровне 0,94 %-1,01 %. Кроме перитонита, тяжелым осложнением после кесарева сечения является разлитой сепсис [7]. Частота разлитого сепсиса в РФ варьирует от 0,12 %-1,31 %. В Кировской области разлитой сепсис на протяжении 10 лет зарегистрирован на уровне 0,93 %-0,97 %. Однако в 2019 г. был отмечен рост разлитого сепсиса у данной категории женщин. В сравнении с предыдущими годами частота его развития увеличилась в три раза и регистрация случаев по данному осложнению составила 2,96 % [7]. Данный факт объясняется тем, что с 2018 г. в Кировской области началась работа по централизации лабораторий, таким образом, расширились возможности и качество выполнения современной микробиологической диагностики. В рамках реализации данного проекта стала доступной целенаправленная микробиологическая диагностика для данной категории женщин и, соответственно, выросло число обследуемых. В связи с этим повышение рассматриваемого показателя связано с модернизацией обследования пациенток.

Немаловажную роль, по данным отчетов, в присоединении инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения играет общая заболеваемость и акушерский анамнез у женщин с абдоминальным родоразрешением. При сравнительном анализе анамнеза у пациенток в РФ и Кировской области было выявлено, что в РФ сахарным диабетом страдают около 7,21 % женщин, в Кировской области число зарегистрированных случаев составляет 6,12 %; заболевания щитовидной железы, сопровождающиеся гипопункцией, были выявлены у 9,29 % женщин в РФ, в Кировской области, в связи с эндемичностью региона, этот показатель составил 20 %; гипертензия, зарегистрированная до беременности, была выявлена у 5,84 % женщин в РФ, а в Кировской области этот показатель составил 5,25 % случаев; анемией во время беременности в РФ страдали 36,0 % против 38,6 % женщин в Кировской области. Также оценивали акушерский анамнез у женщин с абдоминальным родоразрешением. При этом болезни мочеполовой системы были зафиксированы у 16,9 % женщин в РФ против 26,3 % в Кировской области; акушерский анамнез, отягощенный преэклампсией средней степени тяжести, был зарегистрирован у 1,81 % женщин в РФ против 1,78 % в Кировской области; эклампсия во время беременности отмечена у 0,02 % женщин по показателям в РФ и только у 0,01 % – в Кировской области [7].

Представленные выше данные по РФ в целом и по Кировской области, как в отдельно взятом регионе, подтверждают актуальность изучения рисков развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения. В связи с этим на втором этапе исследования провели оценку клинико-лабораторных факторов риска, играющих значимую роль в развитии инфекции хирургической акушерской раны.

Для этого сначала проанализировали данные анамнеза жизни и анамнеза заболевания пациенток. В результате оценили возраст пациенток, количество родов в анамнезе, длительность госпитализации, наличие сопутствующих заболеваний до проведения операции кесарева сечения. В табл. 1 представлена оценка анамнестических факторов риска у пациенток после кесарева сечения.

Из данных, представленных в табл.1, следует, что статистически значимые различия между возрастом и количеством родов в исследуемых группах отсутствуют. Медианная длительность госпитализации составила 10 дней для 2-й группы и 6 дней для 1-й группы. В ходе исследования были выявлены достоверные отличия между группами по данному показателю ($p=0,003$).

При оценке клинических факторов риска во внимание принимали заболевания, зарегистрированные у женщин до беременности. Чаще всего в данном исследовании встречались такие заболевания, как железодефицитная анемия, гипотиреоз, ожирение, хронический цервицит. В табл. 2 представлена оценка клинических факторов риска у пациенток после кесарева сечения.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что в группе риска среди женщин Кировской области находятся пациентки с нарушениями гинекологического анамнеза, а именно с хроническим цервицитом ($p=0,0032$). Значимыми факторами риска для женщин Кировской области являются нарушения нарушениями общего обмена, а именно, ожирение ($p=0,0035$) и заболевания щитовидной железы ($p=0,0043$). Последний из рассматриваемых факторов риска скорее всего является следствием того, что Кировская область является эндемичным регионом по развитию йододефицитных состояний [9]. Достоверных отличий между исследуемыми группами по анализу железодефицитной анемии, как фактора риска, выявлено не было, что можно объяснить развивающейся во время беременности у пациенток 1-й группы анемии беременных.

Кроме того, проводили оценку лабораторных показателей у женщин после кесарева сечения, используя данные историй болезни. В первую очередь, сразу после операции анализировали развернутый анализ крови. В табл. 3 представлена оценка развернутого анализа крови у пациенток после кесарева сечения.

Анализ показателей, представленных в развернутом анализе крови, показал статистически достоверное различие между группами по уровню содержания в крови эритроцитов ($p=0,03$), лейкоцитов ($p=0,03$), нейтрофилов ($p=0,001$), лимфоцитов ($p=0,036$). В данном случае у пациенток с инфекцией хирургической акушерской раны отмечается сдвиг лейкоцитарной формулы влево, что подтверждает начало воспалительного процесса. Также отмечается снижение относительного количества лимфоцитов, клеток, ответствен-

Таблица 1

Оценка анамнестических факторов риска у пациенток после кесарева сечения

Показатели анамнеза	1 группа (n = 68)		2 группа (n = 71)		p*
	Me	IQR (25% – 75%)	Me	IQR (25% – 75%)	
Возраст, годы	26,50	19,87-33,12	27,00	22,00-32,50	0,390
Количество родов, число	1,00	1,00-2,00	1,00	1,00-2,00	0,440
Длительность госпитализации, дни	6,00	5,00-8,00	10,00	8,00-13,00	0,003

Примечание. Me – медиана; IQR – интерквартильный размах; * – различие с показателями 1-й группы статистически значимо ($p<0,05$).

ных за иммунный ответ, следствием чего может быть снижение продукции интерлейкинов [8].

Также оценивали биохимические показатели сыворотки крови у сравниваемых категорий женщин. В табл. 4 представлена оценка биохимических показателей, содержащихся в сыворотке крови у пациенток после кесарева сечения.

Анализ лабораторных данных показал статистически достоверное различие между сравниваемыми группами по

Таблица 2

Оценка клинических факторов риска у пациенток после кесарева сечения

Заболевание	Число случаев				p*
	1-я группа (n = 68)		2-я группа (n = 71)		
	Абс.	%	Абс.	%	
Ожирение	3,00	4,41	43,00	60,56	0,0035*
Железодефицитная анемия	46,00	67,40	57,00	80,30	0,1970
Хронический цервицит	13,00	19,10	36,00	50,70	0,0032*
Гипотиреоз	9,00	13,20	57,00	80,30	0,0043*
Гестационный сахарный диабет	0,00	0,00	9,00	12,60	0,2900
Артериальная гипертензия	0,00	0,00	7,00	9,90	0,1900

Примечание. * – различие с показателями 1-й группы статистически значимо ($p < 0,05$).

С-реактивному белку ($p < 0,05$), прокальцитонину ($p < 0,05$), ферритину ($p < 0,031$). Это не исключает риск развития послеоперационной инфекции хирургической акушерской раны в связи со значимым повышением данных показателей после операции кесарева сечения. В исследовании А.Т. Егоровой и соавт. [9] отмечено, что повышение С-реактивного белка в течение 8 ч после кесарева сечения коррелирует с повышением температуры тела пациентки и является маркером присоединения инфекции.

Что касается маркера присоединения бактериальной инфекции прокальцитонина, по данным Д.Р. Меджидовой [10], концентрация прокальцитонина менее 0,5 нг/мл позволяет исключить родильниц после кесарева сечения из группы высокого риска развития сепсиса и генерализации инфекции. Соответственно, повышение прокальцитонина более 0,5 нг/мл обосновывает выполнение бактериологических посевов из хирургической акушерской раны с целью предупреждения присоединения бактериальной инфекции и своевременного начала антибиотикотерапии.

Концентрацию ферритина в данном исследовании оценивали не только как острофазовый маркер, который достоверно повышался с С-реактивным белком и прокальцитонином. Концентрацию ферритина использовали, в том числе, для возможности оценки развития цитокинового шторма. По мнению А.Е. Агарева и соавт. [11] при воздействии повреждающего фактора провоспалительные цитокины стимулируют печень к выработке защитных белков, одним из которых является ферритин. Одновременно происходит усиление секреции ферритина макрофагами. Представленные данные обосновывают необходимость проведения исследований ферритина в динамике на фоне ведения женщин после кесарева сечения, с целью предупреждения генерализации инфекции.

Таблица 3

Оценка развернутого анализа крови у пациенток после кесарева сечения

Лабораторные показатели	1-я группа (n = 68)		2-я группа (n = 71)		p
	Me	IQR (25% – 75%)	Me	IQR (25% – 75%)	
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	3,00	2,25-3,75	3,66	3,00-4,00	0,033*
Гемоглобин, г/л **	$M \pm SE$	$107,82 \pm 3,81$	$M \pm SE$	$111,68 \pm 2,36$	0,223
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	273,50	205,13-341,85	320,00	240,00-400,00	0,07
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	9,00	6,75-11,25	16,56	13,36-21,40	0,031*
Нейтрофилы, %	56,15	42,50-73,20	83,73	62,70-104,60	0,001*
Эозинофилы, %	0,15	0,11-0,19	0,11	0,08-0,13	0,151
Моноциты, %	5,13	3,84-6,41	6,70	5,03-8,37	0,260
Лимфоциты, %	26,39	19,79-32,98	8,63	6,47-10,78	0,036*

Примечание. М – среднее значение; SE – стандартная ошибка среднего; * – различие с показателями 1-й группы статистически значимо ($p < 0,05$); ** – совокупность данных с нормальным распределением.

Таблица 4

Оценка биохимических показателей, содержащихся в сыворотке крови у пациенток после кесарева сечения

Лабораторные показатели	1-я группа (n = 68)		2-я группа (n = 71)		p
	Me	IQR (25% – 75%)	Me	IQR (25% – 75%)	
СРБ, мг/л	6,00	4,50-7,50	23,00	17,25-28,75	0,000004*
Прокальцитонин, нг/мл	0,30	0,22-0,37	7,00	5,25-8,75	0,0000037*
АЛТ, Ед/л	31,00	23,25-38,75	36,00	27,00-45,00	0,23
АСТ, Ед/л	34,50	25,87-43,13	35,00	26,25-43,75	0,27
Глюкоза, ммоль/л	4,15	3,11-5,18	4,65	3,48-5,81	0,33
Ферритин, мкг/л	57,15	42,86-71,43	235,36	176,52-294,2	0,031*

Примечание. * – различие с показателями 1-й группы статистически значимо ($p < 0,05$).

Бактериологический анализ проводили на основании оценки результатов посева материала, взятого из цервикального канала сразу после операции кесарева сечения. При анализе результатов учитывали только те микроорганизмы, рост которых на питательных средах был более 10^4 КОЕ /мл. По данным научных исследований концентрация условно-патогенных микроорганизмов должна быть 10^2 - 10^4 КОЕ /мл. Грибков *Candida* допускается до 10^3 КОЕ /мл. Превышение данных показателей указывает на инфицирование микроорганизмами, является диагностически и клинически значимым, требует определения чувствительности к антибиотикам с последующим проведением терапии [12–14].

Оценка возможных микробиологических факторов риска у пациенток с кесаревым сечением по результатам посевов из цервикального канала представлена в табл. 5.

Из данных, представленных в табл. 5, следует, что у 54 (76 %) пациенток с инфекцией хирургической акушерской раны после кесарева сечения были обнаружены условно-патогенные микроорганизмы в посевах из цервикального канала. В 19 случаях (26,8 %) был выявлен *Staphylococcus saprophyticus*, в 18 случаях (25,4 %) – *Escherichia coli*, в 13 случаях (18,3 %) – *Staphylococcus epidermidis*. В группе пациенток без инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения вышеперечисленные микроорганизмы отсутствовали.

Оценка возможных микробиологических факторов риска у пациенток после кесарева сечения по результатам посевов из шва на передней брюшной стенке представлены в табл. 6.

Таблица 5

Микробиологические факторы риска у пациенток с кесаревым сечением по результатам посевов из цервикального канала

Вид микроорганизма	Число случаев выделения микроорганизмов				p
	1-я группа (n = 68)		2-я группа (n = 71)		
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Escherichia coli</i> **	-	-	18	25,4	0,0054*
<i>Staphylococcus saprophiticus</i> **	-	-	19	26,8	0,005*
<i>Staphylococcus epidermidis</i> **	-	-	13	18,3	0,034*
<i>Proteus mirabilis</i> **	-	-	2	2,8	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	-	-	1	1,4	1
<i>Enterococcus faecalis</i> **	-	-	2	2,8	0,0041
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> **	-	-	1	1,4	1
<i>Streptococcus spp.</i> **	-	-	1	1,4	1
Микроорганизмы в посеве (всего)**	-	-	54	76,1	0,4*10 ⁻¹⁰ *

Примечание. * – различие с показателями 1-й группы статистически значимо ($p < 0,05$); прочерк – микроорганизмы не выделены; ** – интенсивность роста микроорганизмов, включенных в исследование составила $> 10^4$ КОЕ /мл.

Таблица 6

Микробиологические факторы риска у пациенток после кесарева сечения по результатам посевов из шва на передней брюшной стенке

Вид микроорганизма	Число случаев выделения микроорганизмов				p
	1-я группа (n=68)		2-я группа (n=71)		
	Абс.	%	Абс.	%	
<i>Escherichia coli</i> **	-	-	16	22,5	0,010*
<i>Staphylococcus saprophiticus</i> **	-	-	12	16,9	0,033*
<i>Streptococcus spp.</i> **	-	-	6	8,5	0,047*
<i>Enterococcus faecalis</i> **	-	-	4	5,6	0,057*
<i>Acinetobacter baumannii</i> **	-	-	5	7,0	0,33
<i>Citrobacter koseri</i> **	-	-	1	1,4	1
<i>Candida</i> **	-	-	4	5,6	0,057*
<i>Staphylococcus epidermidis</i> **	-	-	3	4,2	0,003
Микроорганизмы в посеве (всего)**	-	-	51	71,8	0,4*10 ⁻⁹ *

Примечание. * – различие с показателями 1-й группы статистически значимо ($p < 0,05$); прочерк – микроорганизмы не выделены; ** – интенсивность роста микроорганизмов, включенных в исследование составила $> 10^4$ КОЕ /мл.

Таблица 7

Результаты однофакторного регрессионного анализа по клиническим факторам риска у пациенток с кесаревым сечением

Показатели	ОШ	CI95%	p
Ожирение	0,54	0,18 1,76	0,29*
Хронический цервицит	0,43	0,13 1,69	0,27*
Гипотиреоз	0,57	0,17 1,68	0,24*

Примечание. CI95% – 95 % доверительный интервал; ОШ – отношение шансов; * – критическим уровнем статистической значимости различий (p) установлено значение $p < 0,05$.

Из данных, представленных в табл.6, следует, что у 51 пациентки с инфекцией хирургической акушерской раны после кесарева сечения (71,8 %) были обнаружены условно-патогенные микроорганизмы в посеве из раны. У 16 пациенток (22,5 %) обнаружена *Escherichia coli*, в 12 случаях (16,9 %) – *Staphylococcus saprophiticus*.

Для оценки факторов риска развития инфекции хирургической акушерской раны передней брюшной стенки после кесарева сечения на основании полученных результатов была проведена серия однофакторных логистических регрессионных анализов. Переменной отклика служило наличие или отсутствие инфекции хирургической акушерской раны на передней брюшной стенке (в виде бинарной переменной), а предикторами являлись все исследуемые факторы риска – как клинические, так и лабораторные. Результаты однофакторного регрессионного анализа по клиническим факторам риска у пациенток с кесаревым сечением представлены в табл. 7.

По результатам однофакторного регрессионного анализа клиническими факторами риска, ассоциированными с развитием инфекции хирургической акушерской раны на передней брюшной стенке у женщин Кировской области, стали: наличие ожирения, наличие хронического цервицита, наличие гипотиреоза (см. табл. 7). Результаты однофакторного регрессионного анализа по лабораторным факторам риска у пациенток с кесаревым сечением представлены в табл. 8.

По результатам однофакторного регрессионного анализа, представленного в табл. 8, лабораторными маркерами, ассоциированными с развитием инфекции хирургической акушерской раны на передней брюшной стенке у женщин Кировской области, были: содержание лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в крови, а также воспалительные лабораторные маркеры, а именно – С-реактивный белок, прокальцитонин и ферритин.

Обсуждение. Таким образом, при оценке состояния женщин после кесарева сечения на предмет риска развития инфекции хирургической акушерской раны, необходимо учитывать комплекс клинко-лабораторных факторов. Среди значимых клинических факторов риска развития инфекции хирургической акушерской раны со стороны общего анамнеза женщины выявлены заболевания, связанные с нарушением обмена веществ, а именно: ожирение и нарушение функции щитовидной железы. Со стороны гинекологического анамнеза – воспалительные заболевания половых путей до и во время беременности в виде цервицита и вагинита.

Среди лабораторных факторов, отражающих выраженность и динамику изменений в состоянии организма женщины с инфекцией хирургической акушерской раны и нуждаются в контроле, следует рассматривать развернутый анализ крови, СРБ, прокальцитонин.

С целью быстрого назначения эффективной антибактериальной терапии и для оценки контроля лечения необходимо

Таблица 8

Результаты однофакторного регрессионного анализа по лабораторным факторам риска у пациенток с кесаревым сечением

Показатели	ОШ	CI95%	p
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	1,77	0,98 3,38	0,07*
Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	1,05	0,10 3,37	0,39
Нейтрофилы, %	1,09	0,11 3,37	0,21*
Лимфоциты, %	1,02	1,00 1,05	0,11*
С-реактивный белок, мг/л	1,09	1,03 1,17	0,01*
Прокальцитонин, нг/мл	1,46	0,99 2,94	0,18*
Ферритин, мкг/л	1,01	0,99 1,04	0,26*

Примечание. * – различие с показателями 1-й группы статистически значимо ($p < 0,05$).

в динамике выполнять посевы биологического материала на чувствительность микроорганизмов к антибиотикам. Эффективность проводимого лечения также будет зависеть от иммунного статуса пациентки и грамотной его коррекции.

Заключение. Результаты исследования обосновали проблему развития инфекции хирургической акушерской раны после кесарева сечения для здравоохранения Кировской области, сравнимую с таковой для здравоохранения всей Российской Федерации.

Проведенный анализ клинико-лабораторных факторов риска показал целесообразность проведения комплексного анализа инфекции хирургической раны после кесарева сечения на ранней стадии ее развития с использованием современных методов диагностики. Данный подход будет способствовать более быстрому разрешению осложнений, сокращению длительности госпитализации женщин после кесарева сечения, а также сохранению в последующем репродуктивной функции женщины.

ЛИТЕРАТУРА

- Потапова М.В. Оптимизация интра- и послеоперационной антибиотикопрофилактики у женщин с рубцом на матке после кесарева сечения. Дисс. канд.мед.наук. Ростов-на-Дону; 2018.
- Ивашова О. Н., Лебедева О. П., Пахомов С. П. Антимикробные пептиды в патогенезе инфекционных осложнений в акушерстве и гинекологии. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2014; 5: 73–81.
- Мухлынина И.А., Тен А.Р., Якушев А.М. Инфекционные осложнения кесарева сечения. *Междисциплинарные исследования: опыт прошлого, возможности настоящего, стратегии будущего.* 2021; 4: 29–35.
- Клинические рекомендации «Септические осложнения в акушерстве», разработанные в соответствии со статьей 76 Федерального закона от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.
- Коробков Н.А. Клинико-бактериологическая характеристика послеродовых гнойно-воспалительных заболеваний. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2015; 4: 13–8.
- Рыбалка А.Н., Сулима А.Н., Яковчук Е.К., Дижла М.А. Хронический эндометрит: пути решения проблемы (обзор литературы). *Современная медицина: актуальные вопросы.* 2016; 4: 47–54.
- Основные показатели здоровья матери и ребенка, деятельность службы охраны детства и родовспоможения в РФ. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2021.
- Подгорная А.В., Махмудходжаев А.Ш., Кох Л.И., Михеенко Г.А., Юрьев С.Ю. Неспецифический иммунитет влагалища у беременных женщин с рецидивирующим бактериальным вагинозом. *Современные проблемы науки и образования.* 2017; 1: 14–9.
- Егорова А.Т., Глебова Т.К., Маисеенко Д.А., Шапошникова Е.В. Гнойно-воспалительные осложнения в акушерской практике (по материалам краевой клинической больницы г. Красноярска). *Сибирское медицинское обозрение.* 2015; 4: 94–7.
- Меджидова Д.Р., Маршалов Д.В., Петренко А.П., Шифман Е.М. Периоперационные и отдаленные осложнения при кесаревом сечении: систематический обзор. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2020; 1: 78–84.
- Агарев А.Е., Здолик Т.Д., Коваленко М.С., Зотов В.В. Прогнозирование развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, у родильниц. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.* 2017; 25 (4): 565–74.
- Болдырева М.Н., Липова Е.В., Алексеев Л.П., Витвицкая Ю.Г., Гуськова И. А. Характеристика биоты урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в режиме реального времени. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2019; 8 (6): 36–42.
- Плотко Е.Э., Ворошилина Е.С., Хаютин Л.В., Абакумова Е.И., Тумбинская Л.В., Донников А.Е. Репродуктивное поведение женщины и состояние биоценоза влагалища. *Уральский медицинский журнал.* 2013; 10 (64): 150–4.
- Шипицына Е.В., Мартикайнен З.М., Воробьева Н.Е., Ермошкина М.С., Степанова О.С., Донников А.Е. и др. Применение теста Фемофлор для оценки микробиоценоза влагалища. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2016; 3: 38–44.
- Potapova M.V. Optimization of intra- and postoperative antibiotic prophylaxis in women with uterine scar after caesarean section. Diss.... Rostov-na-Donu; 2018. (in Russian)
- Ivashova O. N., Lebedeva O. P., Paxomov S. P. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of infectious complications in obstetrics and gynecology. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2014; 5: 73–81. (in Russian)
- Mukhly'nina I.A., Ten A.R., Yakushev A.M. Infectious complications of caesarean section. *Mezhdistsiplinarnye issledovaniya: opyt' proshlogo, vozmozhnosti nastoyashchego, strategii budushchego.* 2021; 4: 29–35. (in Russian)
- Clinical guidelines «Septic complications in obstetrics», developed in accordance with Article 76 of the Federal Law of November 21, 2011 No. 323-FE «On the basics of public health protection in the Russian Federation». Moscow: GEOTAR-Media; 2017. (in Russian)
- Korobkov N.A. Clinical and bacteriological characteristics of postpartum purulent-inflammatory diseases. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2015; 4: 13–8. (in Russian)
- Rybalka A.N., Sulima A.N., Yakovchuk E.K., Dizha M.A. Chronic endometritis: solutions to the problem (literature review). *Sovremennaya meditsina: aktual'nye voprosy.* 2016; 4: 47–54. (in Russian)
- Main indicators of maternal and child health, the activities of the child protection and obstetric service in the Russian Federation [Osnovnye pokazateli zdorov'ya materi i rebyonka, deyatel'nost' sluzhby okhrany detstva i rodovspomozheniya v RF. Sbornik]. Moscow: GEOTAR-Media; 2021. (in Russian)
- Podgornaya A.V., Makhmuthodzhaev A.Sh., Koh L.I., Mikhchenko G.A., Yur'ev S.Yu. Nonspecific vaginal immunity in pregnant women with recurrent bacterial vaginosis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2017; 1: 14–9. (in Russian)
- Egorova A.T., Glebova T.K., Maisenko D.A., Shaposhnikova E.V. Purulent-inflammatory complications in obstetric practice based on materials from the regional clinical hospital in Krasnoyarsk. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie.* 2015; 4: 94–7. (in Russian)
- Medzhidova D.R., Marshalov D.V., Petrenko A.P., Shifman E.M. Perioperative and long-term complications of caesarean section: a systematic review. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2020; 1: 78–84. (in Russian)
- Agarev A.E., Zdol'nik T.D., Kovalenko M.S., Zotov V.V. Predicting the development of healthcare-associated infections in puerperas. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik im. akad. I.P. Pavlova.* 2017; 25 (4): 565–74. (in Russian)
- Boldyreva M.N., Lipova E.V., Alekseev L.P., Vitvitskaya I.U., Gus'kova I.A. Characterization of the biota of the urogenital tract in women of reproductive age by real-time PCR. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2019; 8 (6): 36–42. (in Russian)
- Plotko E.E., Voroshilina E.S., Khaiutin L.V., Abakumova E.I., Tumbinskaya L.V., Donnikov A.E. Reproductive behavior of a woman and the state of the biocenosis of the vagina. *Uralskiy meditsinskiy zhurnal.* 2013; 10 (64): 150–4. (in Russian)
- Shipitsyna E.V., Martikainen Z.M., Vorob'eva N.E., Ermoshkina M.S., Stepanova O.S., Donnikov A.E. et al. The use of the Femoflor test to assess the microbiocenosis of the vagina. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2016; 3: 38–44. (in Russian)

МИКРОФЛОРА МОКРОТЫ И АУТОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА ПАЦИЕНТОВ С COVID-19

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Стремительное распространение новой коронавирусной инфекции актуализирует потребность проведения бактериологических исследований клинического материала, полученного из респираторного тракта пациентов с COVID-19. Проанализировано 230 образцов мокроты и 260 образцов аутопсийного материала лёгких от пациентов с COVID-19. Выделено 946 штаммов микроорганизмов, видовая идентификация которых проводилась с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker®). По результатам бактериологических посевов мокроты выявлено преобладание грамположительных микроорганизмов, составивших 50,5% (222 штамма) от общего числа выделенных патогенов. Доминирующими в данной группе оказались представители нормальной микрофлоры слизистых оболочек человека из родов *Streptococcus*, *Rothia*, *Lactobacillus* (всего 109 штаммов), что может являться следствием неправильного сбора мокроты, обусловленного загрязнением материала большим количеством слюны и носоглоточного отделяемого. «Классические» грамположительные возбудители пневмоний выявлялись значительно реже: *S. aureus* в 5 случаях, *S. pneumoniae* у 6 пациентов. Микроорганизмы из порядка *Enterobacterales* представлены 42 штаммами, среди которых лидировали *K. pneumoniae* (27 штаммов). В группе неферментирующих грамотрицательных бактерий преобладал *A. baumannii* (29 штаммов), в 2 случаях идентифицирована *P. aeruginosa*. По результатам микробиологического исследования аутопсийного материала (лёгкие) больных COVID-19 были выявлены значительные отличия видового и количественного состава микрофлоры, по сравнению с мокротой. В группе грамположительных бактерий идентифицировано 15 штаммов представителей нормальной микрофлоры слизистых оболочек, среди грамотрицательных бактерий доминировали клинически значимые виды: *K. pneumoniae* (102 штаммов), *A. baumannii* (75 штаммов), *P. aeruginosa* (11 штаммов). Микробиологический мониторинг необходим для коррекции антибактериальной терапии и предотвращения осложнений в виде развития вторичной бактериальной инфекции. В случае летального исхода результаты микробиологического анализа аутопсийного материала могут быть использованы в качестве дополнительного критерия для установления причины смерти пациента.

Ключевые слова: COVID-19; коронавирусная инфекция; бактериальные осложнения; микрофлора; пневмония.

Для цитирования: Максимова Е.А., Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Золотов М.О. Микрофлора мокроты и аутопсийного материала пациентов с COVID-19. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 380-384. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-380-384>

Для корреспонденции: Козлов Андрей Владимирович, ст. преподаватель каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: kozlov.biochemistry@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.04.2022

Принята к печати 25.04.2022

Опубликовано 20.06.2022

Maksimova E.A., Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusiakova O.A., Zolotov M.O.

MICROFLORA OF SPUTUM AND AUTOPSY MATERIAL OF PATIENTS WITH COVID-19

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

The rapid spread of a new coronavirus infection in the country actualizes the conduct of bacteriological studies of clinical material obtained from the respiratory tract of patients with COVID-19. During the experiments, 230 sputum samples and 260 autopsy lung samples from patients with COVID-19 were analyzed. 946 high-risk strains were isolated and identified by MALDI-ToF mass spectrometry on a Microflex LT instrument (Bruker®). According to the results of bacteriological cultures of sputum, a predominance of gram-positive ones was revealed, amounting to 50.5% (222 strains) of the total number of isolated pathogens. However, falling into this group is manifested by natural representatives of the microflora of the human mucous membranes from the genera *Streptococcus*, *Rothia* and *Lactobacillus* (109 strains in total), which can be manifested by the detection of improper sputum collection, causing contamination by the substance of intense salivation and nasopharyngeal discharge. In turn, the "classic" gram-positive causative agents of pneumonia were detected much less frequently: *S. aureus* in 5 cases, *S. pneumoniae* in 6 patients. The causative agents in the order *Enterobacterales* are represented by 42 strains, among which the most likely species are *K. pneumoniae* (27 strains). In the group of non-fermenting gram-negative bacteria, *A. baumannii* (29 strains) prevailed, and *P. aeruginosa* was also identified in 2 cases. When analyzing the results of a microbiological study of autopsy material (lungs) of patients with COVID-19, significant differences in the qualitative and quantitative composition of the microflora were revealed, compared with sputum. In the group of gram-positive bacteria, 15 strains of the natural microflora of the mucous membranes were identified, while sensitive species dominated among gram-negative pathogens: *K. pneumoniae* (102 strains), *A. baumannii* (75 strains), *P. aeruginosa* (11 strains). Regular microbiological monitoring is essential for antibiotic therapy and prevention of secondary bacterial infection. In the event of a fatal outcome, the results of microbiological analysis of autopsy material can determine the cause of death of the patient.

Key words: COVID-19; coronavirus infection; bacterial complications; microflora; pneumonia.

For citation: Maksimova E.A., Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusiakova O.A., Zolotov M.O. Microflora of sputum and autopsy material of patients with COVID-19. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (6): 380-384 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-380-384>

For correspondence: Kozlov Andrey Vladimirovich, senior lecturer of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics; e-mail: kozlov.biochemistry@yandex.ru

Information about authors:

Maksimova E.A., <https://orcid.org/0000-0003-1777-8620>;
Kozlov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-9384-6854>;
Lyamin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>;

Zhestkov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3960-830X>;
Gusyakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>;
Zolotov M.O., <https://orcid.org/0000-0002-4806-050X>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 14.04.2022

Accepted 25.04.2022

Published 20.06.2022

Введение. Вторичная бактериальная инфекция является частым осложнением заболеваний вирусной этиологии и может стать причиной летального исхода. Присоединение бактериальной микрофлоры принято считать редким осложнением течения новой коронавирусной инфекции (COVID-19), но количество случаев выявления пневмоний бактериальной этиологии у пациентов с COVID-19 постоянно растёт [1, 2]. Видовое разнообразие выделяемых при этом микроорганизмов, их значение в развитии осложнений и влияние на исход COVID-19 остаются недостаточно изученными. На территории Российской Федерации антибактериальная терапия пациентам с COVID-19 назначается эмпирически, согласно временным методическим рекомендациям. Одним из критериев для обоснования антибактериальной терапии является выявление лабораторных признаков инфекций бактериального генеза (лейкоцитоз, появление гнойной мокроты, повышение уровня прокальцитонина в крови), но без обязательного микробиологического обследования, что исключает этиологическую расшифровку вторичных инфекций бактериальной этиологии и может являться одним из факторов развития их антибиотикорезистентности¹.

Перемещение пациентов между отделениями одного стационара, а также между различными лечебно-профилактическими учреждениями, циркуляция внутрибольничных штаммов, нерациональная антибиотикотерапия, коморбидные состояния больных – это лишь часть факторов, определяющих формирование особого микробиологического пейзажа в стационарах и отделениях, перепрофилированных под лечение новой коронавирусной инфекции. Спектр возбудителей пневмоний у пациентов с COVID-19 разнообразен [3, 4]. Преимущественно из мокроты выделяют «классические» бактериальные возбудители инфекций респираторного тракта – *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* [5, 6]. Часто отмечают развитие пневмоний, вызванное представителями порядка *Enterobacterales* (*Klebsiella pneumoniae*) и неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВ), такими как *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*. Среди прочих регулярно выделяемых микроорганизмов описаны *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecium*. Растёт частота встречаемости осложнений в виде инвазивных микозов, вызванных различными видами грибов рода *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. auris*, *C. glabrata*, *C. krusei*) и микромицет родов *Aspergillus* и *Mucor* [7-10]. В значительном числе случаев причиной ухудшения состояния и смертности пациентов при COVID-19 является присоединение вторичной микрофлоры с развитием различных осложнений бактериальной этиологии, в частности пневмонии.

Цель исследования: проанализировать видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из мокроты и аутопсийного материала у больных COVID-19, сравнить результаты прижизненного микробиологического исследования мокроты и аутопсийного материала лёгких у лиц с новой коронавирусной инфекцией.

Материал и методы. В период с апреля 2020 г. по апрель 2021 г. в ходе бактериологического исследования на

базе микробиологического отдела клинко-диагностической лаборатории Клиник Самарского ГМУ проанализировано 230 образцов мокроты от пациентов, находящихся на стационарном лечении, 260 образцов аутопсийного материала лёгких. Исследуемый материал поступал от пациентов с диагнозом по международной классификации болезней 10 пересмотра – U07.1 (коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован) и U07.2 (коронавирусная инфекция COVID-19, вирус не идентифицирован). Постановка диагноза проводилась с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), в ходе которого проводилась детекция РНК вируса SARS-CoV-2 в образцах из носоглотки, по клинко-эпидемиологическим и рентгенологическим критериям. Госпитализированные пациенты имели различную степень тяжести заболевания от среднетяжёлой до крайне тяжёлой с дыхательной недостаточностью.

Взятие материала с дальнейшей транспортировкой в бактериологическую лабораторию проводились в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» (2005 г.). После стандартной пробоподготовки исследуемые пробы засеивали на плотные питательные среды: универсальную хромогенную среду (Bio-Rad, США), 5% кровяной агар (HiMedia, Индия), шоколадный агар (HiMedia, Индия), агар Сабуро (HiMedia, Индия). В течение 48 ч проводилось культивирование с соблюдением аэробных условий при температуре 37°С, чашки с шоколадным агаром инкубировали в микроаэрофильных условиях с использованием CO₂-инкубатора. Идентификация выросших микроорганизмов осуществлялась с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Результаты. Выделено и идентифицировано 946 штаммов микроорганизмов, из них 440 выявлено при исследовании мокроты и 506 в аутопсийном материале. В 24 образцах мокроты и в 8 образцах аутопсийного материала роста микрофлоры не выявлено.

Анализируя видовое разнообразие микрофлоры, выделенной из мокроты, принято решение разделить микроорганизмы на группы: грамположительные бактерии (222 штаммов, 50,5% от общего числа выявленных в мокроте патогенов); 42 штамма микроорганизмов порядка *Enterobacterales* (9,6%); 41 штамм НГОВ (9,3%); 8 штаммов прочих грамотрицательных бактерий (1,8%); 127 штаммов грибов (28,8%). Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из мокроты от пациентов с COVID-19, представлено на рис. 1.

Среди грамположительных микроорганизмов преобладали представители рода *Streptococcus*, выделенные в количестве 97 штаммов, что составило 43,7% от всей доли грамположительных бактерий. Преимущественно идентифицированы виды, относящиеся к нормальной микрофлоре слизистых оболочек: *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus salivarius*. Из клинически значимых микроорганизмов выявлен только *S. pneumoniae*, идентифицированный в 6 случаях, что составило 6,2% от числа стрептококков и 1,4% от общего числа выделенных из мокроты микроорганизмов.

Стафилококки выявлены в количестве 65 штаммов (29,3% от общего числа грамположительных микроорганиз-

¹Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 14 (27.12.2021 г.).

мов). Большинство *Staphylococcus* spp. (92,3%) представлено коагулазонегативными видами: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*. *S. aureus* выделен в 5 случаях (7,7% от общего количества стафилококков).

Род *Enterococcus* представлен 42 штаммами, что составило 18,9% от всех грамположительных микроорганизмов. На сегодняшний день недостаточно информации о значении данных микроорганизмов в развитии инфекционно-воспалительного процесса в лёгких [11].

Среди грамположительных микроорганизмов выделены представители нормальной микрофлоры: 15 штаммов *Rothia* spp., 3 штамма *Lactobacillus* spp., которые в совокупности составили долю в 8,1% в группе.

Среди возбудителей из порядка *Enterobacterales* доминирующим родом оказался *Klebsiella* spp., выявленный в количестве 30 штаммов, что составило 71,4% от общего числа энтеробактерий. Приоритетный патоген *Klebsiella pneumoniae* идентифицирован в количестве 27 штаммов. Виды *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola* представлены 2 и 1 штаммами соответственно.

Прочие представители порядка *Enterobacterales* представлены 10 штаммами *Escherichia coli* и 2 штаммами рода *Enterobacter*, что в совокупности составило долю 28,6% в своей группе.

Анализируя группу НГОБ, выявлено, что на первом месте по частоте встречаемости определялся род *Acinetobacter*, представленный 30 штаммами, 29 из которых идентифицированы как *Acinetobacter baumannii* – клинически и эпидемиологически значимый вид. 1 штамм идентифицирован как *Acinetobacter pittii*. Другие микроорганизмы из группы НГОБ были представлены 2 штаммами *Pseudomonas aeruginosa*, 7 штаммами *Pseudomonas putida*, единичными штаммами *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas gessardii*.

К прочим грамотрицательным бактериям отнесены представители нормальной микрофлоры рода *Neisseria*: 6 штаммов *Neisseria subflava* и 2 штамма *Neisseria flavescens*.

Большую часть идентифицированных грибов составили *Candida* spp. – выделено 124 штамма, (97,6% в группе). Видовой спектр представлен *C. albicans* (112 штаммов), *C. lusitanae* (6 штаммов), *C. kefyr* (4 штаммов), *C. tropicalis* (2 штаммов). Представитель другого рода грибов – *Magnusiomyces capitatus* выделен в 3 случаях (2,4% в группе грибов).



Рис. 1. Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из мокроты пациентов с COVID-19 (в %).

По аналогии с исследованием мокроты микроорганизмы, выделенные из аутопсийного материала (лёгкие) были разделены на группы: 174 штамма грамположительных бактерий (34,4% от общего числа выделенных из аутопсийного материала микроорганизмов); 132 штамма представителей порядка *Enterobacterales* (26,1%); 120 штаммов НГОБ (23,7%); 80 штаммов грибов (15,8%). Видовой спектр микроорганизмов, выделенных из аутопсийного материала от пациентов с COVID-19, представлен на рис. 2.

Среди грамположительных бактерий доминирующими оказались микроорганизмы из *Enterococcus* spp., выделенные в количестве 149 штаммов, что составило долю в 85,6% в группе. Преобладающим видом *Enterococcus faecalis*, идентифицированным в 142 случаях (81,6% от общего числа грамположительных бактерий), 7 штаммов – *Enterococcus faecium*. Среди прочих грамположительных микроорганизмов выделены 9 штаммов *S. haemolyticus*, 1 штамм *S. pneumoniae*. Выделено незначительное количество представителей нормальной орофарингеальной микрофлоры, по сравнению с результатом исследования мокроты: 11 штаммов рода *Streptococcus* и 4 штамма из *Rothia* spp.

В группе патогенов порядка *Enterobacterales*, выделенных из аутопсийного материала наибольшее количество составил род *Klebsiella*: идентифицировано 105 штаммов, 102 из которых являлись клинически значимым видом *K. pneumoniae* (77,3% от всех выделенных представителей порядка *Enterobacterales*). 3 штамма относились к виду *Klebsiella variicola*. Среди прочих родов микроорганизмов в данной группе выявлены *Enterobacter* spp.: 14 штаммов *E. cloacae*, по 2 штамма *E. aerogenes* и *E. kobei*. В группе *Enterobacterales* идентифицировано 3 штамма *E. coli*, по 1 штамму: *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Leclercia adecarboxylata*, *Raoultella ornithinolytica*.

Среди НГОБ преобладал род *Acinetobacter* – 84 штамма (70% от общего числа НГОБ). Наиболее часто обнаруживался *A. baumannii* – 75 штаммов, имеющий важное клиническое и эпидемиологическое значение. 9 штаммов рода *Acinetobacter* идентифицированы как *A. ursingii*, *A. lwoffii*, *A. townnerii*, *A. johnsonii*.

Следующим по частоте встречаемости среди НГОБ оказался род *Pseudomonas*, представленный 28 штаммами, среди которых *P. aeruginosa* была выделена в 11 случаях (9,2% от общего числа НГОБ). Выделены другие *Pseudomonas* spp.: *P. putida* (11 штаммов), *P. fulva* (6 штаммов).

В числе прочих НГОБ идентифицированы 5 штаммов *Stenotrophomonas maltophilia*, по 1 штамму *Delftia acidovorans*, *Paracoccus yeei*, *Chryseobacterium indologenes*.

Среди грибов выявлены только представители рода *Candida* в количестве 80 штаммов. Преобладал вид *C. albicans*, выделенный в количестве 69 штаммов (86,2% грибов). *C. kefyr* выявлена в количестве 5 штаммов, идентифицировано по 2 штамма *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *C. glabrata*.

Обсуждение. Выявлено достоверное различие при сравнении микрофлоры, выделенной из мокроты и аутопсийного материала от пациентов с COVID-19 ($p < 0,005$) (см. таблицу).

При анализе видового разнообразия выделенных микроорганизмов обращает на себя внимание выявление большого количества представителей нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей и полости рта в мокроте, что на наш взгляд, связано с нарушением правил преаналитического этапа микробиологического исследования. Для больных новой коронавирусной инфекцией характерен редкий, малопродуктивный кашель с вязкой мокротой, что вызывает большие трудности у медперсонала и пациентов при сборе материала. Развитие гипоксии и вследствие этого необходимость постоянной кислородной поддержки через лицевую маску или посредством неинвазивной вентиляции лёгких затрудняют проведение гибкой бронхоскопии, при которой возможно выполнение брон-

хоальвеолярного лаважа и его микробиологическое исследование [12].

В бактериологической службе перед микробиологическим исследованием мокроты рекомендуется проводить оценку поступившего материала в соответствии с руководством по лабораторным методам диагностики по следующей схеме: мазок мокроты, предварительно окрашенный по Граму, анализируют методом микроскопии под малым увеличением микроскопа. Признаками качественно собранной мокроты являются преобладание в ней лейкоцитов над эпителиальными клетками, присутствие бактерий одного вида внутри лейкоцитов либо вокруг них [13]. В условиях работы с биоматериалом от пациентов с COVID-19, в лабораториях отсутствует возможность проведения микроскопии всех образцов поступившей мокроты, в связи с чем, необходим альтернативный способ оценки качества преаналитического этапа.

Следствием сложности в оценке качества поступившего материала является проведение бактериологических исследований биологического материала, собранного с нарушением преаналитического этапа. Данный факт является определяющим этиологическую диагностику и не позволяет вовремя выявить возникновение осложнений бактериального генеза и скорректировать антибактериальную терапию. При оценке результатов микробиологических исследований появляется значительное расхождение в спектре микрофлоры, когда при исследовании мокроты доминирующими являются представители нормальной орофарингеальной микрофлоры, а при исследовании аутопсийного материала, клинически и эпидемиологически значимые штаммы, с приобретенными механизмами резистентности к целым группам противомикробных препаратов.

Различия в спектре микрофлоры могут быть обусловлены степенью тяжести заболевания. Дыхательные пути пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), находящихся на искусственной вентиляции лёгких, быстро колонизируются как индигенной микрофлорой слизистых оболочек верхних дыхательных путей, так и микрофлорой окружающей среды ОРИТ. Более частое статистически значимое обнаружение таких микроорганизмов, как *K. pneumoniae* и *A. baumannii* в аутопсийном материале, может быть связано с внутрибольничным инфицированием в ОРИТ [6, 14-18].

Приоритетными патогенами пневмонии у больных COVID-19 являются *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *H. influenza*, грибы рода *Candida*, что, в целом, сопоставимо с полученными нами результатами [19-22]. Ряд

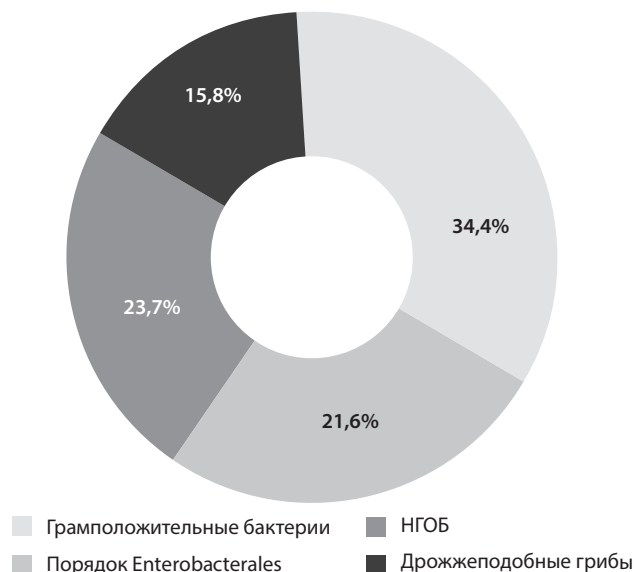


Рис. 2. Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из аутопсийного материала (лёгкие) пациентов с COVID-19 (в %).

патогенов, например, пневмококк, отмечены как приоритетные для вторичных пневмоний при вирусных инфекциях, однако в нашем исследовании данный патоген выявлен в единичных случаях [5,23-25]. Можно отметить возросшую роль грамотрицательной микрофлоры как доминирующего возбудителя вторичной инфекции у пациентов с COVID-19, что требует коррекции стартовой антибиотикотерапии в условиях ковид-госпиталей.

Заключение. Различия в спектре микрофлоры мокроты и аутопсийного материала лёгочной ткани подтверждают особую сложность в работе микробиологической лаборатории в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции. Немаловажным становится постаналитический этап микробиологических исследований и консультативная помощь врача-бактериолога, что позволяет определить клиническое значение выделенных микроорганизмов и оценить качество взятия анализируемого материала в случае выявления боль-

Микрофлора мокроты и аутопсийного материала (лёгких) у пациентов с COVID-19

Вид	Количество штаммов, выделенных из мокроты	Доля пациентов (%)	Количество штаммов выделенных из аутопсийного материала	Доля пациентов (%)	χ^2 Пирсона	Уровень значимости
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	34	15,0	9	3,5	19,539	<0,001
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16	7,0	2	0,80	13,203	<0,001
<i>Streptococcus oralis</i>	35	15,0	2	0,80	36,494	<0,001
<i>Streptococcus salivarius</i>	13	10,0	1	0,40	12,201	<0,001
<i>Streptococcus vestibularis</i>	21	9,0	1	0,40	21,769	<0,001
<i>Rothia mucilaginosa</i>	15	7,0	1	0,40	14,552	<0,001
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	2,6	1	0,40	4,287	0,039
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,2	14	5,30	10,076	0,002
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	27	12,0	102	39,20	47,556	<0,001
<i>Escherichia coli</i>	10	4,0	3	1,15	4,821	0,029
<i>Acinetobacter baumannii</i>	29	12,6	75	28,80	19,245	<0,001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	1,0	11	4,20	5,339	0,021
<i>Candida albicans</i>	69	26,5	112	49,0	25,721	<0,001
<i>Enterococcus faecalis</i>	21	9,0	142	54,60	113,736	<0,001
<i>Enterococcus faecium</i>	21	9,1	7	0,80	19,072	<0,001

шого количества представителей нормальной микрофлоры слизистых оболочек. Необходим микробиологический мониторинг клинического материала от пациентов в динамике для своевременного выявления возбудителей и коррекции антибактериальной терапии. В случае отсутствия бактериального патогена не рекомендуется назначение антибактериальных препаратов без клинических и диагностических признаков бактериальной пневмонии для профилактики.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 7-12, 16-24 см. REFERENCES)

5. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н. и др. 3-е издание, исправленное. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
6. Миронов А. Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А. Условно-патогенные микроорганизмы при заболеваниях дыхательных путей у больных региона Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 1: 81-4.
13. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
14. Лызикова Т.В., Нагла М.Ю., Makeev I.G. Микробиологический мониторинг как основа эффективной антибактериальной терапии госпитальной пневмонии. *Universum: медицина и фармакология*. 2021; 12(83): 5-10.
15. Авдеева М.Г., Кулбужева М.И., Зотов С.В., Журавлева Е.В., Яцуква А.В. Микробный пейзаж у госпитальных больных с новой коронавирусной инфекцией COVID-19, сравнительная антибиотикорезистентность с «доковидным» периодом: проспективное исследование. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2021; 28(5): 14-28.
25. Визель А.А., Абдулганиева Д.И., Федотов В.Д. Жестков А.В., Хамитов Р.Ф., Костина Н.Э. и др. Оценка прогностической значимости отдельных показателей у пациентов с COVID-19 на различных этапах наблюдения. *Практическая пульмонология*. 2021; 2: 29-40.

REFERENCES

1. Lansbury L., Lim B., Baskaran V., Lim W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of infection*. 2020; 81(2): 266-75. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.05.046.
2. Wan S., Xiang Y., Fang W., Zheng Y., Li B., Hu Y. et al. Clinical features and treatment of COVID-19 patients in northeast Chongqing. *Journal of medical virology*. 2020; 92(7): 797-806. DOI: 10.1002/jmv.25783.
3. Fattorini L., Creti R., Palma C., Pantosti A. Bacterial coinfections in COVID-19: an underestimated adversary. *Ann. Ist Super Sanita*. 2020; 56(3): 359-64. DOI: 10.4415/ANN_20_03_14.
4. Sreenath K., Batra P., Vinayaraj E.V., Bhatia R., SaiKiran K., Singh V. et al. Coinfections with Other Respiratory Pathogens among Patients with COVID-19. *Microbiology spectrum*. 2021; 9(1): e0016321. DOI: 10.1128/Spectrum.00163-21.
5. Medical microbiology, virology and immunology: A textbook for students of medical universities. Vorobyov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N. et al. 3rd ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian)
6. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'ev A.A. Opportunistic pathogens in diseases of the respiratory tract in patients with the region of the Moscow region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 1: 81-4. (in Russian)
7. Sharifpour E., Shams S., Esmkhani M., Khodadadi J., Fotouhi-Ardakani R., Koohpaei A. et al. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infectious Diseases*. 2020; 20(1): 646. DOI: 10.1186/s12879-020-05374-z.
8. Koehler P., Cornely O.A., Böttiger B.W., Dusse F., Eichenauer D.A., Fuchs F. et al. COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2020; 63(6): 528-34. DOI: 10.1111/myc.13096.
9. van Arkel A.L.E., Rijpsstra T.A., Belderbos H.N.A., van Wijngaarden P., Verweij P.E., Bentvelsen R.G. COVID-19-associated Pulmonary Aspergillosis. *American journal of respiratory*

- and critical care medicine. 2020; 202(1): 132-5. DOI: 10.1164/rccm.202004-1038LE.
10. Rawson T.M., Moore L., Zhu N., Ranganathan N., Skolimowska K., Gilchrist M. et al. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020; 71(9): 2459-68. DOI:10.1093/cid/ciaa530.
11. Rosas-Salazar C., Kimura K.S., Shilts M.H., Strickland B.A., Freeman M.H., Wessinger B.C. et al. SARS-CoV-2 infection and viral load are associated with the upper respiratory tract microbiome. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2021; 147(4): 1226-33. e2. DOI:10.1016/j.jaci.2021.02.001.
12. Rahman S., Montero M., Rowe K., Kirton R., Kunik F. Jr. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert review of clinical pharmacology*. 2021; 14(5): 601-21. DOI:10.1080/17512433.2021.1902303.
13. Kishkun A.A. Guidelines for laboratory diagnostic methods. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. (in Russian)
14. Lyzikova T.V., Nagla M.Yu., Makeev I.G. Microbiological monitoring as a basis for effective antibacterial therapy of hospital pneumonia. *Universum: meditsina i farmakologiya*. 2021; 12(83): 5-10. (in Russian)
15. Avdeeva M.G., Kulbuzheva M.I., Zotov S.V., Zhuravleva E.V., Yatsukova A.V. Microbial landscape in hospital patients with a new coronavirus infection COVID-19, comparative antibiotic resistance with a "pre-covid" period: a prospective study. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 2021; 28(5): 14-28. (in Russian)
16. Montrucchio G., Corcione S., Sales G., Curtoni A., De Rosa F.G., Brazzi L. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in ICU-admitted COVID-19 patients: Keep an eye on the ball. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2020; 23: 398-400. DOI:10.1016/j.jgar.2020.11.004.
17. Lai C.C., Wang C.Y., Hsueh P.R. Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2020; 53(4): 505-12. DOI:10.1016/j.jmii.2020.05.013.
18. O'Toole R.F. The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2021; 27(12): 1772-6. DOI:10.1016/j.cmi.2021.06.001.
19. Hughes S., Troise O., Donaldson H., Mughal N., Moore L. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2020; 26(10): 1395-9. DOI:10.1016/j.cmi.2020.06.025.
20. Chen X., Liao B., Cheng L., Peng X., Xu X., Li Y. et al. The microbial coinfection in COVID-19. *Applied microbiology and biotechnology*. 2020; 104(18): 7777-85. DOI: 10.1007/s00253-020-10814-6.
21. Zhong H., Wang Y., Shi Z., Zhang L., Ren H., He W. et al. Characterization of respiratory microbial dysbiosis in hospitalized COVID-19 patients. *Cell discovery*. 2021; 7(1): 23. DOI: 10.1038/s41421-021-00257-2.
22. Westblade L.F., Simon M.S., Satlin M.J. Bacterial Coinfections in Coronavirus Disease 2019. *Trends in microbiology*. 2021; 29(10): 930-41. DOI: 10.1016/j.tim.2021.03.018.
23. Lewnard J.A., Bruxvoort K.J., Fischer H., Hong V.X., Grant L.R., Jódar L. et al. Prevention of COVID-19 among older adults receiving pneumococcal conjugate vaccine suggests interactions between *Streptococcus pneumoniae* and SARS-CoV-2 in the respiratory tract. *The Journal of infectious diseases*. 2021; jia128. Advance online publication. DOI: 10.1093/infdis/jia128.
24. Anton-Vazquez V., Clivillé R. *Streptococcus pneumoniae* coinfection in hospitalised patients with COVID-19. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2021; 40(6): 1353-55. DOI: 10.1007/s10096-021-04166-w.
25. Vazel' A.A., Abduganieva D.I., Fedotov V.D. Zhestkov A.V., Khamitov R.F., Kostina N.E. Evaluation of the prognostic significance of individual indicators in patients with COVID-19 at various stages of observation. *Prakticheskaya pul'monologiya*. 2021; 2:29-40. (in Russian)