

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

Δ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 67
3 • 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

МАРТ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 02.03.2022.
Подписано в печать 15.03.2022. Формат
60 × 88¹/₈.
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 издania не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

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

Индекс 71442 — для подписчиков

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

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 3. 129–192.

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 (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 67

3 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MARCH

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY, 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. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гаранина В.Д., Горбатенко Е.А., Щербинина А.Е., Жмуров Д.В., Жмуров В.А., Гапон Л.И., Галеева Н.А., Авдеева К.С., Капустина А.А., Ярославская Е.И.*
Перспективный анализ лабораторных параметров крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию. 133
- Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О.*
Бета-коронавирусы и эндокринная система человека: новые данные (обзор литературы). 140

ИММУНОЛОГИЯ

- Петрова О. В., Твердохлебова Д. К.*
Наличие и количество антител после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак 147
- Бухарин О.В., Кузьмин М.Д., Перунова Н.Б., Никифоров И.А., Чайникова И.Н., Иванова Е.В.*
Диагностический цитокиновый маркер бесплодия мужчин – интерлейкин 4 151

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Шипицына И. В., Осипова Е. В.*
Эффективность цефалоспоринов в отношении энтеробактерий, изолированных от пациентов с хроническим остеомиелитом. 158
- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Чичановская Л.В., Ганзя Д.В., Григорьяни Э.О., Беляев В.С., Миронов А.Ю.*
Спектр газовых сигнальных молекул кишечных лактобацилл у больных ишемическим инсультом 163
- Гафарова М.Т., Бондаренко Е.И., Малый К.Д., Алиева Э.Э., Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н., Малая Н.К., Кубышкин А.В.*
Распространённость возбудителей трансмиссивных клещевых риккетсиозов на Крымском полуострове 170
- Годовалов А.П., Задорина И.И., Быкова Л.П., Пастухов Д.М., Яковлев М.В.*
Способ экспресс-детекции *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки в ротовой полости 177

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Новикова И.Е., Садеева З.З., Шакирзянова Р.А., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Карасева О.В., Вершинина М.Г., Фисенко А.П.*
Использование полимеразной цепной реакции для детекции генов резистентности у грамотрицательных бактерий в рутинной практике педиатрического стационара 180
- Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А., Махова М.А., Колесникова Е.А.*
Молекулярно-генетическая характеристика резистома и вирулома карбапенем-устойчивых клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae* 186

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Petelina T.I., Musikhina N.A., Garanina V.D., Gorbatenko E.A., Shcherbinina A.E., Zhmurov D.V., Zhmurov V.A., Gapon L.I., Galeeva N.A., Avdeeva K.S., Kapustina A.A., Yaroslavskaya E.I.
Prospective analysis of laboratory blood parameters in patients with cardiovascular diseases who underwent COVID-19-associated pneumonia 133

Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O.
Beta coronaviruses and human endocrine system: new data (review of literature) 140

IMMUNOLOGY

Petrova O.V., Tverdokhlebova D.K.
Presence and quantity of antibodies after vaccination «Gam-COVID-Vac» 147

Bukharin O.V., Kuzmin M.D., Perunova N.B., Nikiforov I.A., Chainikova I.N., Ivanova E.V.
Diagnostic cytokine marker of male infertility – interleukin 4 151

MICROBIOLOGY

Shipitsyna I. V., Osipova E.V.
Efficacy of cephalosporins against enterobacteria isolated from patients with chronic osteomyelitis 158

Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Chichanovskaja L.V., Ganzja D.V., Grigoryants E.O., Belyaev V.S., Mironov A.Yu.
The microbiome of oral cavity patients with periodontitis, adhesive and biofilm forming properties 163

Gafarova M.T., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Alieva E.E., Evstafiev I.L., Tovpinec N.N., Malaya N.K., Kubyshkin A.V.
Prevalence of causative agents of transmissible tick-borne rickettsiosis in the Crimean peninsula 170

Godovalov A.P., Zadorina I.I., Bykova L.P., Pastukhov D.M., Yakovlev M.V.
Express detection of *Escherichia coli* and bacteria of the *Escherichia coli* group at the oral cavity 177

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Shakirzyanova R.A., Alyabieva N.M., Lazareva A.V., Karaseva O.V., Vershinina M.G., Fisenko A.P.
The using of the polymerase chain reaction for the detection of resistance genes in gram-negative bacteria in routine practice in a pediatric hospital 180

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A., Makhova M.A., Kolesnikova E.A.
Molecular genetic characteristics of resistome and virulome of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains 186

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Петелина Т.И.¹, Мусихина Н.А.¹, Гаранина В.Д.¹, Горбатенко Е.А.¹, Щербинина А.Е.¹, Жмууров Д.В.^{1,2}, Жмууров В.А.^{1,2}, Гапон Л.И.¹, Галеева Н.А.¹, Авдеева К.С.¹, Капустина А.А.^{1,2}, Ярославская Е.И.¹

ПРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЛАБОРАТОРНЫХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19-АССОЦИИРОВАННУЮ ПНЕВМОНИЮ

¹Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 625026, Томск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, город, 625023, Россия

Исследование особенностей и динамики лабораторных биомаркеров у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию, имеет большое клиническое значение. В исследование включены 116 пациентов, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию. Пациенты были разделены на 2 группы. В первую группу вошли 49 пациентов без ССЗ, во вторую группу – 67 пациентов с ССЗ. Пациентам в обеих группах проводилось исследование биообразца крови в момент госпитализации и в точке 3 мес после выписки из многопрофильного стационара. Оценивали параметры общего анализа крови, биохимии, гемостаза, биомаркеры воспаления – концентрацию С-реактивного белка (СРБ), высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ), уровень гомоцистеина и ИЛ-6. Всем пациентам исходно была проведена компьютерная томография органов грудной клетки. Выявлено, что показатели СОЭ, WBC (лейкоциты), отношения NLR (нейтрофилы/лимфоциты), фибриноген, ЛДГ (лактатдегидрогеназа), соотношения LYM/СРБ (лимфоциты/С-реактивный белок) являются параметрами, достоверно различающими пациентов 1-й и 2-й группы. Через 3 мес после выписки из стационара у пациентов обеих групп повышенные показатели приблизились к референсным значениям, однако такие параметры как СРБ, СОЭ, WBC, фибриноген сохранялись на более высоком уровне во 2-й группе по сравнению с 1-й группой. Корреляционный анализ выявил взаимосвязь параметров воспаления и гемостаза во 2-й группе, что подтверждает наличие пролонгированного сосудистого воспалительного ответа в этой группе пациентов. Методом логистической регрессии выявлено, что с исходным объемом поражения лёгких более 50 % ассоциированы такие показатели, как лимфоциты, нейтрофилы, АЧТВ и ЛДГ. Изменение этих параметров на 1 усл. ед. способствует увеличению объема поражения легочной ткани на 6,5%, 6,4%, 11% и 0,6%, соответственно. Таким образом, динамический контроль лабораторных параметров крови имеет прогностическую ценность в оценке характера течения COVID-19-ассоциированной пневмонии у пациентов с ССЗ и разработке алгоритма персонализированного мониторинга за пациентами в постковидном периоде с целью своевременной коррекции терапии для предупреждения отсроченных сердечно-сосудистых событий.

Ключевые слова: COVID-19; биомаркеры; пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Для цитирования: Петелина Т.И., Мусихина Н.А., Гаранина В.Д., Горбатенко Е.А., Щербинина А.Е., Жмууров Д.В., Жмууров В.А., Гапон Л.И., Галеева Н.А., Авдеева К.С., Капустина А.А., Ярославская Е.И. Проспективный анализ лабораторных параметров крови у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 133-139. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-133-139>

Для корреспонденции: Петелина Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния артериальной гипертензии и коронарной недостаточности науч. отд. клин. кардиологии; e-mail: petelina@infarkta.net

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.12.2021

Принята к печати 15.01.2022

Опубликовано 25.03.2022

Petelina T.I.¹, Musikhina N.A.¹, Garanina V.D.¹, Gorbatenko E.A.¹, Shcherbinina A.E.¹, Zhmurov D.V.^{1,2}, Zhmurov V.A.^{1,2}, Gapon L.I.¹, Galeeva N.A.¹, Avdeeva K.S.¹, Kapustina A.A.^{1,2}, Yaroslavskaya E.I.¹

PROSPECTIVE ANALYSIS OF LABORATORY BLOOD PARAMETERS IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES WHO UNDERWENT COVID-19-ASSOCIATED PNEUMONIA

¹Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, 625026, Tomsk, Russia;

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tyumen State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 625023

The study of the characteristics and dynamics of laboratory biomarkers in patients with cardiovascular diseases (CVD) undergoing COVID-19-associated pneumonia may be of great clinical importance. The study included 116 patients who underwent COVID-19-associated pneumonia. The patients were divided into 2 groups. The first group included 49 patients without CVD, the second group – 67 patients with CVD. A blood sample was performed in all patients at the time of hospitalization and 3 months after

discharge from the hospital. The parameters of general blood count, biochemistry, hemostasis, and biomarkers of inflammation were assessed – concentration of C-reactive protein (CRP), highly sensitive CRP (hs-CRP), homocysteine and IL-6. All patients initially underwent computed tomography of the chest organs. We found that ESR, WBC (leukocytes), NLR (neutrophils/lymphocytes ratio), fibrinogen, LDH (lactate dehydrogenase), LYM/CRP ratio (lymphocytes/CRP) were parameters that significantly distinguished patients in the 1st and 2nd groups. Three months after discharge from the hospital in patients of both groups the increased indicators approached the reference values, however, some parameters such as CRP, ESR, WBC, fibrinogen remained at a higher level in group 2 compared to group 1. Correlation analysis revealed the relationship between parameters of inflammation and hemostasis in the 2nd group of patients, which confirms the presence of latent vascular inflammatory potential in this group. It was revealed that such indicators as lymphocytes, neutrophils, APTT and LDH were associated with the initial volume of lung lesion more than 50%. Increase of these parameters by 1 unit contributes to increase in the volume of lung tissue damage by 6.5%, 6.4%, 11%, and 0.6%, respectively. Thus, dynamic control of laboratory parameters has prognostic value in assessing the nature of the course of COVID-19 associated pneumonia in patients with CVD and developing an algorithm for personalized monitoring of patients in the post-COVID period with the aim of timely correction of therapy to prevent unwanted vascular complications.

Key words: COVID-19; biomarkers; patients with cardiovascular diseases.

For citation: Petelina T.I., Musikhina N.A., Garanina V.D., Gorbatenko E.A., Shcherbinina A.E., Zhmurov D.V., Zhmurov V.A., Gapon L.I., Galeeva N.A., Avdeeva K.S., Kapustina A.A., Yaroslavskaya E.I. Prospective analysis of laboratory blood parameters in patients with cardiovascular diseases who underwent COVID-19-associated pneumonia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 133-139 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-133-139

For correspondence: Petelina Tatiana Ivanovna, MD, Leading Researcher of the Department of Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency of the Scientific Department of Clinical Cardiology; e-mail: petelina@infarkta.net

Information about authors:

Petelina T.I., <https://orcid.org/0000-0001-6251-4179>;
Musikhina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9607-7245>;
Garanina V.D., <https://orcid.org/0000-0002-9232-5034>;
Gorbatenko E.A., <https://orcid.org/0000-0003-0858-2933>;
Shcherbinina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-2056-2217>;
Zhmurov D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3167-5310>;
Zhmurov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-7228-6197>;
Gapon L.I., <https://orcid.org/0000-0002-3620-0659>;
Galeeva N.A., <https://orcid.org/0000-0001-7243-0083>;
Avdeeva K.S., <https://orcid.org/0000-0002-2134-4107>;
Kapustina A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0587-0991>;
Yaroslavskaya E.I., <https://orcid.org/0000-0003-1436-8853>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.12.2021
Accepted 15.01.2022
Published 25.03.2022

Введение. Новая коронавирусная инфекция, вызываемая вирусом SARS-CoV2, стала серьезной проблемой во всем мире. Появившись в 2019 г., COVID-19 поставил перед медицинской службой сложную проблему борьбы с новым инфекционным агентом и вызываемыми им осложнениями. Главной мишенью SARS-CoV-2 являются альвеолярные клетки II типа, что определяет поражение легких как основное клиническое проявление заболевания. Кроме того, полученные сведения о том, что вирус связывается с функциональными рецепторами ангиотензин-превращающего фермента 2 (АПФ-2), экспрессия которых установлена как в клетках крови, так в сосудистой стенке и кардиомиоцитах, дали возможность частично объяснять патогенетическую основу возникновения и/или особенности течения сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, артериальной гипертензии (АГ), ИБС, миокардитов, нарушения ритма сердца во время пандемии [1].

В настоящее время основными звеньями патогенеза COVID-19 считается избыточный ответ иммунной системы с массивным высвобождением цитокинов – «цитокиновый шторм» и поражение сосудистого русла с развитием как очевидных тромботических осложнений, таких как крупные тромбозы в легочных артериях, венах, сосудах сердца, головного мозга, почек, печени и

др., так и признаков тромбоза на микроциркуляторном уровне, который прижизненно доказать сложнее. Механизм гиперкоагуляции у пациентов с COVID-19 чаще связывают с выраженной эндотелиальной дисфункцией, индукцией агрегации тромбоцитов на фоне повышения системной сосудистой воспалительной реакции, а также скрытой генетической обусловленности тромбофилии. На исходы заболевания, безусловно, огромное влияние оказывает коморбидность, то есть наличие сопутствующих хронических заболеваний у пациентов [2 – 4].

Целью нашего исследования стало проспективное изучение динамики лабораторных параметров крови у пациентов с наличием сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию, для выявления на исходном этапе предикторов тяжести течения заболевания, а в точке 3 мес после выписки из стационара – потенциальных маркеров постковидных сосудистых осложнений.

Материал и методы. Исследование проспективное, соответствующее стандартам надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и положениям Хельсинкской Декларации. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике Тюменского кардиологического научного центра, Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

(протокол № 159 от 23.07.20 г.). Перед включением в исследование у каждого из участников исследования было получено письменное информированное согласие об использовании результатов обследования в научных целях. Исследование зарегистрировано в базе данных клинических исследований Clinical Trials.gov Identifier: NCT04501822.

В данное исследование были включены 116 обследованных на данный момент пациентов из 380, перенесших COVID-19-ассоциированную пневмонию. Все пациенты были разделены на 2 группы. В 1-ю группу вошли 49 пациентов без сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), средний возраст $39,55 \pm 13,91$ лет. Во 2-ю группу вошли 67 пациентов с ССЗ, средний возраст $56,55 \pm 9,98$ лет. Группы значительно различались по возрасту, уровню САД, ДАД, ЧСС, ИМТ ($p < 0,001$ соответственно для всех параметров), с более высокими показателями во 2-й группе. Исходно в первой группе объем поражением легких более 50% был в 20,0% случаев, во второй группе в 47,6% случаев.

Из ССЗ во 2-й группе 53,4% пациентов имели артериальную гипертонию (АГ), 15,5% – ИБС, 31,1% – нарушения ритма сердца и др. К моменту проведения контрольного визита 3 месяца пациенты во 2-й группе в 56,1% случаев принимали препараты из группы ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ИАПФ) или блокаторы ангиотензиновых рецепторов (БРА), в 45,3% случаев – статины и в 8% – ацетилсалициловую кислоту.

Пациентам обеих исследуемых групп проводилось лабораторное исследование биообразца крови в момент госпитализации и в точке 3 мес после выписки из стационара. Оценивали параметры общего анализа крови импедансным методом с технологиями проточной цитометрии на аппарате 5Diff анализатор «Mindrey BC 5800» (Китай); из биохимических параметров определяли креатинин, печеночные ферменты, общий холестерин, глюкозу натощак, исследовали концентрацию С-реактивного белка (СРБ) «Cobas integra plus 400» (Италия), высокочувствительного С-реактивного белка (вч-СРБ), интерлейкина 6 (ИЛ-6) – иммунотурбидиметрическим методом на полуавтоматическом анализаторе открытого типа «Clima MC-15» (Испания) и гомоцистеина на анализаторе «IMMULITE 2000» (Siemens Diagnostics, США); параметры коагулограммы исследовали на анализаторе «Destiny Plus» (Ирландия). Всем пациентам исходно в стационаре была проведена компьютерная томография органов грудной клетки.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводился с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 21. В зависимости от распределения при сравнении показателей в 2-х независимых группах использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни. При нормальном распределении, данные представляли, как среднее M и стандартное отклонение (SD), при распределении отличным от нормального данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25%;75%]. Парным критерием Стьюдента или критерием Вилкоксона рассчитывали динамику между связанными группами. Отношение шансов (ОШ) параметров, ассоциированных с объемом поражения легких, рассчитывали с использованием логистической регрессии. Результаты оценивались как статистически значимые при двухстороннем уровне $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе работы мы проанализировали показатели общего анализа крови в группах пациентов, перенесших COVID-19 – ассоциированную пневмонию, при отсутствии и с наличием сердечно-сосудистых заболеваний, на исходном этапе и через 3 мес после выписки из стационара (табл. 1).

Из представленных в табл.1 данных видно, что эритроцитарные параметры в 1-й и во 2-й группах пациентов на госпитальном этапе имеют различия по ряду параметров. Нами зарегистрирована значимая разница в показателях: СОЭ и МСНС, с превышением их значений во 2-й группе ($p < 0,008$ и $p < 0,019$, соответственно).

Параметры НСТ, MCV, МСНС, RDW-SD и RDW-CV, превышая референсные значения показателей исходно, значимо снизились к точке наблюдения – 3 мес после выписки из стационара ($p < 0,001$ для всех параметров). Уровень МСН снизился в обеих группах ($p < 0,016$ и $p < 0,021$, соответственно).

Таким образом, в точке 3 мес после выписки из стационара у пациентов 2-й группы, в целом, отмечена нормализация эритроцитарных показателей, при сохранении повышенного уровня RBC, HGB, которые могут являться индикаторами, свидетельствующими о долгосрочном характере нарушения параметров эритроцитарного звена после перенесенной новой коронавирусной инфекции у пациентов с ССЗ. Наши данные согласуются с результатами ряда исследований [5 – 7].

Сравнительная характеристика и динамика лейкоцитарных параметров у пациентов, перенесших COVID-19 пневмонию, представлена в табл. 2.

Анализ данных табл. 2 показал, что на исходном этапе наблюдения зарегистрировано значимое превышение показателей WBS, отношения NLR (нейтрофилы/лимфоциты) и снижение соотношения LYM/СРБ (лимфоциты/СРБ) у пациентов во 2-й группе пациентов.

Выявленные закономерности в повышении показателя NLR и снижении LYM/СРБ отражают особенности течения новой коронавирусной инфекции, когда при отсутствии на ранней стадии явных изменений, спустя 7-10 дней начинают прогрессировать клинические проявления с выраженным системным повышением цитокинов и снижением количества лимфоцитов. Считается, что эти клетки, экспрессируя на своей поверхности АПФII, подвергаются прямому инфицированию SARS-CoV-2, что приводит к их апоптозу, кроме этого лимфопению поддерживает процесс атрофии лимфоидной ткани возросшим уровнем цитокинов [8–11].

В точке 3 мес после выписки отмечено значимое понижение показателей WBC, NEU, отношения NLR и повышение EOS, LYM/СРБ в обеих группах и LYM во 2-й группе пациентов. Однако параметры WBC, LYM, NEU, оставаясь значимо выше, чем в группе без ССЗ, косвенно подтверждают наличие у пациентов с ССЗ сохраняющейся, более выраженной пролонгированной системной воспалительной реакции на фоне перенесенной коронавирусной инфекции.

Динамика параметров тромбоцитарного звена представлены в табл. 3.

Исходно значимой разницы в основных тромбоцитарных показателях между группами пациентов выявлено не было, кроме увеличения показателя PDW во 2-й группе. Обращает на себя внимание динамика через 3 мес – значимое повышение PLT и снижение PLR (отношения тромбоцитов/к лимфоцитам) во 2-й группе па-

Таблица 1

Сравнительная характеристика эритроцитарных параметров у пациентов с отсутствием и наличием сердечно-сосудистых заболеваний, перенесших COVID-19 пневмонию, исходно и через 3 мес после выписки из стационара

Показатели	Период обследования	Пациенты без ССЗ (n=49)	Пациенты с ССЗ (n=67)	p
RBC, 10 ¹² /л	Исходно	4,75±0,51	4,72±0,46	0,786
	Через 3 мес	4,71±0,44	4,75±0,45	0,676
	<i>p</i>	0,440	0,587	
HGB, г/л	Исходно	134,85±13,77	136,69±13,40	0,486
	Через 3 мес	134,71±11,67	138,70±12,88	0,089
	<i>p</i>	0,642	0,160	
HCT, %	Исходно	39,83±3,95	40,35±3,89	0,510
	Через 3 мес	42,62±3,69	43,75±3,97	0,120
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	
MCV, фл	Исходно	84,30 [79,25; 87,25]	83,85 [81,90; 87,90]	0,389
	Через 3 мес	92,00 [88,00; 94,00]	92,00 [90,00; 95,00]	0,032
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	
СОЭ, мм/ч	Исходно	14,00 [8,00;20,00]	25,00 [15,00;39,00]	0,008
	Через 3 мес	10,00 [5,00;15,00]	10,00 [6,00;17,00]	0,551
	<i>p</i>	0,501	0,128	
MCH, пг	Исходно	28,02±2,36	28,83±1,81	0,075
	Через 3 мес	28,76±2,19	29,34±2,09	0,146
	<i>p</i>	0,016	0,021	
MCHC, г/дл	Исходно	33,40 [32,90; 34,00]	33,80 [33,30; 34,30]	0,019
	Через 3 мес	32,00 [31,00; 32,00]	32,00 [31,00; 32,00]	0,836
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	
RDW-SD, фл	Исходно	39,57±3,27	40,85±3,64	0,106
	Через 3 мес	45,92±3,11	48,45±4,27	0,001
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	
RDW-CV, %	Исходно	13,10 [12,75;13,55]	13,30 [12,80;13,80]	0,579
	Через 3 мес	12,30 [11,90;12,60]	12,60 [12,10;13,30]	0,025
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	

Примечание. RBC – число эритроцитов; HGB – концентрация гемоглобина; HCT – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; СОЭ – скорость оседания эритроцитов; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDW-SD – стандартное отклонение ширины распределения эритроцитов; RDW-CV – коэффициент вариации ширины распределения эритроцитов; *p* – значимость различий параметров по горизонтали между группами 1 и 2, по вертикали – внутри группы в динамике исходно и через 3 мес после выписки из стационара. Здесь и табл. 2- 4: жирным шрифтом выделена значимость.

Таблица 2

Сравнительная характеристика и динамика лейкоцитарных параметров у пациентов с отсутствием и наличием сердечно-сосудистых заболеваний, перенесших COVID-19 пневмонию, исходно и через 3 месяца после выписки из стационара

Показатели	Период обследования	Пациенты без ССЗ (n=49)	Пациенты с ССЗ (n=67)	p
WBC, 10 ⁹ /л	Исходно	5,32 [3,88;6,71]	6,21 [4,61;7,88]	0,037
	Через 3 мес	4,37 [3,89;5,40]	5,38 [4,36;6,26]	0,004
	<i>p</i>	0,028	0,004	
LYM, 10 ⁹ /л	Исходно	1,69±0,92	1,50±0,60	0,261
	Через 3 мес	1,60±0,43	1,84±0,57	0,014
	<i>p</i>	0,929	<0,001	
NEU, 10 ⁹ /л	Исходно	3,59±2,63	4,29±2,08	0,180
	Через 3 мес	2,61±0,89	3,05±1,14	0,027
	<i>p</i>	0,041	<0,001	
EOS, 10 ⁹ /л	Исходно	0,03 [0,02;0,12]	0,02 [0,01;0,10]	0,089
	Через 3 мес	0,10 [0,06;0,16]	0,12 [0,07; 0,19]	0,054
	<i>p</i>	0,047	<0,001	
NLR	Исходно	1,91 [1,24;2,73]	2,73 [1,72;3,97]	0,030
	Через 3 мес	1,58 [1,27;1,87]	1,64 [1,22;2,13]	0,673
	<i>p</i>	0,036	<0,001	
LYM/СРБ	Исходно	0,20 [0,10;0,64]	0,03 [0,01;0,06]	<0,001
	Через 3 мес	1,88[0,92;4,00]	0,66 [0,44;1,34]	<0,001
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	

Примечание. WBS – число лейкоцитов; LYM – число лимфоцитов; NEU – число нейтрофилов; EOS – число эозинофилов; NLR-отношение нейтрофилов к лимфоцитам; LYM/СРБ-отношение лимфоцитов к С-реактивному белку. *p* – значимость различий параметров по горизонтали между группами 1 и 2, по вертикали – внутри группы в динамике исходно и через 3 месяца после выписки из стационара

Таблица 3

Сравнительная характеристика и динамика тромбоцитарных параметров у пациентов с отсутствием и наличием сердечно-сосудистых заболеваний, перенесших COVID-19 пневмонию, исходно и через 3 мес после выписки из стационара

Показатели	Период обследования	Пациенты без ССЗ (n=49)	Пациенты с ССЗ (n=67)	p
PLT, 10 ⁹ /л	Исходно	198,36±77,15	206,74±71,15	0,564
	Через 3 мес	206,88±45,13	222,64±52,17	0,092
	<i>p</i>	0,409	0,023	
PCT, %	Исходно	0,21±0,07	0,22±0,06	0,522
	Через 3 мес	0,18±0,03	0,18±0,04	0,386
	<i>p</i>	0,017	0,001	
PDW, %	Исходно	13,70 [13,10; 15,20]	13,35 [12,05; 14,30]	0,039
	Через 3 мес	15,80 [15,60; 16,00]	15,70 [15,60; 15,90]	0,197
	<i>p</i>	0,002	<0,001	
MPV, фл	Исходно	11,40±0,97	11,10±0,94	0,160
	Через 3 мес	8,58±0,95	8,23±0,88	0,046
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	
P-LCC, 10 ⁹ /л	Исходно	36,74±7,57	34,93±7,14	0,292
	Через 3 мес	26,37±8,24	23,61±7,35	0,061
	<i>p</i>	<0,001	<0,001	
PLR	Исходно	134,70±51,88	162,73±107,73	0,161
	Через 3 мес	136,01±42,66	131,47±51,02	0,614
	<i>p</i>	0,988	0,017	

Примечание. PLT – тромбоциты; PCT – тромбокрит; MPV – средний объем тромбоцита; PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов; PLR – отношение тромбоцитов к лимфоцитам; P-LCC – число крупных тромбоцитов. *p* – значимость различий параметров по горизонтали между группами 1 и 2, по вертикали – внутри группы в динамике исходно и через 3 мес после выписки из стационара.

пациентов и однонаправленное значимое снижение PCT, PDW, MPV и P-LCC в обеих группах пациентов.

По данным научных публикаций количество тромбоцитов может напрямую различать пациентов с COVID-19 по тяжести заболевания. Тромбоцитопения связана с трехкратным повышением риска тяжелой формы COVID-19, что может предполагать развитие внутрисосудистой коагулопатии, часто переходящей в диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС). Взаимодействия между эндотелиальными клетками, тромбоцитами и лейкоцитами играют решающую роль в прокоагулянтном эффекте вирусных инфекций. Интерес к отношению PLR состоит в том, что он, отражая как агрегацию, так и воспалительные механизмы в период инфекционного процесса, может быть ценным параметром прогнозирования осложнений заболевания. Значение PLR на пике тромбоцитов во время лечения – это независимый фактор отражения динамики тяжести процесса. По данным Rong Qu и соавт. [12 – 14], PLR пациентов отражает степень выраженности цитокинового шторма, что может являться новым показателем в мониторинге пациентов с COVID-19.

На следующем этапе в нашей работе проведен анализ параметров гемостаза у пациентов с COVID-19 (табл. 4).

Из представленных в табл. 4 данных видно, что во 2-й группе пациентов с ССЗ на исходной точке зарегистрировано значимое превышение референсных значений уровня фибриногена ($p < 0,001$), повышенный разброс значений АЧТВ, Д-димера, по сравнению с 1-й группой. Через 3 мес после выписки из стационара зарегистрировано значимое снижение перечисленных параметров ($p < 0,001$, соответственно группам) и тенденция к снижению Д-димера в обеих группах пациентов. Полученные нами данные отражают умеренно выраженные признаки коагулопатии, характеризующиеся повышенным содержанием фибриногена, легкой тром-

боцитопенией, удлинением активированного частично-го тромбопластинового времени (АЧТВ) и повышением уровня Д-димера.

Сравнительная характеристика биохимических параметров у пациентов в обеих группах показала незначительное превышение референсных значений аспаратамиотрансферазы (АСТ) (32,5 [23,00; 41,30] ед/л), аланинаминотрансферазы (АЛТ) (33,15, [24,90; 45,90] ед/л), общего холестерина (ОХЛ) (4,33±1,27 ммоль/л) во 2-й группе пациентов, без значимой разницы между группами. Исходное превышение глюкозы натощак в обеих группах (6,70 [5,89; 7,20] и 7,05 [6,40; 8,10] ммоль/л, соответственно) со значимым снижением параметров через 3 мес ($p < 0,001$, соответственно группам). Значимое повышение уровня ОХЛ через 3 мес в обеих группах (5,11±1,125 и 5,60±1,23 ммоль/л, $p < 0,001$). И значимое превышение исходных значений тах СРБ (29,8 [3,80; 24,60] и 77,42 [21,30; 110,30 мг/л]) и ЛДГ (322,14±135,98; 401,56±212,85 ед/л) в обеих группах со снижением параметров через 3 мес, но сохраняющимся превышением значений во 2-й группе по сравнению с 1-й ($p < 0,001$, соответственно).

Кроме этого, необходимо отметить, что к контрольной точке 3 мес у пациентов с ССЗ были выявлены, превышающие как референсные значения, так и показатели в 1-й группе, уровни высокочувствительного-СРБ (вч-СРБ), гомоцистеина и интерлейкина – 6 (2,13±2,26, 4,13±3,92 мг/л), (14,36±6,08, 14,67±6,69 ммоль/л), (1,75 [1,30; 2,45], 2,26 [1,60; 3,90] пг/мл), которые отражают сохраняющийся у пациентов в постковидном периоде повышенный сосудистый воспалительный потенциал для возможных нежелательных событий, несмотря на проведение плановой комплексной медикаментозной терапии.

На исходной и контрольной точке для изучения характера ассоциации, представленных в работе параметров, был проведен корреляционный анализ. Выявлены

Сравнительная характеристика и динамика параметров гемостаза у пациентов с отсутствием и наличием сердечно-сосудистых заболеваний, перенесших COVID-19 пневмонию, исходно и через 3 мес после выписки из стационара

Показатели	Период обследования	Пациенты без ССЗ (n=49)	Пациенты с ССЗ (n=67)	p
Фибриноген, г/л	Исходно	4,17±1,19	5,34±1,31	<0,001
	Через 3 мес	2,39±0,50	2,81±0,62	<0,001
	p	<0,001	<0,001	
ПТИ, %	Исходно	100,00 [90,00;100,00]	100,00 [94,00;100,00]	0,580
	Через 3 мес	100,00 [94,60;105,00]	104,00 [97,20;111,00]	0,391
	p	0,004	<0,001	
МНО, ед	Исходно	1,00 [1,00;1,05]	1,00 [1,00;1,04]	0,477
	Через 3 мес	1,02 [0,96;1,09]	0,97 [0,90;1,06]	0,046
	p	0,220	0,009	
АЧТВ, сек	Исходно	33,40 [31,00;36,30]	34,00 [30,90;38,70]	0,355
	Через 3 мес	27,70 [26,40;29,20]	26,80 [25,10;28,40]	0,036
	p	<0,001	<0,001	
Д – димер, мкг/ мл	Исходно	0,27 [0,12;0,62]	0,34 [0,23;0,65]	0,899
	Через 3 мес	0,16 [0,12;0,31]	0,22 [0,09;0,40]	0,564
	p	0,416	0,080	

Примечание. ПТИ – протромбиновый индекс; МНО – международное нормализованное отношение; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время. p – значимость различий параметров по горизонтали между группами 1 и 2, по вертикали – внутри группы в динамике исходно и через 3 мес после выписки из стационара.

многочисленные разнонаправленные взаимосвязи между гематологическими, коагулопатическими и биохимическими параметрами. Так, например, ассоциация NLR с maxСРБ ($r=0,681$ $p=0,000$), фибриногеном ($r=0,433$ $p=0,003$), ЛДГ ($r=0,433$ $p=0,003$), АЧТВ ($r=0,504$ $p=0,000$); PLR с maxСРБ ($r=0,540$ $p=0,000$), фибриногеном ($r=0,369$ $p=0,012$), ЛДГ ($r=0,341$ $p=0,049$), АЧТВ ($r=0,383$ $p=0,007$), LYM/СРБ ($r=-0,650$ $p=0,000$); EOS с ЛДГ ($r=-0,406$ $p=0,017$), КФК ($r=-0,394$ $p=0,034$), PLT ($r=0,454$ $p=0,001$); Д-димера с LYM и EOS ($r=-0,376$ $p=0,028$, $r=-0,426$ $p=0,017$ соответственно); maxСРБ с NEU ($r=0,650$ $p=0,000$), EOS ($r=-0,498$ $p=0,000$), фибриногеном ($r=0,544$ $p=0,000$), КФК ($r=0,478$ $p=0,010$), ЛДГ ($r=0,558$ $p=0,001$), АЧТВ ($r=0,672$ $p=0,000$) и др.

Результаты статистической обработки данных отразили глубокую взаимосвязь всех лабораторных параметров, что свидетельствует о едином патогенетическом механизме вовлечения различных биологических процессов в развитие и течение пролонгированного во времени патологического процесса, способного сохранять потенциальные возможности к развитию отсроченных новых эпизодов ССЗ и сосудистых катастроф. На контрольной точке 3 месяца после выписки из стационара в группе пациентов без ССЗ на основании данных инструментального обследования (суточное мониторирование артериального давления и нагрузочные пробы ЭКГ) было зарегистрировано выявление новых случаев сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, АГ и ИБС у 6,1 % наблюдаемых пациентов.

С целью выявления взаимосвязи исследуемых биомаркеров с объемом поражения легких на исходном этапе исследования нами использован анализ унивариантной логистической регрессии. Из всех проанализированных параметров крови с исходным объемом поражения лёгких более 50 % ассоциировались уровни лимфоцитов, нейтрофилов, АЧТВ и ЛДГ. Данные логистической регрессии показали, что при снижении лимфоцитов на 1 ус. ед. шанс увеличения объема поражения

легких повышается на 6,48% (ОШ 0,935 (95% ДИ 0,883-0,990; $p=0,022$), при увеличении на 1 ус. ед. уровня нейтрофилов (ОШ 1,064 (95% ДИ 1,014-1,117; $p=0,012$), АЧТВ (ОШ 1,113 (95% ДИ 1,001-1,238; $p=0,048$) и ЛДГ (ОШ 1,006 (95% ДИ 1,001-1,011; $p=0,022$) шанс повышения объема поражения легких возрастает на 6,4%, 11% и 0,6%, соответственно.

Обсуждение. Несмотря на то, что COVID-19 считается, прежде всего, инфекцией дыхательных путей, имеющиеся научные данные свидетельствуют о том, что его следует рассматривать как системное заболевание, затрагивающее еще и сердечно-сосудистую, желудочно-кишечную, неврологическую, кроветворную и иммунную системы [1, 15].

На сегодняшний день полученные научные результаты однозначно констатируют, что при COVID-19 с самого начала заболевания имеет место активация гемостаза, внутрисосудистого свертывания и тромбообразования как в крупных, так и в сосудах мелкого калибра жизненно важных органов, что определяет исход заболевания. Причем процесс внутрисосудистого свертывания в капиллярах легкого (легочная интраваскулярная коагуляция) играет важную роль в развитии острого респираторного дистресс-синдрома и объема поражения легочной ткани. Новая коронавирусная инфекция вызывает развитие общебиологической реакции активации системного воспалительного ответа, проявляющегося цитокиновым и тромботическим штормом, определяющим степень тяжести состояния пациентов [16,17].

Проводимое исследование показало, что полученные нами результаты согласуются с рядом опубликованных данных в области изучения лабораторных гематологических параметров у пациентов с COVID-19. Так, известно, что эритроциты при COVID-19 определяют тяжесть гипоксемии и анемии у пациентов с пневмонией, при этом могут изменяться параметры количества эритроцитов, уровня гемоглобина, объема и формы эритроцитов, с формированием эритроцитарных монетных столбиков (сладжей),

способных обтурировать микрососудистое русло, нарушая снабжение тканей кислородом [3,5,6]. Лимфопения и эозинопения являются одними из самых показательных проявлений новой инфекции и обладают прогностическим потенциалом [8,9]. В ряде исследований отмечено, что отношение нейтрофилов к лимфоцитам и тромбоцитов к лимфоцитам имеют прогностическую значимость при выявлении тяжелого течения заболевания [9,10]. Уже показано, что отслеживание динамики количества лимфоцитов, RDW-CV, тромбоцитов и маркеров воспаления как ЛДГ, СРБ и ИЛ-6 может предсказать критическое состояние и способствовать своевременному оказанию интенсивной терапии [18, 19]. В нашей работе подтверждены многие из представленных результатов и получены свои данные, в частности, о наличии ассоциации объема поражения легочной ткани с параметрами лимфоцитов, нейтрофилов, АЧТВ и ЛДГ на исходном этапе заболевания.

Помимо этого, проспективное наблюдение пациентов после COVID-19 позволило нам на промежуточной точке – 3 месяца после выписки из стационара показать, что в группе пациентов с ССЗ сохраняется ряд выявленных исходно гематологических, биохимических и иммунологических изменений, взаимосвязь между параметрами которых может свидетельствовать о сохранении пролонгированной реакции системного и локального сосудистого воспалительного процесса, демонстрируя наличие прогностического потенциала для развития отсроченных кардиоваскулярных событий у пациентов в постковидном периоде.

Заключение. Таким образом, динамический контроль лабораторных параметров имеет прогностическую ценность в оценке характера течения COVID-19-ассоциированной пневмонии у пациентов с ССЗ и разработке алгоритма персонализированного мониторинга за пациентами в постковидном периоде с целью своевременной коррекции терапии для предупреждения отсроченных сердечно-сосудистых событий.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 5-19 см. REFERENCES)

2. Гриневич В.Б., Губонина И.В., Дошицин В.Л., Котовская Ю.В., Педь В.И. и др. Особенности ведения коморбидных пациентов в период пандемии новой коронавирусной инфекции (covid-19). национальный консенсус 2020. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020; 19(4):64-9.
3. Бурячковская Л.И., Мелькумянц А.М., Ломакин Н.В., Антонова О.А., Ермишкин В.В. Повреждение сосудистого эндотелия и эритроцитов у больных COVID-19. *Consilium Medicum*. 2021; 23 (6): 469–76. DOI: 10.26442/20751753.2021.6.200939.
4. Чазова И.Е., Миронова О.Ю. COVID-19 и сердечно-сосудистые заболевания. *Терапевтический архив*. 2020;92 (9): 4-7. DOI: 10.26442/00403660.2020.09.000742.

REFERENCES

1. Clerkin K.J, Fried J.A, Raikhelkar J., Sayer G., Griffin J.M., Masoumi A. et al. COVID-19 and Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2020; 141 (20): 1648-55.
2. Grinevich V.B., Gubonina I.V., Doshchitsin V.L., Kotovskaya Yu.V., Kravchuk Yu.A., Ped V.I. et al. Features of the management of comorbid patients during a pandemic of a new coronavirus infection (covid-19), national consensus. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilactika*. 2020;19(4):64-9. (in Russian)
3. Buryachkovskaya L.I., Melkumyants A.M., Lomakin N.V., Antonova O.A., Ermishkin V.V. Damage to the vascular endothelium and erythrocytes in patients with COVID-19. *Consilium Medicum*. 2021; 23 (6): 469-76. DOI: 10.26442 / 20751753.2021.6.200939. (in Russian)

4. Chazova I.E., Mironova O.Yu. COVID-19 and cardiovascular diseases. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2020; 92(9):4-7. DOI: 10.26442 / 00403660.2020.09.000742. (in Russian)
5. Ansovini R., Compagnucci L. The Hypothetical role of erythrocytes in COVID-19: immediate clinical therapy. *Journal Biomedical & Research Environmental Science*. 2020; 1(3): 048-050. DOI: 10.37871/jels1119, Article ID: JELS1119.
6. Lu G., Wang J. Dynamic changes in routine blood parameters of a severe COVID-19 case. *Clin. Chim. Acta*. 2020; 508: 98-102. DOI: 10.1016/j.cca.2020.04.034. Epub 2020 May 13. PMID: 32405079; PMCID: PMC7217800.
7. Renoux C., Fort R., Nader E., Boisson C., Joly Ph., Stauffer E. et al. Impact of COVID-19 on red blood cell rheology. *British Journal Haematology*. 2021; 192 (4): e108-e111. DOI: 10.1111/bjh.17306. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33410504.
8. Vafadar Moradi E., Teimouri A., Rezaee R., Morovatdar N., Foroughia M., Layegh et.al. Increased age, neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and white blood cells count are associated with higher COVID-19 mortality. *American Journal Emergency Medicine*. 2021;40:11-4. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.12.003. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33333477; PMCID: PMC7717776.
9. Zhou W., Song L., Wang X., Zheng X., Shudong W., Wang J., Xu H. et al. Cardiac injury prediction and lymphocyte immunity and inflammation analysis in hospitalized patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *International Journal Cardiology*. 2021;326:237-42. DOI: 10.1016/j.ijcard.2020.10.049. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33098952; PMCID: PMC7577874.
10. Seyit M., Avci E., Nar R., Senol H., Yilmaz A., Ozen M., Oskay A. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio, lymphocyte to monocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio to predict the severity of COVID-19. *American Journal Emergency Medicine*. 2021;40:110-4. DOI: 10.1016/j.ajem.2020.11.058. Epub 2020 Dec 6. PMID: 33309506; PMCID: PMC7719281.
11. Magadum A, Kishore R. Cardiovascular Manifestations of COVID-19 Infection. *Cells*. 2020;9(11):2508. DOI: 10.3390/cells9112508. PMID: 33228225; PMCID: PMC7699571.
12. Klok F.A., Kruip M., van der Meer N.J.M., Abruus M.S., Gommers D.A.M.P.J., Rant K.M. et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thrombosis Research*. 2020;191:145-7. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.04.013. Epub 2020 Apr 10. PMID: 32291094; PMCID: PMC7146714.
13. Llitjos J.F., Leclerc M., Chochois C., Monsallan J.M., Ramakers M., Auvray M. et al. High incidence of venous thromboembolic events in anticoagulated severe COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020 Jul;18(7):1743-6. DOI: 10.1111/jth.14869. Epub 2020 May 27. PMID: 32320517; PMCID: PMC7264774.
14. Delshad M., Safaroghli-Azar A., Pourbagheri-Sigaroodi A., Pook B., Shokouhi S., Bashash D. et al. Platelets in the perspective of COVID-19; pathophysiology of thrombocytopenia and its implication as prognostic and therapeutic opportunity. *International Immunopharmacology*. 2021;99:107995. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107995. Epub 2021 Jul 21. PMID: 34304001; PMCID: PMC8295197.
15. Salamanna F., Maglio M., Landini M.P., Fini M. Platelet functions and activities as potential hematologic parameters related to Coronavirus Disease 2019 (Covid-19). *Platelets*. 2020;31(5):627-32. DOI: 10.1080/09537104.2020.1762852. Epub 2020 May 13. PMID: 32397915.
16. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2020;18(4):844-7. DOI: 10.1111/jth.14768. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32073213; PMCID: PMC7166509.
17. Zhang Y., Zeng X., Jiao Y., Li Z., Liu Q., Ye I. et al. Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in patients with COVID-19. *Thrombosis Research*. 2020;193:110-5. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.06.008. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32535232; PMCID: PMC7274097.
18. Marcolino M.S., Ziegelmann P.K., Souza-Silva M.V.R., Nascimento I.S.B., Oliveira L.M., Monteiro L.S. et al. Brazilian COVID-19 Registry Investigators. Clinical characteristics and outcomes of patients hospitalized with COVID-19 in Brazil: Results from the Brazilian COVID-19 registry. *International Journal of Infection Diseases*. 2021;107:300-10. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.01.019. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33444752; PMCID: PMC7801187.
19. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M.V., McGroder C., Stevens S. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nature Medicine*. 2021;27: 601–15.

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О.

БЕТА-КОРОНАВИРУСЫ И ЭНДОКРИННАЯ СИСТЕМА ЧЕЛОВЕКА: НОВЫЕ ДАННЫЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

Новое опасное респираторное заболевание COVID-19 впервые зарегистрировано в Китае в декабре 2019 г., возбудителем которого является SARS-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), принадлежащий к роду бета-коронавирусов. Помимо SARS-CoV-2 род включает SARS-CoV-1 и MERS-CoV. Геном SARS-CoV-2 почти на 80% схож с SARS-CoV-1 и на 50% – с MERS-CoV. Механизмы заражения SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 также схожи и происходят через связывание вируса с белком ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (ACE2), широко представленным в организме человека с преобладающей экспрессией в эндокринных тканях. В связи с этим, SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 поражают органы эндокринной системы, вызывая их повреждение и гормональные изменения, влияющие на прогноз течения COVID-19. Данный обзор литературы посвящен анализу изменений в органах эндокринной системы при инфицировании SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, а также потенциальному влиянию гормонов на восприимчивость к SARS-CoV-2.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-1; SARS-CoV-2; эндокринная система; гипофиз; гипоталамус; надпочечники; щитовидная железа.

Для цитирования: Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О. Бета-коронавирусы и эндокринная система человека: новые данные (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 140-146. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-140-146>

Для корреспонденции: Тренева Екатерина Вячеславовна, канд. мед. наук, доцент каф. гериатрии и возрастной эндокринологии; e-mail: eka1006@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 24.05.2021

Принята к печати 25.03.2022

Опубликовано 25.03.2022

Bulgakova S. V., Treneva E. V., Zakharova N. O.

BETA CORONAVIRUSES AND HUMAN ENDOCRINE SYSTEM: NEW DATA (REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

A new dangerous respiratory disease COVID-19 was first reported in China in December 2019, the pathogen SARS-Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), belonging to the beta coronavirus genus, which, in addition to SARS-CoV-2, includes SARS-CoV-1 and MERS-CoV. The genome of SARS-CoV-2 is almost 80% similar to SARS-CoV-1 and 50% to MERS-CoV. The mechanisms of infection of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 are also similar and occur through the binding of the virus to the type 2 angiotensin-converting enzyme protein (ACE2), which is widely represented in the human body with predominant expression in endocrine tissues. In this connection, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 affect the organs of the endocrine system, causing damage and hormonal changes that affect the prognosis of the course of COVID-19. This literature review is devoted to the analysis of changes in the organs of the endocrine system that occur during infection with SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2, as well as the potential effect of hormones on susceptibility to SARS-CoV-2.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-1; SARS-CoV-2; endocrine system; pituitary gland; hypothalamus; adrenal glands; thyroid gland.

For citation: Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O. Beta coronaviruses and human endocrine system: new data (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 140-146 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-140-146>

For correspondence: Treneva E.V., Ph.D. (Medicine), assistant of the chair of geriatrics and age-related endocrinology; e-mail: eka1006@yandex.ru

Information about authors:

Bulgakova S.V., <http://orcid.org/0000-0003-0027-1786>;

Treneva E.V., <http://orcid.org/0000-0003-0097-7252>;

Zakharova N.O., <http://orcid.org/0000-0001-7501-830X>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.05.2021

Accepted 25.03.2022

Published 25.03.2022

Введение. В декабре 2019 г. в городе Ухань, провинция Хубэй, Китай, впервые описано новое респираторное заболевание, осложнениями которого могут

быть атипичная пневмония и острый респираторный дистресс-синдром с относительно высоким риском смерти пациентов [1]. В марте 2020 г. из-за быстрого и

масштабного распространения инфекции по всем странам ВОЗ объявила пандемию новой болезни и назвала ее COVID-19. Возбудителем этого заболевания является новый коронавирус, называемый SARS-коронавирус 2 (SARS-CoV-2) [1].

Вирус SARS-CoV-2 принадлежит к роду бета-коронавирусов, включающему SARS-CoV-1 и MERS-CoV, вызвавшие эпидемии в 2002 и 2013 годах соответственно. SARS-CoV-2, согласно отчету ВОЗ, от 22 ноября 2020 г., характеризуется большой способностью к распространению – R0 около 3,8 (1,4–6,49) и относительно небольшим уровнем смертности около 2,4% в отличие от MERS с R0 <1 и уровнем смертности 34,4% и SARS с R0 около 1,8 и уровнем смертности 10% [2]. Передача от человека к человеку происходит воздушно-капельным и контактным путями, хотя есть данные и о возможности передачи инфекции воздушным, фекальным или внутриутробным путями. Механизм заражения у SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 аналогичен и происходит через связывание вируса с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (ACE2) широко распространенными в организме человека, с высокой экспрессией в тканях органов эндокринной системы, включая гипофиз, щитовидную железу, надпочечники, яички и участием протеазы TMPRSS2 и, в меньшей степени, катепсинов B (CTSB) и L (CTSL) [3, 4]. С другой стороны, уже в начале эпидемий SARS, MERS и COVID-19 было очевидно, что гормональные и метаболические нарушения могут влиять на исход вирусного заболевания. Например, сахарный диабет является важным фактором риска плохого прогноза и высокой смертности. Что касается инфекции COVID-19, имеются данные, что наиболее значимыми факторами риска смертности являются пожилой и старческий возраст, артериальная гипертензия, ожирение и сахарный диабет [3]. Кроме того, по мнению ряда авторов, синдром Кушинга увеличивает риск смерти, а предшествующая инфекции недостаточность надпочечников снижает реабилитационный потенциал у больных COVID-19 [5]. Таким образом, существующая тесная взаимосвязь между COVID-19 и эндокринной системой, вызвала интерес у эндокринологов к изучению инфекционного процесса и разработке путей профилактики и терапии для пациентов с высоким риском развития нарушений со стороны эндокринной системы [3, 5].

Сходства между SARS-CoV-2 и другими бета-коронавирусами. Анализ последовательности генома показал, что SARS-CoV-2 принадлежит к роду бета-коронавирусов, включающему SARS-CoV-1 и MERS-CoV [1]. Эти коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы с цепью РНК, с большим геномом, приближающимся к 30 kb, и включают четыре структурных белка, а именно, булавовидные отростки – шипы (S), белки нуклеокапсида (N), оболочки (E) и мембраны (M). Белок S отвечает за прикрепление вируса к рецептору и слияние с клеточной мембраной. Белок N взаимодействует с вирусной РНК с образованием рибонуклеопротеина. Белок E помогает сборке вирионов и включает действия ионных каналов; белок M участвует в сборке новых вирусных частиц. Геном SARS-CoV-2 почти на 80% схож с SARS-CoV-1 и на 50% с MERS-CoV. Более того, белки SARS-CoV-2 имеют высокую степень гомологии (примерно 95%) с белками SARS-CoV-1. Среди вирусных белков белок S является наиболее важным для инфицирования клеток мишеней, поскольку он облегчает проникновение вируса. Проникновение вируса зави-

сит от связывания поверхностной единицы S1 белка S с клеточным рецептором, что облегчает прикрепление вируса к поверхности клеток-мишеней [4, 6]. Эти данные предполагают, что SARS-CoV-2 имеет те же клетки-мишени, что и SARS-CoV-1 [4]. С другой стороны, MERS-CoV связывается с дипептидилпептидазой 4 (DPP4), проникая в клетки человека [1].

Влияние гормонов на восприимчивость человека к коронавирусной инфекции.

Глюкокортикоиды и витамин D. Остается открытым вопрос о влиянии лечения больных COVID-19 гормональными препаратами на экспрессию ACE2 в тканях и, как следствие, на распространение вируса. На настоящий момент имеются данные, свидетельствующие о том, что и витамин D и глюкокортикоиды могут увеличивать системную экспрессию рецепторов ACE2 [1, 7].

Однако, согласно этим данным, такое увеличение потенциальных участков для проникновения вируса является только очевидным недостатком и, скорее, оно необходимо для сохранения целостности паренхимы различных тканей, включая эндокринные железы. Фактически, связывание SARS-CoV-2 с человеческим ACE2 вызывает обратную генерацию ангиотензина II (Ang II) через фермент ACE [7]. В свою очередь, гиперпродукция Ang II может стимулировать рост клеток, фиброз, апоптоз эпителиальных клеток, генерацию активных форм кислорода и высвобождение провоспалительных цитокинов, тем самым усиливая воспалительную реакцию. С другой стороны, ACE2 расщепляет Ang II до ангиотензина 1-7 Ang- (1-7), который обладает сосудорасширяющим эффектом, снижает кровяное давление за счет стимуляции синтеза оксида азота (NOS). Противостоя Ang II, Ang- (1-7) снижает гликемию натощак и толерантность к глюкозе, стимулирует пролиферацию β-клеток, предотвращает их апоптоз и нормализует функцию почек [7]. Считается, что соотношение ACE / ACE2 оказывает важное влияние на течение различных заболеваний, включая сахарный диабет, гипертензию, нефропатию, а также на прогноз для пациентов с COVID-19 [7].

Половые гормоны. Хотя мужчины и женщины имеют одинаковую восприимчивость к SARS-CoV-2, мужчины, по-видимому, подвержены более тяжелому течению заболевания и риску смерти независимо от возраста. Действительно, ряд данных указывает на то, что экспрессия TMPRSS2 в тканях человека регулируется активностью рецепторов андрогенов (РА). Разумно предположить, что более высокий уровень экспрессии TMPRSS2 у мужчин может способствовать более тяжелой инфекции COVID-19 по сравнению с женщинами и детьми препубертатного возраста. В отношении этого R. Asselta и соавт. [8], проанализировав геномные базы данных, обнаружили более высокую экспрессию мРНК TMPRSS2 в образцах легких мужчин по сравнению с женщинами ($p = 0,029$), в то время как уровень экспрессии мРНК ACE2 существенно не отличался [8]. Это наблюдение было подтверждено китайскими учеными [9], при этом им не удалось обнаружить никакой разницы в уровне экспрессии ACE2 между мужчинами и женщинами молодого и пожилого возраста [9]. Однако необходимы дальнейшие исследования для подтверждения возможности влияния различной экспрессии TMPRSS2 у мужчин и женщин на патогенность вируса. Кроме того, рассматривалась гипотеза о том, что CAG-повторы гена рецептора андрогенов (РА), регулирующего чувствительность к андроген-

нам, также может быть связан с тяжестью заболевания COVID-19. Согласно этой гипотезе, РА, связанный с андрогенной алопецией, раком простаты, доброкачественной гиперплазией простаты и синдромом поликистозных яичников, может влиять на более высокую восприимчивость к инфекции COVID-19. В соответствии с этими данными, ряд авторов сообщили о непропорционально высокой смертности среди афроамериканских пациентов с COVID-19, для которых характерен более короткий вариант CAG-повтора в РА [10]. Отмечено, что у мужчин, госпитализированных по поводу тяжелого течения COVID-19, была более высокая частота андрогенной алопеции [11]. В подтверждение данной гипотезы командой итальянских ученых был описан защитный эффект антиандрогенной терапии рака простаты по отношению к инфекции SARS-CoV-2 [12], в результате рядом исследователей было предложено применение антиандрогенной терапии для снижения тяжести заболевания [1]. Однако необходимы тщательные проспективные клинические исследования, для подтверждения этой стратегии в качестве адъювантной терапии COVID-19.

Более того, исследования, проведенные как на животных, так и на людях, показали, что подавление андрогенов приводит к увеличению экспрессии ACE2. В связи с чем до настоящего времени не совсем ясно, приводит ли этот эффект к увеличению риска тяжелой инфекции или к защитному действию сверхэкспрессии белка ACE2, что обсуждалось ранее. Более того, андрогены и эстрогены могут влиять на иммунный противовирусный ответ противоположным образом, и частота побочных реакций как на вакцины, так и на противовирусные препараты выше у женщин, чем у мужчин, что необходимо учитывать при выборе тактики [13].

Влияние коронавирусов на эндокринную систему. Исследования распределения белка ACE2 в тканях указывают на максимальную экспрессию ACE2 в тканях легких, энтероцитах и более низкую – в яичках, щитовидной железе, жировой ткани, яичниках и эндотелии. Кроме того, ACE2 был обнаружен в надпочечниках, простате, гипофизе и гипоталамусе [14]. E. Lazartigues и соавт. [15] обнаружили экспрессию мРНК ACE2 и TMPRSS2 в эндокринной ткани как у мужчин, так и у женщин, подтверждая гипотезу о поражении эндокринной системы во время вирусной инфекции у обоих полов. Наконец, поскольку TMPRSS2 был идентифицирован во внеклеточных везикулах, разумно предположить, что эта протеаза может достигать и других тканей за пределами участков своей экспрессии, тем самым способствуя распространению инфекции SARS-CoV-2 [16].

Патологоанатомические исследования, проведенные на материале пациентов, инфицированных SARS-CoV-1 или SARS-CoV-2, демонстрируют различную степень повреждения эндокринных тканей, включая прямое повреждение клеток из-за проникновения вируса и его репликации, васкулита, артериального и венозного тромбоза, гипоксического повреждения клеток, системного иммунного ответа и цитокинового шторма [1, 15, 17].

В частности, тромбоз мелких сосудов различных органов чаще встречался у больных COVID-19, чем у пациентов с SARS-CoV-1, что объясняет возможность SARS-CoV-2 поражать сильно васкуляризованные органы, такие как эндокринные железы, и, в частности, те, которые имеют очень плотную сосудистую сеть, включая гипофиз [17].

SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и гипоталамус/гипофиз.

У больных атипичной пневмонией вследствие SARS-CoV-1 и наличием неврологических симптомов была обнаружена экспрессия рецепторов ACE2 в системе гипоталамус/гипофиз, что привело к предположению о том, что бета-коронавирусная инфекция может влиять на центральную нервную систему (ЦНС) и, как следствие, гипоталамус и гипофиз [15]. Место входа в ЦНС для SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 все еще не определено и может быть, как непрямым через кровоток, так и прямым через решетчатую пластину. Более того, ряд исследователей предполагают, что бета-коронавирусная инфекция может вызывать общее угнетение оси гипоталамус/гипофиз, связанное с системным действием инфекции и гипоксией инфицированных пациентов [1, 12].

При аутопсии у пациентов с SARS-CoV-1 гибридизация *in situ* выявила экспрессию гена РНК-полимеразы SARS-CoV-1 в клетках гипофиза [1]. В 2005 г. J. Gu и соавт. [18] с помощью ПЦР в реальном времени обнаружили последовательности генома SARS в цитоплазме нейронов коры головного мозга и гипоталамуса у 8 пациентов, погибших от SARS инфекции. Кроме того, исследование гипофиза на аутопсии у 5 пациентов с SARS в возрасте от 24 до 51 года показало снижение количества клеток, продуцирующих тиреотропный (ТТГ), адренокортикотропный (АКТГ), соматотропный (СТГ) гормоны и повреждение очаговых клеток. Однако, как предполагают L. Wei и соавт. [19], снижение АКТГ, ТТГ и СТГ-положительных клеток гипофиза могло быть связано с введением глюкокортикоидов. С другой стороны, количество и иммунореактивность клеток, продуцирующих пролактин, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны увеличивалось. Эти данные согласуются с другими исследованиями, описывающими повышенный уровень данных гормонов и снижение уровня тестостерона у мужчин с SARS инфекцией [19, 20]. Кроме того, M.K. Leow и соавт. [21] у 61 человека, переболевшего тяжелым острым респираторным синдромом, при изучении гормонального статуса в течение 3 мес после выздоровления, обнаружили различную степень гипокортицизма у 24 пациенток (39,3%), причем у 12 из них (83,3%) имел место центральный генез заболевания, о чем свидетельствует сопутствующий низкий уровень АКТГ. Примечательно, что пациенты с ранее существовавшими эндокринными нарушениями были исключены из исследования, а эндокринные изменения были обнаружены и компенсированы в течение одного года после выздоровления от SARS [21].

Впервые о присутствии SARS-CoV-2 в ЦНС сообщили L. Zhou и соавт. [22], обнаружившие вирус в спинномозговой жидкости пациентов с COVID-19. Следовательно, разумно предположить, что во время острой фазы системного воспалительного ответа гематоэнцефалический барьер может стать более проницаемым, что позволит вирусу проникнуть в ЦНС, гипоталамус, гипофиз. Исследование, проведенное у 40 пациентов с COVID-19 средней степени тяжести по сравнению с 54 здоровыми людьми контрольной группы, показало значительное снижение уровня СТГ и протеина, связывающего инсулиноподобный фактор роста 3 (ИФРСБ-3) [23]. Для лучшего понимания действия COVID-19 на наиболее васкуляризованные эндокринные железы, в том числе гипоталамус и гипофиз, следует учитывать часто встречающиеся внелегочные микротромбозы, характерные для COVID-19, в отличие от SARS-CoV-1

[17]. Однако необходимы дальнейшие исследования для подтверждения поражения гипоталамуса/гипофиза во время инфекции COVID-19.

SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и щитовидная железа. Ряд данных свидетельствуют о том, что как SARS-CoV-1, так и SARS-CoV-2 могут оказывать влияние на структуру и функцию щитовидной железы. В исследовании, проведенном в 2006 г., оценивалась структура ткани щитовидной железы у 5 умерших от SARS-CoV. Вскрытие показало нарушение фолликулярной архитектуры с различной степенью повреждения фолликулярных клеток и усилением межфолликулярного фиброза [24]. Более того, у пациентов с SARS полностью отсутствовали кальцитонин-продуцирующие клетки, что имело достоверное отличие от результатов контрольной группы [24]. Тест Tunel показал высокий уровень апоптоза у всех пациентов с SARS как в фолликулярном эпителии, так и в межфолликулярной области [24]. Исследования функции щитовидной железы показали, что уровни ТТГ, свободного Т3 и свободного Т4 у пациентов с SARS были значительно ниже, чем в контрольной группе. У этих пациентов уровень свободного Т3 был обратно пропорционален тяжести заболевания. В частности, у пациентов с SARS уровни свободных Т3 и Т4 в сыворотке снизились на 94% и 46% соответственно, в острой фазе и на 90% и 38% во время фазы восстановления [25]. Большая степень морфологического повреждения и количество апоптотических фолликулярных клеток объясняют снижение уровней Т3 и Т4 в сыворотке крови у пациентов с SARS [25]. Напротив, снижение уровня ТТГ у пациентов с TOPC нельзя объяснить разрушением фолликулярного эпителия, поскольку низкие уровни Т3 и Т4 могут привести к более высоким уровням ТТГ.

По данным М.К. Leow и соавт. [21], SARS может вызывать гипотиреоз и, как следствие, центральный гипотиреоз, центральный гипокортицизм. Кроме того, нельзя исключить токсическое действие SARS-CoV-1 на клетки гипоталамуса, продуцирующие тиреотропин – рилизинг – гормон (ТРГ) [18]. Другой гипотезой, объясняющей такой гормональный фон, является синдром низкого уровня Т3, связанный как с тяжелой инфекцией легких с последующей гипоксемией, так и с сопутствующим введением высоких доз глюкокортикоидов [26].

Х.Н. Yao и соавт. [17] при аутопсии щитовидной железы у 3 пациентов, умерших от SARS-CoV-2 не выявили изменений фолликулярных клеток при наличии выраженной интерстициальной лимфоцитарной инфильтрации. Иммуногистохимические исследования и ПЦР-анализ не смогли обнаружить SARS-CoV-2 в ткани щитовидной железы [17].

Аналізу изменений функции щитовидной железы, связанной с SARS-CoV-2 посвящен ряд исследований. Так, М. Chen и соавт. [27], ретроспективно проанализировав группу из 50 пациентов с SARS-CoV-2, обнаружили, что степень снижения уровней ТТГ и общего Т3 положительно связана с тяжестью инфекции COVID-19 при отсутствии у них ранее известных заболеваний щитовидной железы и приема препаратов, влияющих на функцию щитовидной железы. После выздоровления статистически значимых различий в концентрации ТТГ с группой контроля обнаружено не было [27]. Т. Chen и соавт. [28] при исследовании 274 пациентов с SARS-CoV-2 обнаружили, что концентрации ТТГ и свободного Т3 были значительно ниже у умерших пациентов ($n=113$), чем у выздоровевших ($n=161$), в то время как

показатели свободного Т4 статистически не различались. У всех пациентов риск смерти коррелировал с уровнями гормонов щитовидной железы [28]. Эти данные были подтверждены дальнейшими исследованиями [29, 30], в частности, W. Gao и соавт. [29] обнаружили, что уровни свободного Т3 были значительно ниже у пациентов с тяжелым заболеванием COVID-19, а уровни свободного Т3 ниже 3,10 пмоль/л предсказывали высокий риск смерти независимо от всех других причин [29]. Кроме того, Т. Li и соавт. [23] показали, что у пациентов с COVID-19 средней тяжести с 1 по 10 дни заболевания наблюдается падение уровней ТТГ и свободного Т3 и повышение концентрации паратиреоидного гормона (ПТГ) с одновременным снижением содержания витамина D, кальция и альбумина. Снижение уровней ТТГ и свободного Т3 у пациентов с COVID-19, подобно наблюдаемому у пациентов с SARS-CoV-1, может быть связано с синдромом эутиреоидной патологии [26], вызванным как гипоксемией, так и лечением глюкокортикоидами. В. Khoo и соавт. [30] у большой группы пациентов наблюдали умеренное снижение ТТГ и свободного Т4 при поступлении в стационар и нормализацию показателей функции щитовидной железы после выписки. Тем не менее, М. Chen и соавт. [27] выдвинули гипотезу о возможности селективного временного нарушения регуляции гипофиза из-за либо прямого цитотоксического действия вируса на уровне гипофиза, либо косвенного эффекта через активацию провоспалительных цитокинов. Эта гипотеза подтверждалась наблюдением низких значений ТТГ во время инфекции COVID-19 у 34% (17/50) пациентов [27]. С другой стороны, это не согласуется с одновременно нормальными уровнями свободного Т4.

Ряд исследователей описали прямое повреждение ткани щитовидной железы при COVID-19: пациентов беспокоила боль в области шеи, иррадиирующая в челюсть, общая слабость. При ультразвуковом исследовании щитовидной железы выявлены множественные диффузные гипэхогенные области со сниженной васкуляризацией. Лабораторные показатели выглядели следующим образом: высокие уровни как свободного Т4, так и свободного Т3, неопределяемо низкие значения ТТГ в сыворотке. Все эти данные указывают на типичный подострый тиреоидит [31]. Интересно, что симптомы тиреоидита появились у пациенток с легким течением COVID-19 без заболеваний щитовидной железы в анамнезе после исчезновения респираторных симптомов на фоне отрицательного результата ПЦР на вирус, за исключением двух случаев развития подострого тиреоидита одновременно с положительным результатом ПЦР теста.

Кроме того, А. Lania и соавт. [32] при ретроспективном анализе уровней тиреоидных гормонов и сывороточного интерлейкина-6 (ИЛ-6) у 287 пациентов с COVID-19, госпитализированных в отделения интенсивной терапии, обнаружили, что у 58 пациентов (20,2%) был тиреотоксикоз (явный в 31 наблюдении), у 15 (5,2%) – гипотиреоз (явный в 2 наблюдениях), у 214 (74,6%) – эутиреоз. Многофакторный логистический регрессионный анализ показал, что тиреотоксикоз был положительно связан с более высокими уровнями ИЛ-6 (отношение шансов 3,25, 95% доверительный интервал 1,97–5,36; $p < 0,001$).

Эти наблюдения можно объяснить следующим образом: (1) высокая экспрессия ACE2 и TMPRSS2 в щитовидной железе [12] способствует атаке COVID-19

и цитолизу, тем самым запуская автономный воспалительный процесс, который прогрессирует после разрешения COVID-19; (2) системный иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2 может вызвать повреждение цитовидной железы с развитием в последующем тиреотоксикога.

SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и надпочечники. Ряд исследователей предполагают возможную связь между инфекциями SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и первичной, и вторичным надпочечниковой недостаточностью вследствие прямого вирусного повреждения, действия системного воспалительного ответа, общей гипоксии и терапии глюкокортикоидами [1, 14, 15].

При аутопсии у пациентов с SARS-CoV-1 обнаружены экспрессия рецептора ACE2 и присутствие РНК вируса в надпочечниках, выявлена дегенерация и некроз кортикальных клеток из-за прямого действия патогена или васкулита/тромбоза сосудов надпочечников [5, 15, 18]. Однако в настоящее время нет клинических исследований, демонстрирующих первичную надпочечниковую недостаточность, связанную с SARS-CoV-1.

V. A. Zinserling и соавт. [33] при аутопсии 10 пациентов, умерших от COVID-19, описали два типа поражений надпочечников. Первый – инфильтрация иммунными клетками (CD3+ и CD8+) различных слоев коры и окружающей ткани. Второй характеризовался наличием небольших групп пролиферирующих клеток с увеличенными светлыми ядрами. Такие изменения были аналогичны изменениям, наблюдаемым в легких, и считались прямым действием SARS-CoV-2. Следовательно, для больших COVID-19 может быть характерна первичная надпочечниковая недостаточность как из-за прямого вирусного повреждения клеток надпочечников, так и воспалительных/аутоиммунных процессов в этих органах. M. Freire Santana и соавт. [34] при аутопсии у 12 из 28 пациентов (46%) с COVID обнаружили микроскопические поражения надпочечников: ишемический некроз, кортикальные липидные дегенерации, кровотечения, неспецифический очаговый аденалит, тромбоз сосудов, очаги воспаления. Однако потребуются дальнейшие исследования, чтобы доказать присутствие SARS-CoV-2 в ткани надпочечников и окончательно определить механизмы дегенерации и степень потери функции. A.C. Iuga и соавт. [35] у 5 пациентов, умерших от COVID-19, обнаружили преимущественное повреждение сосудов надпочечников, а не других органов. Микроскопическое исследование показало острый фибриноидный некроз артериол коркового и мозгового вещества надпочечников с субэндотелиальной вакуолизацией, без какого-либо значительного воспаления, инфарктов паренхимы или тромбоза. Неясно, вызвана ли васкулопатия надпочечников гипоксией, системным иммунным ответом, прямым эффектом вируса или комбинацией этих событий [35].

Также в литературе описаны 2 случая двустороннего острого кровоизлияния в надпочечники у больных COVID-19. В обоих наблюдениях наличие основного аутоиммунного заболевания на фоне COVID-19 может предрасполагать к развитию нарушений гемостаза, диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), тромбоза с последующим кровотечением в наиболее васкуляризованных органах, таких, как эндокринные железы [36].

SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и яичники. Имеется ряд доказательств восприимчивости яичников к воздей-

ствию SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в связи с экспрессией рецептора ACE2 в этих органах [1, 15].

Доказательств поражения яичников SARS-CoV-1 немного. Иммуногистохимические исследования и исследования гибридизации *in situ* не смогли обнаружить РНК-полимеразу SARS-CoV-1 в яичниках 4 женщин, умерших от SARS [18].

Доказательства поражения яичников SARS-CoV-2 отсутствуют. Следовательно, необходимы дальнейшие исследования для выявления влияния COVID-19 на яичники и женскую фертильность [1].

SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 и яички. Экспрессия рецептора ACE2 в клетках яичек очень высока, в связи с чем разумно предположить, что эти органы могут быть инфицированы как SARS-CoV-1, так и SARS-CoV-2 [15]. Серия аутопсий показала, что орхит является осложнением SARS-CoV-1 [18]. Однако существуют противоречивые данные о присутствии РНК вируса в клетках семенников [1, 18].

M. Yang и соавт. [37] у 11 больных с COVID-19 в возрасте от 42 до 87 лет, средний возраст 65 лет, со средней продолжительностью заболевания 42 дня (от начала до смерти) с помощью микроскопии обнаружили разную степень вакуолизации и разрежения цитоплазмы клеток Сертоли, снижение количества клеток Лейдига в семенниках, в интерстиции присутствовали инфильтраты Т-лимфоцитов и гистиоцитов. Вирусные частицы SARS-CoV-2 в яичках обнаружены только у одного пациента. J.K. Achua и соавт. [38] при аутопсии подтвердили лимфоцитарную и макрофагальную инфильтрацию наряду с нормальным сперматогенезом в 50% случаев. Более того, китайские ученые при исследовании яичек и придатков яичка обнаружили интерстициальный отек, застой, экссудацию эритроцитов в яичках/придатках яичка и истончение семенных канальцев с повышенной концентрацией CD3+ и CD68+ в интерстиции [39]. Высокое количество апоптотических клеток в семенных канальцах и присутствие IgG предполагают нарушение сперматогенеза у пациентов с COVID-19. Оценка спермы 23 пациентов с COVID-19 показала, что у 39,1% ($n=9$) была олигозооспермия, у 60,9% ($n=14$) – высокое количество лейкоцитов. Также в сперме обнаружен повышенный уровень ИЛ-6, TNF-а и MCP-1 по сравнению с контролем. Все образцы спермы были отрицательными на РНК SARS-CoV-2, и у пациентов в анамнезе не отмечено бесплодия или лечения стероидами [39]. Эти результаты сопоставимы с результатами, полученными у больных SARS-CoV-1. Интересно, что исследование, проведенное с участием 81 мужчины, больных COVID-19, и 100 здоровых людей соответствующего пола и возраста контрольной группы, продемонстрировало значительное увеличение сывороточного ЛГ, в то время как соотношение тестостерона к лютеинизирующему гормону, фолликулостимулирующего гормона к лютеинизирующему гормону резко снизилось. Причем уровни тестостерона существенно не отличались между группами. Повышенный уровень лютеинизирующего гормона в сыворотке и пониженное соотношение тестостерона к нему являются клиническим признаком первичного гипогонадизма, предполагая повреждение яичек с вовлечением клеток Лейдига [40]. Однако до сих пор не известно о долгосрочном влиянии COVID-19 на яички. Предполагается возможность рецидива вируса, передача инфекционного агента с семенной жидкостью, влияние на фертильность и криоконсервацию. F. Pan и

соавт. [41] не обнаружили SARS-CoV-2 в семенной жидкости, собранной у 34 пациентов с COVID-19 легкой или средней тяжестью в период от 8 до 75 дня (в среднем 31 день) после диагностики COVID-19, несмотря на то, что 19% из них предъявляли жалобы на дискомфорт в мошонке на момент постановки диагноза COVID-19. В соответствии с этими данными С. Song и соавт. [42] не обнаружили РНК SARS-CoV-2 в сперме 12 пациентов с бессимптомной/легкой формой COVID-19 в период с 14 по 42 день после постановки диагноза COVID-19. Более того, авторам не удалось обнаружить РНК COVID-19 в тканях яичек умерших [42].

В настоящее время только одно исследование D. Li и соавт. [43] смогло определить вирус в 6 из 38 образцов спермы, собранных как у пациентов с острым COVID-19, так и у выздоравливающих. Это открытие контрастирует с предыдущими исследованиями, его следует интерпретировать с осторожностью. Во-первых, это исследование было проведено в специализированном госпитале COVID-19, куда поступали самые тяжелые случаи. Следовательно, более тяжелое течение заболевания сопровождается более высоким титром вируса в крови и более высокой вероятностью распространения на другие органы и ткани, включая сперму. В частности, барьер кровь – яички проницаем для вирусов, особенно в случае системного воспаления и вiremии [44]. Более того, в специализированном госпитале COVID-19 существует высокая вероятность распространения вируса в окружающей среде, могут быть получены ложноположительные результаты из-за попадания респираторных капель. Таким образом, ввиду актуальности вопроса, имеющиеся противоречивые данные указывают на необходимость дальнейших исследований на более крупных когортах инфицированных.

Заключение. SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 относятся к роду бета-коронавирусов, имеют общий механизм проникновения в организм человека через белок ACE2, который широко экспрессируется в органах эндокринной системы. Ряд исследований указывает на то, что оба вируса влияют на структуру и функцию эндокринных желез, поэтому разумно предположить, что в связи с пандемией COVID-19 можно будет ожидать рост эндокринных заболеваний. В связи с чем у больных COVID-19 необходимо оценивать клиническую картину, гормональные изменения как в острой фазе инфекции, так и в период реконвалесценции для своевременного выявления эндокринной патологии, имеющей решающее значение для прогноза у пациента с COVID-19.

В настоящее время исследования эндокринной системы у больных COVID-19 малочисленны, в основном проводятся на небольших группах пациентов или образцах аутопсии, неоднородны с точки зрения дизайна, участников и результатов, что затрудняет сравнение данных. В связи с чем необходимы дальнейшие проспективные исследования для полного понимания механизмов поражения эндокринной системы и выработки тактики ведения этих пациентов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4 – 13, 15 – 44
см. REFERENCES)

3. Мокрышева Н.Г., Галстян Г.Р., Киржаков М.А., Еремкина А.К., Пигарова Е.А., Мельниченко Г.А. Пандемия COVID-19 и эндокринопатии. *Проблемы эндокринологии*. 2020; 66(1): 7-13.

14. Трошина Е.А., Мельниченко Г.А., Сеньюшкина Е.С., Мокрышева Н.Г. Адаптация гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем к новому инфекционному заболеванию — COVID-19 в условиях развития COVID-19-пневмонии и/или цитокинового шторма. *Клиническая и экспериментальная тиреологическая*. 2020; 16(1): 21-7.

REFERENCES

1. Piticchio T., Le Moli R., Tumino D., Frasca F. Relationship between betacoronaviruses and the endocrine system: a new key to understand the COVID-19 pandemic-A comprehensive review. *J. Endocrinol. Invest.* 2021; 1: 1-18.
2. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard, 2:31 pm CEST, 22 Nov 2020.
3. Mokrysheva N.G., Galstyan G.R., Kirzhakov M.A., Eremkina A.K., Pigarova E.A., Mel' nichenko G.A. COVID-19 pandemic and endocrinopathies. *Problemy endokrinologii*. 2020; 66(1): 7-13. (in Russian)
4. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020; 181: 271–80.
5. Isidori A.M., Pofi R., Hasenmajer V., Lenzi A., Pivonello R. Use of glucocorticoids in patients with adrenal insufficiency and COVID-19 infection. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020; 8(6): 472–3.
6. Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Haque S., Sah R., Tiwari R., Malik Y.S. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. *Infez Med.* 2020; 28(2): 174–84.
7. Malek Mahdavi A. A brief review of interplay between vitamin D and angiotensin-converting enzyme 2: implications for a potential treatment for COVID-19. *Rev. Med. Virol.* 2020; 30(5): e2119-21.
8. Asselta R., Paraboschi E.M., Mantovani A., Duga S. ACE2 and TMPRSS2 variants and expression as candidates to sex and country differences in COVID-19 severity in Italy. *Ageing (Albany NY)*. 2020; 12(11):10087–98.
9. Li M.Y., Li L., Zhang Y., Wang X.S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect. Dis. Poverty*. 2020; 9(1): 45-8.
10. Bennett C.L., Price D.K., Kim S., Liu D., Jovanovic BD, Nathan D. et al. Racial variation in CAG repeat lengths within the androgen receptor gene among prostate cancer patients of lower socioeconomic status. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 3599–604.
11. Wambier C.V., Vano-Galvan S., McCoy J., Gomez-Zubiaur A., Herrera S., Hermosa-Gelbard A. et al. Androgenetic alopecia present in the majority of patients hospitalized with COVID-19: The “Gabrin sign”. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2020; 83(2): 680–2.
12. Montopoli M., Zumerle S., Vettor R., Rugge M., Zorzi M., Catapano C.V. et al. Androgen deprivation therapies for prostate cancer and risk of infection by SARS-CoV-2: a population-based study. *Ann. Oncol.* 2020; 31(8): 1040–5.
13. Mishra J.S., Hankins G.D., Kumar S. Testosterone downregulates angiotensin II type-2 receptor via androgen receptor-mediated ERK1/2 MAP kinase pathway in rat aorta. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2016; 17(4): 1470320316674875-7.
14. Troshina E.A., Melnichenko G.A., Senyushkina E.S., Mokrysheva N.G. Adaptation of the hypothalamo-pituitary-thyroid and hypothalamo-pituitary-adrenal systems to a new infectious disease – COVID-19 in the development of COVID-19 pneumonia and/or cytokine storm. *Clinical and experimental thyroidology*. 2020; 16(1): 21-7. (in Russian)
15. Lazartigues E., Qadir M.M.F., Jarvis F.M. Endocrine significance of SARS-CoV-2's reliance on ACE2. *Endocrinology*. 2020; 161(9): 1–7.
16. Chi M., Shi X., Huo X., Wu X., Zhang P., Wang G. Dexmedetomidine promotes breast cancer cell migration through Rab11-mediated secretion of exosomal TMPRSS2. *Ann. Transl. Med.* 2020; 8(8): 531-4.
17. Yao X.H., Li T.Y., He Z.C. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Chin. J. Pathol.* 2020; 49(5): 411–7.

BIOCHEMISTRY

18. Gu J., Gong E., Zhang B., Zheng J., Gao Z., Zhong Y. et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *JEM*. 2005; 202: 417–24.
19. Wei L., Sun S., Zhang J., Zhu H., Xu Y., Ma Q. et al. Endocrine cells of the adenohypophysis in severe acute respiratory syndrome (SARS). *Biochem. Cell Biol.* 2010; 88: 723–30.
20. Ye Y.X., Wang W., Yao H., Li H.M., Sun L.Q., Wang A.S. et al. Change in hormones of related sexual function in patients with severe acute respiratory syndrome. *Label Immunoass. Clin. Med.* 2004; 11: 63–5.
21. Leow M.K., Kwek D.S., Ng A.W., Ong K.C., Kaw G.J., Lee L.S. Hypocortisolism in survivors of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2005; 63: 197–202.
22. Zhou L., Zhang M., Wang J., Gao J. Sars-Cov-2: underestimated damage to nervous system. *Travel. Med. Infect. Dis.* 2020; 36: 101642-5.
23. Li T., Wang L., Wang H., Gao Y., Hu X., Li X. et al. Characteristics of laboratory indexes in COVID-19 patients with non-severe symptoms in Hefei City, China: diagnostic value in organ injuries. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(12): 2447-55.
24. Wei L., Sun S., Xu C., Zhanga J., Xu Y., Zhu H. et al. Pathology of the thyroid in severe acute respiratory syndrome. *Hum. Pathol.* 2007; 38: 95–102.
25. Wang W., Ye Y.X., Yao H. Evaluation and observation of serum thyroid hormone and parathyroid hormone in patients with severe acute respiratory syndrome. *J. Chin. Antituberc. Assoc.* 2003; 25: 232–4.
26. Van den Berghe G. Non-thyroidal illness in the ICU: a syndrome with different faces. *Thyroid.* 2014; 24(10): 1456–65.
27. Chen M., Zhou W., Xu W. Thyroid function analysis in 50 patients with COVID-19: a retrospective study. *Thyroid.* 2021; 31(1): 8-11.
28. Chen T., Wu D., Chen H., Yan W., Yang D., Chen G. et al. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *BMJ*. 2020; 368: m1091-3.
29. Gao W., Guo W., Guo Y., Shi M., Dong G., Wanget G. al. Thyroid hormone concentrations in severely or critically ill patients with COVID-19. *J. Endocrinol. Invest.* 2020; 2020: 1–10.
30. Khoo B., Tan T., Clarke S.A., Mills E.G., Patel B., Modi M. et al. Thyroid function before, during and after COVID-19. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2021; 106: e803–11.
31. Brancatella A., Ricci D., Viola N., Sgrò D., Santini F., Latrofa F. Subacute thyroiditis after sars-COV-2 infection. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020; 105(7): a276-9.
32. Lania A., Sandri M.T., Cellini M., Mirani M., Lavezzi E., Mazziotti G. Thyrotoxicosis in patients with COVID-19: the THYRCOV study. *Eur. J. Endocrinol.* 2020; 183(4): 381–7.
33. Zinserling V.A., Semenova N.Y., Markov A.G., Rybalchenko O.V., Wang J., Rodionov R.N. et al. Inflammatory cell infiltration of adrenals in COVID-19. *Horm. Metab. Res.* 2020; 52(9): 639-41.
34. Freire Santana M., Borba M.G.S., Baia-da-Silva D.C., Val F., Alexandre M.A.A., Brito-Sousa J.D. et al. Case report: adrenal pathology findings in severe COVID-19: an autopsy study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 103(4): 1604–7.
35. Iuga A.C., Marboe C.C., Yilmaz M.M., Lefkowitz J.H., Gauran C., Lagana S.M. Adrenal vascular changes in COVID-19 autopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2020; 144(10): 1159-60.
36. Frankel M., Feldman I., Levine M., Frank Y., Bogot N.R., Benjaminov O. et al. Bilateral adrenal hemorrhage in Coronavirus disease 2019 patient: a case report. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020; 105(12): a487-8.
37. Yang M., Chen S., Huang B., Zhong J.M., Su H., Chen Y.J. et al. Pathological findings in the testes of COVID-19 patients: clinical implications. *Eur. Urol. Focus.* 2020; 6(5): 1124-9.
38. Achua J.K., Chu K.Y., Ibrahim E., Khodamoradi K., Delma K.S., Iakymenko O.A. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections on testis. *World J. Mens Health.* 2021; 39(1): 65-74.
39. Li H., Xiao X., Zhang J., Zafara M.I., Wue C., Longet Y. et al. Impaired spermatogenesis in COVID-19 patients. *E. Clinical Medicine.* 2020; 28: 68-72.
40. Ma L., Xie W., Li D., Shi L., Mao Y., Xionget Y. al. Effect of SARS-CoV-2 infection upon male gonadal function: a single center-based study. *MedRxiv.* 2020; e20037267-70.
41. Pan F., Xiao X., Guo J., Song Y., Li H., Patel D.P. et al. No evidence of severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2 in semen of males recovering from coronavirus disease 2019. *Fertil. Steril.* 2020; 113(6): 1135-9.
42. Song C., Wang Y., Li W., Hu B., Chen G, Xia P. et al. Absence of 2019 novel coronavirus in semen and testes of COVID-19 patients. *Biol. Reprod.* 2020; 103(1): 4-6.
43. Li D., Jin M., Bao P., Zhao W., Zhang S. Clinical characteristics and results of semen tests among men with coronavirus disease 2019. *JAMA Netw Open.* 2020; 3(5): e208292-4.
44. Vishvkarma R., Rajender S. Could SARS-CoV-2 affect male fertility? *Andrologia.* 2020; 52(9): e13712-7.

ИММУНОЛОГИЯ

© ПЕТРОВА О.В., ТВЕРДОХЛЕБОВА Д.К., 2022

Петрова О.В.^{1,2}, Твердохлебова Д.К.¹

НАЛИЧИЕ И КОЛИЧЕСТВО АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ «ГАМ-КОВИД-ВАК»

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

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

Цель – определить наличие и количество специфических антител у лиц, вакцинированных против COVID-19. Проведено исследование 37 сывороток крови взрослых здоровых лиц, привитых против COVID-19 вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (или «Спутник V»), Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи. Взятие крови проводили через 42 дня после введения первого компонента вакцины, и на 3, 4, 5, 6-й месяцы после окончания полного курса вакцинации. Наличие и количество суммарных антител IgM/IgG в сыворотке крови определяли методом иммунохемилюминесцентного анализа на автоматическом иммунохимическом анализаторе «Cobas e 411» («Roche Diagnostics», Германия). Результаты обработаны современными статистическими методами.

Через 42 дня после введения первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» АТ были обнаружены у всех участников исследования, значения их количества были переменными и находились в диапазоне от 36,43 до 265,43 БАУ/мл. Через 3, 4, 5 и 6 месяцев после окончания полного курса вакцинации поствакцинальные АТ были обнаружены у всех участников исследования. Через 6 месяцев после окончания полного курса вакцинации количество антител снизилось на 28,16%.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция; вакцинация; антитела.

Для цитирования: Петрова О. В., Твердохлебова Д. К. Наличие и количество антител после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 147-150. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-147-150>

Для корреспонденции: Петрова Ольга Владимировна, канд. мед. наук, зав. КДЛ; e-mail: students_asma@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 12.11.2021

Принята к печати 28.11.2021

Опубликовано 25.03.2022

Petrova O.V.^{1,2}, Tverdokhlebova D.K.¹

PRESENCE AND QUANTITY OF ANTIBODIES AFTER VACCINATION «GAM-COVID-VAC»

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

²Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414000, Russia

The determine is to study the presence and quantity of specific antibodies in individuals vaccinated against COVID-19. A study of 37 blood serums of healthy adults vaccinated against COVID-19 with the vaccine «Gam-COVID-Vac» (or «Sputnik V»), National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei) was conducted. Blood sampling was carried out 42 days after the introduction of the first component of the vaccine, and 3, 4, 5, 6 months after the end of the full course of vaccination. The presence and quantity of total IgM/IgG antibodies in the blood serum was determined by immunochemiluminescence analysis on an automatic immunochemical analyzer «Cobas e 411» («Roche Diagnostics», Germany). The results were processed by modern statistical methods. 42 days after the introduction of the first component of the vaccine «Gam-COVID-Vac» AT was developed in all study participants, the values of their number were variable and ranged from 36,43 to 265,43 BAU/ ml. 3, 4, 5 and 6 months after the end of the full course of vaccination AT were detected in all study participants. 6 months after the end of the full course of vaccination the number antibodies decreased by 28,16%.

Key words: coronavirus infection; vaccination; antibodies.

For citation: Petrova O.V., Tverdokhlebova D.K. Presence and quantity of antibodies after vaccination «Gam-COVID-Vac».

Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).2022; 67 (3): 147-150 (in Russ.).

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-147-150>

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

Information about authors:

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

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 12.11.2021

Accepted 28.11.2021

Published 25.03.2022

Больше года мир живет в условиях новой коронавирусной инфекции (coronavirus disease 2019, COVID-19), возбудителем которой является коронавирус Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [10 – 12].

Заболевание характеризуется высокой контагиозностью. Оно может протекать бессимптомно, в легкой и тяжелой форме [1-3]. Частота развития тяжелых форм заболевания составляет до 5% от общего количества заболеваемости, которые могут привести к летальному исходу [13-16]. На сегодняшний день COVID-19 переболело более 224 млн человек в мире, погибло от его осложнений более 4,5 млн. человек [https://www.стопкоронавирус.рф]. Одним из способов защиты от инфекции является вакцинация, при которой происходит образование специфических антител.

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано 5 вакцин против COVID-19: «Гам-КОВИД-Вак», «Гам-КОВИД-Вак-Лео», «ЭпиВакКорона», «КовиВак», «Спутник Лайт» [https://www.gosminzdrav.ru. Временные методические рекомендации «Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19»].

«Гам-КОВИД-Вак», «Гам-КОВИД-Вак-Лео» и «Спутник Лайт» – векторные вакцины, созданные сотрудниками Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи. В вакцине использован аденовирус со встроенным в него фрагментом генетического материала SARS-CoV-2, кодирующей информацию S-белка вируса SARS-CoV-2 [https://www.gosminzdrav.ru. Временные методические рекомендации «Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19»].

«ЭпиВакКорона» – пептидная вакцина, созданная сотрудниками Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора. Вакцина состоит из трех пептидов, которые копируют участки S-белка вируса SARS-CoV-2 [https://www.gosminzdrav.ru. Временные методические рекомендации «Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19»].

«КовиВак» – инактивированная вакцина, созданная сотрудниками Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова. В вакцине используется антиген инактивированного вируса SARS-CoV-2 [https://www.gosminzdrav.ru. Временные методические рекомендации «Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19»].

В литературе имеются единичные данные о наличии антител (АТ) после применения вакцин против COVID-19 [7,8,9]. Оценка иммунологической эффективности вакцинации осуществляется с помощью определения специфических антител (АТ) [3 – 6]. В связи с этим представило интерес определить наличие и количество специфических антител у лиц, вакцинированных против COVID-19.

Цель исследования – определить наличие и количество специфических антител у лиц, вакцинированных против COVID-19.

Материал и методы. Исследование носило ретроспективный анализ. В нем приняли участие 37 человек, из них 20 мужчин, 17 женщин, возраст участников в среднем составил – 45,43±2,12 лет. Участники исследования являлись сотрудниками лечебного учреждения,

все дали письменное информирование добровольного участия в наблюдении.

Перед вакцинацией участникам проводили взятие мазков из рото- и носоглотки для полимеразной цепной реакции (ПЦР) на SARS-CoV-2, а также определение наличия суммарных антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови. При наличии отрицательных результатов исследований проводилась иммунизация вакциной «Гам-КОВИД-Вак» (или «Спутник V») Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, которая содержала фрагмент генетического материала SARS-CoV-2, кодирующий информацию S-белка вируса SARS-CoV-2, и состояла из 2-х компонентов. Вакцинация проводилась в два этапа с интервалом в 21 день, в начале вводили первый компонент вакцины в дозе 0,5 мл внутримышечно, через 3 нед – второй компонент в дозе 0,5 мл внутримышечно.

Участники исследования вели дневники наблюдения, в которых отмечали течение поствакцинального периода, побочные явления. В поствакцинальном периоде отмечались следующие побочные явления: повышение температуры тела (7,5%), миалгия (7,5%), астения (7,5%), головная боль (12,5%), боль в месте инъекции (7,5%), диспепсические расстройства (5%). Длительность побочных проявлений составила 3-4 дня.

Взятие крови осуществляли через 42 дня после введения первого компонента вакцины и через 3, 4, 5, 6 месяцев после окончания полного курса вакцинации. Биологическим материалом для определения АТ являлась сыворотка крови, для получения которой проводили пробоподготовку: центрифугирование в течение 10 мин при 1500 об/мин.

Наличие и количество суммарных антител IgM/IgG в сыворотке крови у привитых определяли методом иммунохемилюминесцентного анализа на автоматическом иммунохимическом анализаторе «Cobas e411» (Roche Diagnostics, Германия). В тест-системе в качестве антигена использован рекомбинантный белок, представляющий собой рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка. Интерпретация результатов исследования проводилась согласно инструкции: результат считали положительным, если количество суммарных антител IgM/IgG было равно и более 0,80 Е/мл. Результаты исследования АТ представлены в виде ВАУ/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Excel 2010. Результаты определения антител представлены в виде – М (средние значение), m (ошибка средней), Me (медиана), SD (стандартное отклонение), min (минимальное значение), max (максимальное значение), CV (коэффициент вариабельности). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. В период с декабря 2020 г. по февраль 2021 г. 37 человек прошли полный курс иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Через 42 дня после введения первого компонента вакцины суммарные АТ были обнаружены у всех участников исследования в диапазоне от 36,43 до 265,43 ВАУ/мл, и, в среднем, составили 178,93±9,94 ВАУ/мл, CV при этом составил 45,13% (табл. 1).

Для определения влияния пола на гуморальный иммунитет (выработку АТ после введения вакцины «Гам-КОВИД-Вак») вакцинированных разделили на 2-е группы: мужчины и женщины. У мужчин АТ находились в диапазоне от 45,04 до 265,43 ВАУ/мл и, в среднем, составили 170,39±22,72 ВАУ/мл; у женщин – от 36,43 до 257,20 ВАУ/мл и в среднем составили 181,23±11,13

Значения суммарных антител (BAU/мл) в сыворотке крови вакцинированных

Показатель	Все участники (n=37)	Мужчины (n=20)	Женщины (n=17)
Min	36,43	45,04	36,43
max	265,43	265,43	257,20
M	178,93	170,39	181,23
m	9,94	22,72	11,13
Me	196,45	162,60	201,80
SD	80,76	85,01	80,28
CV,%	45,13	49,89	44,30

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – число наблюдений.

Динамика изменения суммарных антител (BAU/мл) в сыворотке крови вакцинированных (n=37)

Показатель	Сроки наблюдения после вакцинации				
	Через 42 дня	Через 3 мес	Через 4 мес	Через 5 мес	Через 6 мес
Min	36,43	21,24	21,24	16,98	13,20
Max	265,43	256,17	255,66	255,25	255,14
M	178,93	167,57	156,05	148,77	128,55*
m	9,94	8,97	16,63	14,85	19,53
Me	196,45	176,75	145,78	130,35	111,32
SD	80,76	84,61	88,05	80,00	91,56
CV,%	45,13	50,49	56,42	53,77	71,22

Примечание. * – статистическая значимость различий между количеством АТ на 42-й день после введения первого компонента и через 6 мес после окончания полного курса вакцинации ($p < 0,05$).

BAU/мл (см. табл. 1). Статистически значимых различий ($p > 0,05$) между средними значениями АТ у мужчин и женщин не выявлено.

Через 3, 4, 5 и 6 месяцев после окончания полного курса вакцинации АТ были обнаружены у всех иммунизированных «Гам-КОВИД-Вак». Динамика изменения их количества представлена в табл. 2.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что через 3 мес после полного курса вакцинации количество АТ в среднем составило $167,57 \pm 8,97$ BAU/мл; через 4 мес – $156,05 \pm 16,63$ BAU/мл; через 5 мес – $148,77 \pm 14,85$ BAU/мл; через 6 мес – $128,55 \pm 19,53$ BAU/мл.

В поствакцинальном периоде отмечалось снижение средних значений количества АТ (см. табл. 2): через 3 мес после вакцинации средние значения АТ недостоверно снизились ($p > 0,05$) на 6,34% по сравнению со значениями на 42-й день после введения первого компонента; через 4 мес – на 12,79% ($p > 0,05$); через 5 мес – на 16,85% ($p > 0,05$); через 6 мес – на 28,16% ($p < 0,05$).

Обсуждение. Современная эпидемиологическая ситуация (пандемия COVID-19) указывает на необходимость формирования коллективного иммунитета с помощью вакцинации от COVID-19. Малочисленные данные об эффективности и безопасности использования вакцин от данной инфекции являются сдерживающим фактором для формирования коллективного иммунитета. Это послужило поводом для проведения нами исследования: определение наличия и количества специфических антител у лиц, вакцинированных против COVID-19.

Полученные нами результаты показали, что через 42 дня после введения первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» суммарные АТ были обнаружены у всех участников исследования. Значения их количества были переменными, о чем свидетельствует коэффициент вариации (на всех этапах исследования он

был более 40,0%) и диапазон их количества (от 36,43 до 265,43 BAU/мл). Это обусловлено индивидуальными особенностями участников исследования с разной иммунологической реактивностью.

Кроме того, мы не обнаружили влияния пола на гуморальный иммунитет: на количество АТ после проведенной вакцинации.

Изучение динамики изменения количества АТ в поствакцинальном периоде показало наличие их у всех участников исследования через 3, 4, 5 и 6 месяцев после окончания полного курса вакцинации, значения их количества также были переменными. Кроме того, в поствакцинальном периоде отмечалось снижение их количества.

Выводы

На основании полученных результатов исследования можно сделать следующие выводы:

1. Через 42 дня после введения первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» АТ выработались у всех участников исследования, значения их количества были переменными и находились в диапазоне от 36,43 до 265,43 BAU/мл;
2. Через 3, 4, 5 и 6 мес после окончания полного курса вакцинации АТ были обнаружены у всех участников исследования;
3. Через 6 месяцев после окончания полного курса вакцинации количество АТ снизилось на 28,16%.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 8–16 см. REFERENCES)

1. Петрова О.В., Твердохлебова Д.К., Мурыгина О.И., Смелцова Е.В., Никулина Д.М. Диагностические характеристики серологических тестов для выявления случаев SARS-CoV-2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 4: 210-2. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-212.

IMMUNOLOGY

2. Петрова О.В., Твердохлебова Д.К., Никулина Д.М., Тарасов Д.Г. Место серологических тест-систем для выявления антител к SARS-CoV-2 в экстренной кардиохирургии. *Медицинский алфавит*. 2021; (13): 18–21. DOI:10.33667/2078-5631-2021-13-18-21.
3. Петрова О.В., Твердохлебова Д.К., Никулина Д.М., Смелцова Е.В., Грачева Н.П., Левина Н.Н. Длительность циркуляции антител SARS-CoV-2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (Приложение 4): 51.
4. Зверев В.В., Семёнов Б.Ф., Хаитов Р.М. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: Геотар-Медиа; 2011.
5. Львов Д.К. Медицинская вирусология. М.: МИА; 2008.
6. Таточенко В.К., Озерецковский Н.А., Федоров А.М. Иммунопрофилактика-2011. Справочник. М.: Изд-во Союза педиатров России; 2011.
7. Алхутова Н.А., Ковязина Н.А., Бардышева Н.А., Калинина Н.М., Алексанин С.С. Определение антител класса G к SARS-CoV-2 после применения вакцины «Гам-КОВИД-Вак» или «Спутник V» НИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи. *Медицинский алфавит*. 2021; (13): 36–40. DOI:10.33667/2078-5631-2021-13-36-40.
6. Tatochenko V.K., Ozeretskovsky N.A., Fedorov A.M. Immunoprophylaxis-2011 (reference book) [Immunoprofilaktika-2011 (spravochnik)]. Moscow: Izdatel' stvo Soyuza pediatrov Rossii; 2011. (in Russian)
7. Alkhutova N.A., Kovyazina N.A., Bardysheva N.A., Kalinin N.M., Alexanin S.S. Determination of class G antibodies to SARS-CoV-2 after application of 'GamCOVID-Vac' or 'Sputnik V' vaccine of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology n.a. honorary academician N.F. Gamaleya. *Meditsinskiy alfavit*. 2021; (13): 36–40. DOI:10.33667/2078-5631-2021-13-36-40. (in Russian)
8. Burki T.K. The Russian vaccine for COVID-19. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(11): e85-e86. DOI:10.1016/S2213-2600(20)30402-1.
9. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubcova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S. et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations two open non-randomized phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. DOI:10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
10. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 3 95(10223): 507-13. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
11. Cheng V.C., Lau S.K., Woo P.C., Yuen K.Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20(4): 660–94. DOI:10.1128/CMR.00023-07.
12. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(18): 1708-20. DOI:10.1056/NEJMoa2002032.
13. Mo P., Xing Y., Xiao Y., Deng L., Zhao Q., Wang H. et al. Clinical characteristics of refractory COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.* 2020:ciaa270. DOI: 10.1093/cid/ciaa270.
14. Qian G.Q., Yang N.B., Ding F., Ma A.H.Y., Wang Z.Y., Shen Y.F. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of 91 hospitalized patients with COVID-19 in Zhejiang, China: a retrospective, multi-centre case series. *QJM*. 2020; 113(7): 474-81. DOI:10.1093/qjmed/hcaa089. PMID: 32181807; PMCID: PMC7184349.
15. Tan W., Aboulhosn J. The cardiovascular burden of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with a focus on congenital heart disease. *Int. J. Cardiol.* 2020; 309: 70-7.
16. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J. et al. Novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727–33. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.

REFERENCES

1. Petrova O.V., Tverdokhlebova D.K., Murygina O.I., Smeltsova E.V., Nikulina D.M. Diagnostic characteristics of serological tests for the detection of SARS-CoV-2 cases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66 (4): 210-2. DOI:10.51620/0869-2084-2021-66-4-210-2122021; 66 (4): 210-212. (in Russian)
2. Petrova O.V., Tverdokhlebova D.K., Nikulina D.M., Tarasov D.G. Place of serological test-systems for detection of antibodies to SARS-CoV-2 in emergency cardiac surgery. *Meditsinskiy alfavit*. 2021; (13): 18–21. DOI:10.33667/2078-5631-2021-13-18-21. (in Russian)
3. Petrova O.V., Tverdokhlebova D.K., Nikulina D.M., Smeltsova E.V., Gracheva N.P., Levina N.N. Duration of circulation of SARS-CoV-2 antibodies. Duration of circulation of SARS-CoV-2 antibodies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66 (Suppl.4): 51. (in Russian)
4. Zverev V.V., Semjonov B.F., Haitov R.M. Vaccines and vaccinations: national guidelines [Vaktsiny i vaktsinatsiya: natsionalnoe rukovodstvo]. Moscow: Geotar-Media; 2011. (in Russian)
5. L'vov D.K. Medical Virology [Meditsinskaja virusologiya]. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Бухарин О.В., Кузьмин М.Д., Перунова Н.Б., Никифоров И.А., Чайникова И.Н., Иванова Е.В.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ЦИТОКИНОВЫЙ МАРКЕР БЕСПЛОДИЯ МУЖЧИН – ИНТЕРЛЕЙКИН 4

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, обособленное подразделение ФГБУН
ОФИЦ УрО РАН, 460014, г. Оренбург, Россия

Представлен анализ диагностической значимости цитокинов в спермоплазме мужчин репродуктивного возраста (20 – 45 лет) в двух группах: больных хроническим бактериальным простатитом, не осложненным бесплодием и с потерей фертильности. При обследовании пациентов соблюдены акты национального стандарта, исследование спермоплазмы проводили по стандарту ВОЗ. Определение уровня цитокинов в семенной плазме проводили методом ИФА («Цитокин», Россия). Для выявления диагностической значимости в развитии бесплодия цитокинов спермоплазмы использованы два метода математической статистики: дискриминантный анализ и деревья классификаций (деревья решений). Анализ многомерного статистического анализа позволил конкретизировать круг наиболее информативных показателей. Отмечено сходство интерпретаций дискриминантного анализа и дерева решений, где главная роль в обоих случаях принадлежит цитокину ИЛ-4. Диагностическая значимость ИЛ-4 в развитии мужского бесплодия у больных с хроническим простатитом подтверждается двумя методами математической статистики. Уровень спермального ИЛ-4 в сочетании с терапевтическим мониторингом может быть использован для медицинского ведения пациентов с хроническим простатитом с целью профилактики развития бесплодия и для разработки методов скрининговой диагностики нарушений фертильности у мужчин.

Ключевые слова: бесплодие у мужчин; цитокины; интерлейкин 4; бактериальный простатит; дискриминантный анализ; дерево решений.

Для цитирования: Бухарин О.В., Кузьмин М.Д., Перунова Н.Б., Никифоров И.А., Чайникова И.Н., Иванова Е.В. Диагностический цитокиновый маркер бесплодия мужчин – интерлейкин 4. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 151-157. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-151-157>

Для корреспонденции: Перунова Наталья Борисовна, д-р мед. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. инфек. симбиологии; e-mail: perunovanb@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 09.07.2021

Принята к печати 28.09.2021

Опубликовано 25.03.2022

Bukharin O.V., Kuzmin M.D., Perunova N.B., Nikiforov I.A., Chainikova I.N., Ivanova E.V.

DIAGNOSTIC CYTOKINE MARKER OF MALE INFERTILITY – INTERLEUKIN 4

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, separate subdivision OFRC,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 460014, Orenburg, Russia

Analysis of the study is to assess the diagnostic significance of cytokines in the sperm plasma of men of reproductive age (20 – 45 years) of two groups: of patients with chronic bacterial prostatitis, not complicated by infertility and with loss of fertility. The study of sperm plasma – the WHO standard. Determination of the level of cytokines in seminal plasma – by enzyme immunoassay («Cytokine», Russia). Two methods of mathematical statistics were used: discriminant analysis and classification trees (decision trees). The similarity of interpretations of discriminant analysis and decision tree was noted, where the main role in both cases belongs to the cytokine IL-4. The level of sperm IL-4 in combination with therapeutic monitoring can be used for the medical management of patients with chronic prostatitis in order to prevent the development of infertility and to develop methods for screening diagnostics of fertility disorders in men.

Key words: infertility in men; cytokines; interleukin 4; bacterial prostatitis; discriminant analysis; decision tree.

For citation: Bukharin O.V., Kuzmin M.D., Perunova N.B., Nikiforov I.A., Chainikova I.N., Ivanova E.V. Diagnostic cytokine marker of male infertility – interleukin 4. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 151-157 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-151-157>

For correspondence: Perunova N.B., Doctor of Medical Sciences, Professor of the Russian Academy of Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Infectious Symbiology; e-mail: perunovanb@gmail.com

Information about authors:

Bukharin O.V., <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>;

Perunova N.B., <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>;

Nikiforov I.A., <https://orcid.org/0000-0002-1470-9083>;

Chainikova I.N., <https://orcid.org/0000-0002-8923-8829>;

Ivanova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>.

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

Acknowledgment. The study was performed without external funding.

Received 09.07.21

Accepted 28.09.21

Published 25.03.2022

Введение. Проблема бесплодия у мужчин является не такой уж редкой в патологии репродуктивного здоровья и встречается в 13-18% случаев, занимая 3-4 место в урологической практике [1]. В последнее время проблема актуализирована еще и с возникновением эпидемиологической угрозы в связи с эпидемией COVID-19. Вследствие проникновения вируса в тестикулярные клетки может быть нарушен процесс сперматогенеза, что увеличивает риск развития мужской фертильности, даже у лиц молодого возраста. Учитывая, что одним из неблагоприятных исходов течения болезни является бактериальный простатит и развитие бесплодия [2,3], в ранее опубликованной нами работе были показаны выявленные различия в уровне цитокинов, определяемых в спермоплазме больных с хроническим бактериальным простатитом, осложненным бесплодием и без него [4]. Вместе с тем, выявленный широкий спектр цитокинов в семенной плазме представлял интерес ретроспективно оценить диагностическую значимость отдельных цитокинов, играющих важную роль в развитии мужского бесплодия как осложнения хронического бактериального простатита.

В связи с этим мы предприняли попытку проанализировать уровни цитокинов в семенной плазме (спермоплазме) больных хроническим бактериальным простатитом, не осложненным бесплодием и с потерей фертильности. Этот анализ был проведен с использованием двух методов многомерной математической статистики – дискриминантный анализ (ДА) и метод деревьев – принятие решений по полученным нами ранее данным.

Учитывая, что одним из неблагоприятных исходов течения хронического бактериального простатита является развитие бесплодия, в ранее опубликованной нами работе были показаны различия в уровне цитокинов, определяемых в спермоплазме больных с хроническим бактериальным простатитом, осложненным бесплодием и без него [4]. Вместе с тем, учитывая широкий спектр цитокинов, выявляемых в семенной плазме, представляет интерес оценить диагностическую значимость отдельных цитокинов, играющих значительную роль в развитии мужского бесплодия как осложнения хронического бактериального простатита.

Целью настоящего исследования явилась оценка уровня цитокинов в семенной плазме (спермоплазме) больных хроническим бактериальным простатитом, как не осложненным бесплодием, так и с потерей фертильности. Для определения у лиц различных групп цитокиновых диагностических маркеров развития бесплодия на фоне хронического бактериального простатита мы использовали два различных метода статистической обработки материала – дискриминантный анализ (ДА) и метод деревьев (принятие решений).

Материал и методы. Проведено ретроспективное сравнительное рандомизированное исследование, включающее две группы мужчин репродуктивного возраста (20 – 45 лет), больных хроническим бактериальным простатитом, осложненным бесплодием (ХПБП) и без нарушения фертильности (ХП).

Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтической этике Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. При обследовании пациентов соблюдаются акты национального стандарта РФ ГОСТР 52379-2005 о надлежащей клинической практике.

В 1-ю группу вошли 20 пациентов с хроническим бактериальным простатитом, у которых при исследовании эякулята не было выявлено изменений в спермограмме. 2-я группа – 32 пациента с хроническим бактериальным простатитом, осложненным бесплодием, у которых выявлены нарушения в спермограмме.

Пациенты с инфекциями, передаваемыми половым путем, были исключены из исследования.

Алгоритм обследования пациентов включал сбор анамнеза, оценку жалоб, физикальные методы, в том числе трансректальное УЗИ и пальцевое ректальное исследование предстательной железы (ПЖ). Также проводили анкетирование с помощью шкалы оценки симптомов хронического простатита национального института здоровья США (NIH-CPSI) и международного индекса эректильной функции (IIEF-5).

Критерии постановки диагноза хронического бактериального простатита и включения пациентов в исследование:

1. Клинические признаки (один или несколько): боли различной локализации (промежность, над лоном, в яичках, крестце, паховой области и т.д.); расстройство мочеиспускания (учащенное мочеиспускание, вялая или прерывистая струя мочи, чувство неполного опорожнения мочевого пузыря, боль во время мочеиспускания); нарушения эякуляции (преждевременная эякуляция, боли при и после эякуляции, гемоспермия).

2. Увеличение количества лейкоцитов в секрете ПЖ (более 10–15 в поле зрения) или в моче, полученной после массажа ПЖ.

3. Культуральное подтверждение возбудителя ХП.

4. Длительность заболевания не менее 1 года.

5. Возраст 20 – 45 лет.

Исследование эякулята проводили по стандарту ВОЗ. Для исключения ошибок в случае выявления патоспермии при первичном обследовании через 2 нед проводили повторное исследование. Определяли общий объем эякулята, цвет, pH, время разжижения спермы, общее количество сперматозоидов в 1 мл эякулята, их подвижность. Выделяли прогрессивно-подвижные, не прогрессивно-подвижные и неподвижные сперматозоиды. Определяли морфологию, агглютинацию сперматозоидов, клетки сперматогенеза, количество лейкоцитов, эритроцитов, слизь, лецитиновые зерна.

Определение уровня цитокинов (интерлейкины (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17), фактор некроза опухоли (ФНО- α), интерферон (ИФН- α), рецепторный антагонист интерлейкина – 1(РаИЛ-1)) в семенной плазме проводили методом иммуноферментного анализа с использованием наборов «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия). Результаты регистрировали на фотометре Multiskan Labsystems (Финляндия) при длине волны 492 нм. Пороговые значения цитокинов соответствовали минимальной концентрации калибровочных проб наборов ИФА, которые составляли 2,0 пг/мл для ИЛ-4; 5,0 пг/мл для ФНО- α , ИЛ-6, ИФН- α и ИЛ-10; 20,0 пг/мл для ИЛ-17 и ИЛ-8; 50,0 пг/мл для РаИЛ-1.

Аналитические результаты, связанные с исследуемой выборкой, представлены признаками, приведенными в табл. 1 и 2.

Наличие клинического диагноза у обследуемых обеих групп позволяет найти отличия диагностируемых групп (ХП и ХПБП) друг от друга и в многомерном пространстве исследуемых цитокинов. Для выявления диагностически значимых наиболее информативных па-

раметров, определяемых в спермоплазме обследуемых обеих групп пациентов, использовали два метода многомерной математической статистики:

1. Дискриминантный анализ;
2. Деревья классификаций (деревья решений).

Оба метода входят в арсенал статистического комплекса STATISTICA 10.

Результаты. У 32 пациентов (2-я группа) с ХПБП были выявлены нарушения в спермограмме по двум параметрам: подвижность сперматозоидов категории А+В и морфология по Крюгеру (табл. 3). Различия по таким показателям эякулята, как объем, количество сперматозоидов в 1 мл, количество лейкоцитов (млн/мл) были не существенны.

Дискриминантный анализ выполняет расчет линейных дискриминантных уравнений, способных разделить подмножество пациентов исключительно с хроническим простатитом (ХП) и группу больных с бесплодием на фоне хронического простатита (ХПБП). Из всех признаков в качестве значимых и информативных для дискриминантной модели программа отобрала только 5: ИЛ-17, ИЛ-4, ФНО-а, ИЛ-8 и ИНФ-а. Коэффициенты этого уравнения формируют единственный дискриминантный корень ROOT1 со структурой, приведенной в табл. 4.

Поскольку для каждого пациента существует свое решение данного уравнения, график значений ROOT1 по всей выборке отражает главную тенденцию различия больных с разными диагнозами:

- для хронического простатита значения ROOT1 в большинстве случаев ниже нулевых;

- для случаев хронического простатита, осложненного бесплодием, значения ROOT1 характеризуются положительными значениями дискриминантного корня.

На построенном по данным дискриминантного анализа графике значений Root1 наблюдается явное различие наблюдений больных с разными диагнозами. Анализ дискриминантного уравнения, представленного в нижней части рис. 1, показывает, что для хронического простатита (ХП, см. рис. 1) значения дискриминантного корня Root1 в большинстве случаев ниже нулевых, а высокие положительные значения Root1 характерны для больных с бесплодием (ХПБП, см. рис. 1). Это сопровождается значительным ингибированием значений ИЛ-4 и в меньшей степени ИЛ-17 и ФНО-а. Одно-

временно с этим происходит некоторый рост значений ИЛ-8 и ИНФ-а.

Таким образом, появляются свидетельства потери фертильности (другими словами рост значений Root1) при интенсивном снижении значений ИЛ-4 (коэффициент -1.08) и в меньшей степени ИЛ-17 и ФНО-а. На фоне этого значения ИЛ-8 и ИНФ-а незначительно возрастают (коэффициенты 0.56 и 0.58 соответственно).

Таблица 1

Эталонный массив данных клинической выборки больных хроническим бактериальным простатитом без бесплодия (ХП)

№	ФНО-а	ИНФ-а	РаИЛ-1	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-17
1.	6.2	15	191	260	0	40	5.9	210
2.	7.9	11	326	125	51	37	5.2	190
3.	0	9.0	272	109	49	33	4.9	464
4.	6.6	8.0	321	100	58	41	6.1	322
5.	10.1	8.0	1508	113	48	36	5.8	210
6.	6.4	8.0	2489	104	105	38	5.8	281
7.	15.6	7.0	191	101	0	41	5.4	332
8.	8.4	8.6	310	109	51	33	5.1	220
9.	7.2	9.2	1587	264	49	35	5.4	180
10.	4.6	15.1	210	120	0	32	5.1	461
11.	14.5	9.9	264	110	54	40	5.0	341
12.	0	9.2	320	251	0	36	5.7	210
13.	7.5	7.5	1826	115	47	30	5.3	413
14.	8.0	8.2	182	123	53	41	6.1	332
15.	12.5	8.9	329	111	58	40	4.9	210
16.	6.8	9.4	2116	252	0	34	6.0	190
17.	15.1	7.9	190	110	47	37	5.5	219
18.	0	8.3	339	112	52	31	5.2	322
19.	7.1	8.2	326	115	58	38	6.0	210
20.	6.7	8.7	1498	113	0	40	5.6	460

Примечание. Здесь и в табл. 2: значения цитокинов приведены в пг/мл; 0 – значения уровня цитокина ниже порога чувствительности ИФА-анализа.



Рис. 1. График изменений дискриминантного корня Root1 у больных хроническим простатитом и у больных хроническим простатитом, осложненным бесплодием.

Таблица 2

Эталонный массив данных клинической выборки больных хроническим бактериальным простатитом, осложненным бесплодием (ХПБП)

№	ФНО-α	ИНФ-α	РаИЛ-1	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-17
1.	5.7	18	877	233	0	40	5.1	210
2.	7.4	9.0	581	104	0	39	5.0	271
3.	6.4	19	474	218	69	37	5.0	312
4.	7.6	8.0	1279	107	317	37	5.1	292
5.	6.8	7.0	393	110	0	39	5.0	170
6.	6.2	9.0	272	107	49	39	5.1	220
7.	0	9.0	245	104	49	38	0	251
8.	6.1	9.0	272	98	49	35	5.8	241
9.	7.5	8.0	245	103	0	35	14.8	220
10.	7.9	8.0	527	109	252	38	5.2	271
11.	9.4	17	259	104	0	34	5.8	281
12.	5.8	7.0	232	103	60	36	6.1	220
13.	7.3	8.0	259	109	70	34	5.7	109
14.	5.6	9.0	1279	212	135	48	5.4	261
15.	5.2	9.0	232	106	55	34	5.1	261
16.	5	7.0	111	101	49	38	0	231
17.	7.5	9.0	312	106	0	38	5.2	190
18.	5.2	7.0	191	101	48	36	0	261
19.	5.9	7.0	514	110	0	36	5	312
20.	5.8	8.0	272	106	0	35	5.4	271
21.	0	8.0	2448	101	51	34	0	108
22.	9.4	10	903	106	143	40	5.4	180
23.	6.1	9.0	111	107	0	36	5.7	180
24.	8.0	8.0	1696	106	253	40	5.9	241
25.	7.2	8.0	648	104	0	35	5.6	281
26.	6.2	7.0	809	107	136	40	5.1	342
27.	5.3	7.0	554	100	0	37	5.5	220
28.	7.3	7.0	205	107	49	39	6.6	220
29.	0	8.0	1092	106	125	39	5.1	200
30.	6.0	9.0	326	106	46	40	5.5	261
31.	7.5	8.0	232	115	49	41	5.3	231
32.	6.3	7.0	756	104	0	35	5.6	190

Дерево классификаций или дерево решений строится по данным содержания исследуемых цитокинов в спермоплазме для разработки индуктивных правил распознавания диагнозов. Правила генерируются при обобщении множества отдельных наблюдений, описывающих предметную область, представленную клинической выборкой.

Форма решения представляется древовидной иерархией, построенной путем статистического распознавания клинических диагнозов через набор информативных показателей. Они вычисляются независимо от определенных ранее при дискриминантном анализе, что позволяет сравнить результаты обоих методов. Удачный вариант такого дерева решений представлен на рис. 2.

Таблица 3

Показатели эякулята пациентов обеих обследуемых групп

Параметры	1-я группа (n=20)	2-я группа (n=32)
Объем эякулята	3,2±0,22	3,4±0,24
Количество сперматозоидов, мл	41,4±2,6	38,2±2,7
Подвижность сперматозоидов категории А+В, %	64,1±2,2	28,4±1,8*
Морфология по Крюгеру, %	8,1±1,6	3,8±1,2*
Концентрация лейкоцитов, млн/мл	1,8±0,2	2,1±0,3
Клетки сперматогенеза, %	2,4	3,6

Примечание. * – $p \leq 0,05$ при сравнении 1-й и 2-й группы.

Таблица 4

Структура дискриминантного корня ROOT1

Признаки	ROOT1
ИЛ-4	-1.07758
ИЛ-17	-0.84177
ФНО-α	-0.72913
ИЛ-8	0.55865
ИНФ-α	0.57827

Интерпретация диаграммы дерева решений состоит в описании природы и компонентных связей каждого уровня возникшей древовидной структуры. Дерево состоит из 5-ти уровней, которые распадаются на ветви, продолжающие делиться, и листья, которые уже делению не подвержены.

Деления каждой ветви означают дифференциацию пациентов на группы ХП и ХПБП. По мере формирования дерева, от уровня к уровню эта классификация становится все более точной, достигая в конце тех же значений, что и в исходной клинической выборке.

В нашем случае общая численность ХПБП складывается из контингентов Листа № 8 – это 3 человека и листа № 10, на котором разместилось 29 человек. Сумма составляет 29+3=32 человека.

Численность больных с хроническим простатитом можно подсчитать, сложив листья 3, 7, 9 и 11. Это в сумме составит: 10+4+4+2= 20 больных ХП. Общий исходный массив включает 32+20=52 человека. Эти числа полностью совпадают с данными исходной таблицы, что означает безусловную правильность нашего решения.

Вклад каждого признака (уровень цитокина в эякуляте) в распознавании диагнозов, т.е. формы заболевания (хронический простатит и хронический простатит, осложненный бесплодием), необходимых для построения дерева классификации, представлен на гистограмме (рис. 3).

Анализируя эти данные (рис. 3), следует отметить сходство наших интерпретаций дискриминантного анализа и дерева решений, где главная роль в обоих случаях принадлежит цитокину ИЛ-4, который причастен к формированию двух уровней и шести ветвей/листьев дерева решений. Роль остальных признаков значительно скромнее. И только ИЛ-17 и ФНО-α проявили себя, создав по 2 ветви/листа каждая.

Оценивая в целом полученные материалы, следует отметить, что при анализе исследуемых признаков (со-

Классификационное дерево таблицы 1 (Diagnosis)

Число развилок = 5; Количество листьев (решений) = 6

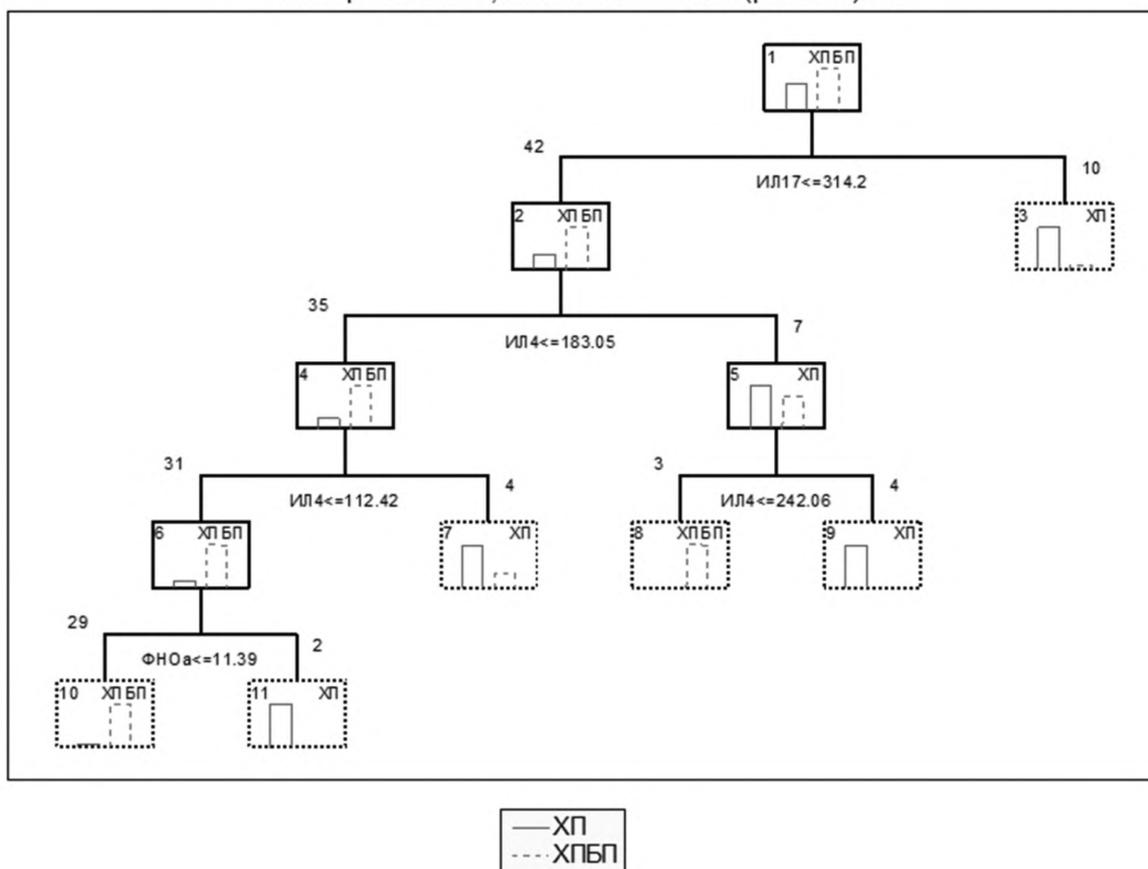


Рис. 2. Структура дерева решений исследуемой клинической выборки.

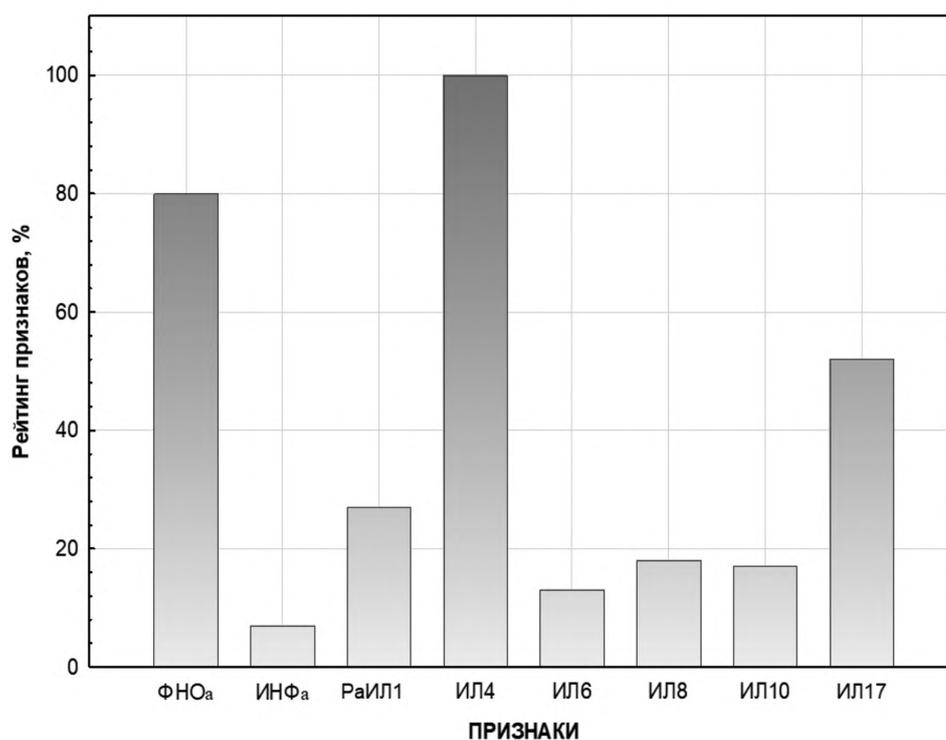


Рис. 3. Рейтинг информативных признаков формирования дерева решений.

держание провоспалительных – ИЛ-17, ИЛ-8, ФНО- α , ИНФ- α , ИЛ-6 и противовоспалительных – ИЛ-10, ИЛ-4, РаИЛ-1 цитокинов в спермоплазме) при диагностике бесплодия с применением двух методов многомерного статистического анализа удалось конкретизировать круг наиболее информативных показателей.

Обсуждение. Обсуждение накопленных данных по диагностике бесплодия у мужчин представляет известные трудности, связанные с большим разбросом и некоторой «пестротой» имеющихся материалов.

Основными источниками цитокинов, встречающихся в мужском репродуктивном тракте, являются семенники и, в частности, тестикулярные макрофаги, хотя некоторые цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) в физиологических условиях также продуцируются интегральными тестикулярными соматическими клетками, такими, как клетки Лейдига и Сертоли [5–7]. Кроме того, в семенной плазме здоровых мужчин, независимо от наличия инфекций, могут присутствовать и другие цитокины, хемокины, рецепторы, включая ИЛ-2, ИЛ-4 – ИЛ-8, ИЛ-10 – ИЛ-13, ИЛ-17 и ИЛ-18 [8–10].

Следует отметить, что поддержание баланса между системным иммунитетом и «иммунопривилегированным» статусом гонад зависит, в частности, от функции цитокинов, выполняющих как роль провоспалительных медиаторов, так и их ингибиторов [11]. Функция ФНО- α отличается от остальных цитокинов, поскольку он действует на андрогенный рецептор, регулирующий активность тестостерона. Тем самым, цитокины семейства ФНО- α способствуют выживанию клеток в процессе сперматогенеза [12]. ФНО- α влияет на сперматогенез и функцию сперматозоидов с помощью нескольких путей, таких как снижение выработки тестостерона и/или регулирование доли гормонов в частях яичка (из клеток Сертоли). Кроме того, ФНО- α оказывает прямое влияние на подвижность сперматозоидов [7]. Таким образом, ФНО- α участвует в регуляции стероидогенеза, а также в выживании зародышевых клеток и секреторной функции клеток Сертоли и Лейдига.

Иммунному привилегированному статусу яичка наряду с другими механизмами способствуют тестикулярные клетки, такие как клетки Сертоли, клетки Лейдига, тестикулярные макрофаги и регуляторные Т-лимфоциты, продуцируя противовоспалительные цитокины и другие иммуносупрессивные факторы [13]. Тем самым, цитокины выполняют важную функцию в развитии и функционировании яичек, которые, в целом, связаны с фертильностью и ее патологией [14].

Как уже было показано, содержание ИЛ-1 β , ИЛ-4 и ИЛ-10 в семенной плазме тесно связано с репродуктивной способностью мужчин. Повышение или снижение этих цитокинов отражает состояние иммунитета и/или инфекцию репродуктивной системы, а также влияет на функцию сперматозоидов [15]. Однако многие исследования, посвященные влиянию цитокинов и факторов роста на функцию сперматозоидов, дали противоречивые результаты. Например, большинство исследователей предположили, что цитокины, обнаруженные в семенной плазме, связаны с лейкоцитоспермией и они не часто являются причиной аномалий сперматозоидов.

Полученные нами результаты с использованием двух доказательных методов многомерной статистики подчеркивают значимость отдельных групп цитокинов в течении хронического бактериального простатита и

развитии одного из его осложнений – бесплодия. Наиболее информативная роль (по данным значений дискриминантного корня Root1) для диагностики такого вида бесплодия оказалась у ИЛ-4 (более низкие уровни в спермоплазме бесплодных мужчин по сравнению с его содержанием у лиц с хроническим простатитом без нарушения фертильности) в сочетании с ИЛ-17 и ФНО- α (по данным значений дискриминантного корня Root1), хотя вклад ИЛ-17 и ФНО- α был менее значим. Диагностическая значимость снижения содержания в спермоплазме ИЛ-4 была установлена и с использованием метода «дерево решений», который показал причастность данного цитокина к формированию двух уровней и шести ветвей/листьев дерева решений.

В более ранних работах [15] также было показано, что содержание ИЛ-4 (наряду с ИЛ-10) в семенной плазме мужчин с нарушением фертильности было достоверно ниже, чем в группе здоровых. Это дало основание авторам заключить, что содержание ИЛ-4 и ИЛ-10 существенно связано со свойствами сперматозоидов, их влиянием на репродуктивную функцию мужчин и отражает состояние иммунитета и инфекционного процесса в указанном биотопе. Другие авторы [16] в качестве критериев иммунного прогноза обострения хронического простатита предлагали использовать такие маркеры, как ФНО- α и ИЛ-1 β , однако, нарушение фертильности в данных исследованиях не рассматривалось.

В работе S. Gupta, A. Kumar [13] отмечается, что между гипоталамо-гипофизарно-гонадной осью (ГГГ) и иммунной системой действуют двунаправленные связи. Инфекция или другие воспалительные стимулы приводят к активации врожденной иммунной системы, в частности, к активации макрофагов, это, в свою очередь, запускает серию событий, которые влияют на ось ГГГ на всех уровнях и оказывают пагубное влияние на мужские репродуктивные характеристики гонад. Нарушается секреция гонадотропинов, а также стероидогенез яичек и сперматогенез. Цитокины, продуцируемые во время воспаления, могут подавлять активность многих ферментов, участвующих в стероидогенезе, таких, как стероидогенный регуляторный белок StAR, и генов (*CYP11A1*, *HSD3B* и *HSD17B*), кодирующих стероидогенез в клетках Лейдига [13].

Заключение. В результате проведенного дискриминантного анализа был определен единственный дискриминантный корень, что подтверждает корректность проведенной клинической диагностики и достоверность дискриминантного метода. Поскольку исследуемых групп пациентов только две (ХП и ХПБП), они были успешно разделены одной многомерной линией.

Установлено, что оба примененных метода (дискриминантный анализ и деревья классификаций) не противоречат, а гармонично дополняют друг друга, определяя близкие наборы информативных признаков. Снижение значений ИЛ-4 в обоих методах сопровождалось возрастанием числа больных с мужским бесплодием, что доказательно подтверждает диагностическую значимость ИЛ-4 в исследовании этого процесса.

Проведенные исследования заслуживают дальнейшего продолжения для разработки методов скрининговой диагностики нарушений фертильности у мужчин. Использование двух методов многомерного анализа (ДА и метод деревьев) однозначно показало, что диагностическим маркером мужского бесплодия может служить ИЛ-4.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 3, 5 – 15 см. REFERENCES)

4. Бухарин О.В., Кузьмин М.Д., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А. Характеристика микробиоты и цитокинового профиля спермоплазмы у больных хроническим бактериальным простатитом. *Урология*. 2020; 5:67-72. DOI: 10.18565/urology.2020.5.67-72.
16. Разумов С.В., Медведев А.А., Чирун Н.В., Сивков А.В., Ощепков В.Н., Синушкин В.Н. Роль цитокинов в диагностике хронического простатита. *Урология*. 2003; 6: 25-8. PMID: 14708240.

REFERENCES

1. Shiva M., Gautam A.K., Verma Y., Shivgotra V., Doshi H., Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin. Biochem.* 2011; 44:319–24. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2010.11.009.
2. Renu K., Subramaniam M.D., Chakraborty R., Myakala H., Iyer M., Bharathi G. et al. The role of Interleukin-4 in COVID-19 associated male infertility – A hypothesis. *J. Reprod. Immunol.* 2020; 142:103213. DOI: 10.1016/j.jri.2020.103213.
3. Fan C., Li K., Ding Y., Lu W., Wang J. ACE2 Expression in Kidney and Testis May Cause Kidney and Testis Damage After 2019-nCoV Infection. *Frontiers in Medicine*. 2020. DOI: 10.3389/fmed.2020.563893.
4. Bukharin O.V., Kuzmin M.D., Perunova N.B., Ivanova E.V., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A. Characterization of the microbiota and cytokine profile of sperm plasma in men with chronic bacterial prostatitis. *Urologiya*. 2020; 5:67-72. (in Russian)
5. Guazzone V.A., Jacobo P., Theas M.S., Lustig L. Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microsc. Res. Tech.* 2009; 72(8):620-8. PMID: 19263422. DOI:10.1002/jemt.20704.
6. Allam J.P., Fronhoffs F., Fathy A., Novak N., Oltermann I., Bieber T. et al. High percentage of apoptotic spermatozoa in ejaculates from men with chronic genital tract inflammation. *Andrologiya*. 2008; 40:329–34. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2008.00864.x.

7. Qian L., Sun G., Zhou B., Wang G., Song J., He H. Study on the Relationship Between Different Cytokines in the Semen of Infertility Patients. *Am. J. of Reprod. Immunol.* 2011; 66:157-61. PMID: 21244563. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2010.00980.x.
8. Kokab A., Akhondi M.M., Sadeghi M.R., Modarresi M.H., Aarabi M., Jennings R. et al. Raised inflammatory markers in semen from men with asymptomatic chlamydial infection. *J. Androl.* 2010; 31(2):114-20. PMID: 19779210. DOI: 10.2164/jandrol.109.008300.
9. Martinez-Prado E., Camejo Bermúdez M.I. Expression of IL-6, IL-8, TNF-alpha, IL-10, HSP-60, anti-HSP-60 antibodies, and anti-sperm antibodies, in semen of men with leukocytes and/or bacteria. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(3):233-43. PMID: 20055787. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2009.00786.x.
10. Havrylyuk A., Chopyak V., Boyko Y., Kril I., Kurpysz M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent. Eur. J. Immunol.* 2015; 40(3):337-44. PMID: 26648778. DOI: 10.5114/ceji.2015.54596.
11. Jacobo P., Guazzone V.A., Theas M.S., Lustig L. Testicular autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2011; 10(4):201-4. PMID: 20932942. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.09.026.
12. Cavalcanti M.C., Steilmann C., Failing K., Bergmann M., Kliesch S., Weidner W. et al. Apoptotic gene expression in potentially fertile and subfertile men. *Mol. Hum. Reprod.* 2011; 17(7):415-20. PMID: 21317160. DOI: 10.1093/molehr/gar011.
13. Gupta S., Kumar A. Immune System. In book: Basics of Human Andrology. Kumar A., Sharma M., eds. Singapore: Springer; 2017. DOI: 10.1007/978-981-10-3695-8_21.
14. Loveland K.L., Klein B., Pueschl D., Indumathy S., Bergmann M. et al. Cytokines in Male Fertility and Reproductive Pathologies: Immunoregulation and Beyond. *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 2017; 8:307. PMID: 29250030. DOI: 10.3389/fendo.2017.00307.
15. Zhang J., Gao J. Determination of IL-1beta, IL-4 and IL-10 contents in the seminal plasma of infertile patients and its clinical value. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2004; 10(11):851-4. PMID: 15595690.
16. Razumov S.V., Medvedev A.A., Chirun N.V., Sivkov A.V., Oshchepkov V.N., Siniukhin V.N. Role of cytokines in the diagnosis of chronic prostatitis. *Urologiya*. 2003; 6:25-8. PMID: 14708240. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© ШИПИЦЫНА И.В., ОСИПОВА Е.В., 2022

Шипицына И.В., Осипова Е.В.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ В ОТНОШЕНИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, 640014, Курган, Россия

*Длительная антибактериальная терапия, нерациональное использование препаратов в лечении остеомиелита может привести к появлению панрезистентных штаммов. Существующие схемы антибиотикопрофилактики гнойно-септических осложнений устаревают и нуждаются в корректировке. Необходим мониторинг резистентности микроорганизмов с целью выявления неэффективных антибактериальных препаратов. Цель работы: проанализировать профили резистентности энтеробактерий, изолированных от пациентов с хроническим остеомиелитом, к препаратам цефалоспоринового ряда за трёхлетний период. Проанализированы профили резистентности 912 клинических штаммов энтеробактерий: *Klebsiella pneumoniae* (n=349), *Proteus* sp. (n=208), *Escherichia coli* (n=176), *Enterobacter cloacae* (n=179) за период с 2018-2020 гг. к препаратам цефалоспоринового ряда. В 2018 г. к цефалоспорином I поколения резистентны в среднем 66,2% энтеробактерий, в 2019 г. – 78,7%, в 2020 г. – 79,5%. Цефалоспорины II поколения наиболее активны в отношении *Proteus* sp., но к 2020 г. наблюдалось снижение клинического эффекта. Среди цефалоспоринов III поколения в 2018 г. наибольшую активность проявлял цефотаксим, однако в 2020 г. количество устойчивых штаммов увеличилось вдвое и составило 86,3%. Цефтазидим активен в отношении 47,1% изолятов энтеробактерий в 2018 г., в 2019 г. – 45% штаммов, в 2020 г. – 37,2% штаммов бактерий. Высокая активность цефтриаксона отмечена только в 2018 г. в отношении штаммов *Proteus* sp. Препараты IV поколения в 2018 г. наибольшую активность проявляли к бактериям рода *Proteus*, наименьшую – в отношении *K. pneumoniae*. В период 2019-2020 гг. наблюдалось значимое снижение эффективности цефепима. Мониторинг профилей резистентности к антибиотикам цефалоспоринового ряда выявил их низкую эффективность в отношении энтеробактерий, выделенных из ран и свищей пациентов с хроническим остеомиелитом, что показывает нецелесообразность их эмпирического применения.*

Ключевые слова: остеомиелит; резистентность; цефалоспорины; энтеробактерии.

Для цитирования: Шипицына И. В., Осипова Е. В. Эффективность цефалоспоринов в отношении энтеробактерий, изолированных от пациентов с хроническим остеомиелитом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 158-162 DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-158-162>

Для корреспонденции: Шипицына Ирина Владимировна, канд.биол.наук, науч. сотр. научно-клинической лаб. микробиологии и иммунологии; e-mail: ivschimik@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 14.10.2021

Принята к печати 01.11.2021

Опубликовано 25.03.2022

Shipitsyna I. V., Osipova E. V.

EFFICACY OF CEPHALOSPORINS AGAINST ENTEROBACTERIA ISOLATED FROM PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS

Russian Ilizarov Scientific Centre "Restorative Traumatology and Orthopaedics" of the RF Ministry of Health, Kurgan, Russian Federation, 640014

*Long-term antibiotic therapy, as well as inappropriate use of drugs in the treatment of osteomyelitis, can lead to the appearance of pan-resistant strains. The existing antibiotic prophylaxis regimens for purulent-septic complications are outdated and need to be adjusted. In this regard, it is necessary to monitor the resistance of microorganisms in order to identify ineffective antibacterial drugs. To analyze the resistance profiles of Enterobacteriaceae isolated from patients with chronic osteomyelitis to cephalosporin drugs over a three-year period. The resistance profiles of 912 clinical strains of Enterobacteriaceae were analyzed: *Klebsiella pneumoniae* (n=349), *Proteus* sp. (n=208), *Escherichia coli* (n=176), *Enterobacter cloacae* (n=179) for the period from 2018-2020 to cephalosporin drugs. In 2018, 66.2% of Enterobacteriaceae were resistant to the 1st generation cephalosporins, in 2019 – 78.7%, in 2020 – 79.5%. Generation II cephalosporins were most active against *Proteus* sp. bacteria, but a decrease in clinical effect was observed by 2020. Among the third generation cephalosporins in 2018, cefotaxime was most active, but in 2020 the number of resistant strains doubled and amounted to 86.3%. Ceftazidime was active against 47.1% of Enterobacteriaceae isolates in 2018, in 2019 – 45% of strains, in 2020 – 37.2% of bacterial strains. High activity of ceftriaxone was noted only in 2018 against *Proteus* sp. Preparations of the IV generation in 2018 showed the highest activity against bacteria of the genus *Proteus*, the least – against bacteria *K. pneumoniae*. In the period from 2019-2020, a significant decrease in the effectiveness of cefepime was observed. The monitoring of the resistance profiles to antibiotics of the cephalosporin series revealed their low efficacy against Enterobacteriaceae isolated from wounds and fistulas of patients with chronic osteomyelitis, which shows the inexpediency of their empirical use.*

Key words: osteomyelitis; resistance; cephalosporins; Enterobacteriaceae.

For citation: Shipitsyna I. V., Osipova E. V. Efficacy of cephalosporins against enterobacteria isolated from patients with chronic osteomyelitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 158-162 (in Russ.) DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-158-162

For correspondence: Shipitsyna I. V., Ph.D. of Biological Sciences, Scientific-and-Clinical Laboratory of Microbiology and Immunology, researcher; e-mail: IVSchimik@mail.ru

Information about authors:

Shipitsyna I. V., <https://orcid.org/0000-0003-2012-3115>;
Osipova E. V., <https://orcid.org/0000-0003-2408-4352>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 14.10.2021

Accepted 01.11.2021

Published 25.03.2022

Введение. Рациональная антибактериальная терапия является важным инструментом в лечении хронического остеомиелита и определяется рядом факторов, в том числе видом возбудителя и его чувствительностью к антимикробным препаратам (АМП) [1-4]. При антибиотикотерапии остеомиелита предпочтительны АМП цефалоспоринового ряда (цефтриаксон, цефазолин и др.), аминогликозиды (амикацин), фторхинолоны (ципрофлоксацин) [5-9]. Данные АМП способны проникать во многие ткани организма, редко вызывают аллергические реакции, хорошо сочетаются с другими препаратами [5-9].

По частоте назначения при остеомиелите цефалоспорины занимают одну из лидирующих позиций. Они более устойчивы, в сравнении с пенициллинами, к гидролитическому действию стафилококковых β -лактамаз, обладают низкой степенью связывания с белками сыворотки крови [10, 11]. Цефалоспорины чаще применяются для лечения остеомиелита, вызванного бактериями рода *Staphylococcus* [7, 11]. В этиологии хронического остеомиелита в последние годы наблюдается тенденция к увеличению числа грамотрицательных микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) [12-15]. Данные бактерии обладают сниженной чувствительностью, в сравнении со стафилококками, ко многим АМП цефалоспоринового ряда в связи с продукцией плазмидных β -лактамаз широкого и расширенного спектра действия, разрушающих АМП [10, 15, 16].

Длительная антибактериальная терапия, не рациональное использование АМП в лечении инфекции, приводит к появлению штаммов бактерий с приобретённой полирезистентностью [1, 2, 5, 12]. Существующие схемы антибиотикопрофилактики гнойно-септических осложнений устаревают и нуждаются в корректировке. Необходим мониторинг резистентности микроорганизмов с целью выявления не эффективных АМП.

Цель работы – анализ профилей резистентности энтеробактерий, изолированных от пациентов с хроническим остеомиелитом, к АМП цефалоспоринового ряда за трёхлетний период.

Материал и методы. Проанализированы профили резистентности 912 клинических штаммов энтеробактерий, принадлежащих к 5 таксономическим группам: *Klebsiella pneumoniae* ($n=349$), *Proteus sp.* ($n=208$), *Escherichia coli* ($n=176$), *Enterobacter cloacae* ($n=179$) за период с 2018-2020 гг. к АМП цефалоспоринового ряда: цефазолину, цефуроксиму, цефтазидиму, цефтриаксону, цефепиму.

Штаммы выделены из ран и свищей пациентов с хроническим остеомиелитом, находившихся на лечении

в гнойном отделении ФГБУ «НМИЦ ТО» в период 2018-2020 гг. Выделение бактерий из патологического материала проводили, используя стандартные микробиологические методы.

Идентификацию бактерий до вида и определение чувствительности к АМП осуществляли на бактериологическом анализаторе Walkaway-40 plus («Siemens», США) с использованием грамотрицательных панелей (NBC 44).

Данные представлены в процентах (%) от общего количества штаммов, выделенных за исследуемый период. Для оценки межгрупповых различий использовали критерий Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Клиническое исследование проводилось в соответствии с этическими стандартами, изложенными в Хельсинской декларации, с разрешения комитета по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени академика Г.А. Илизарова».

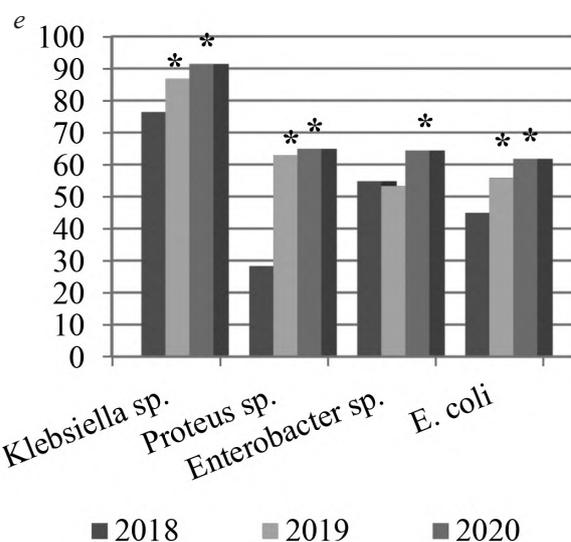
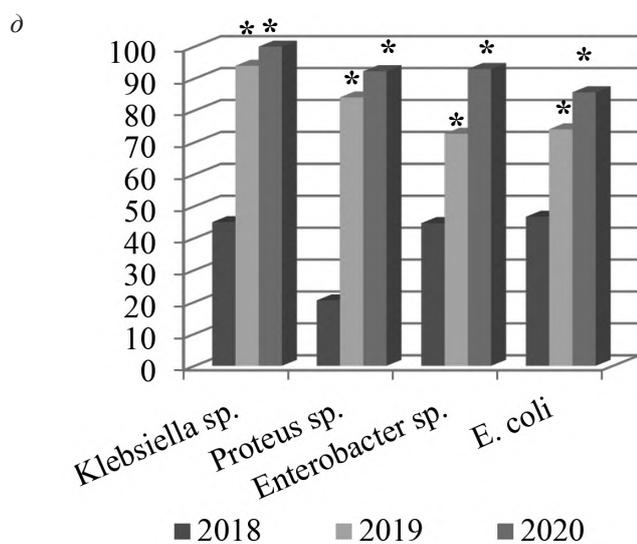
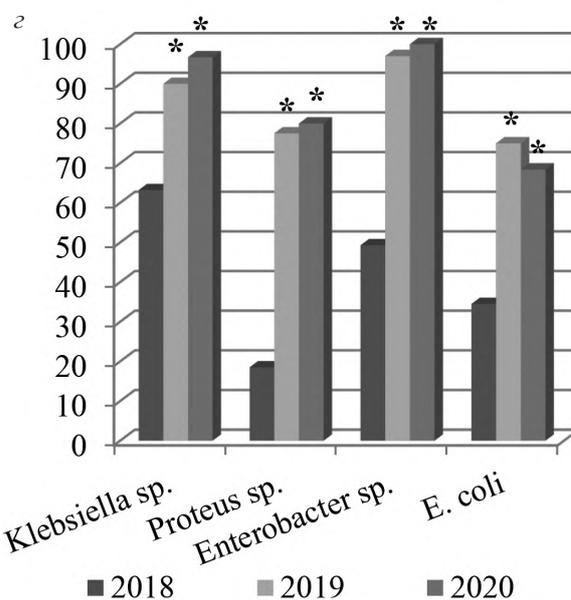
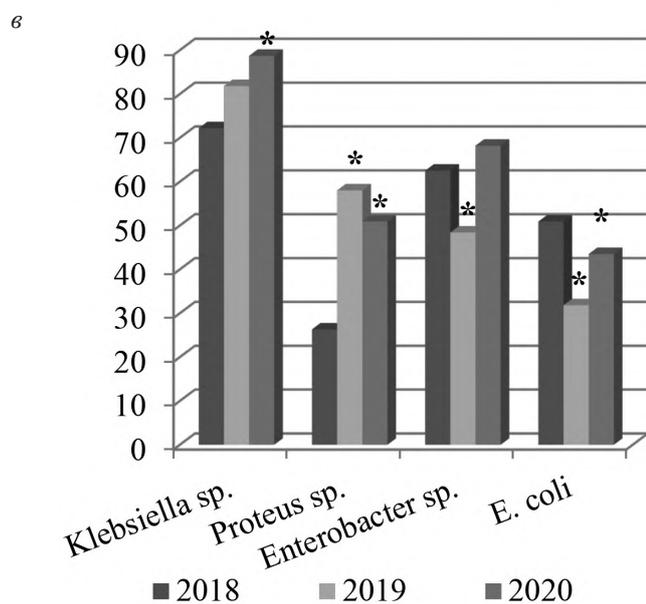
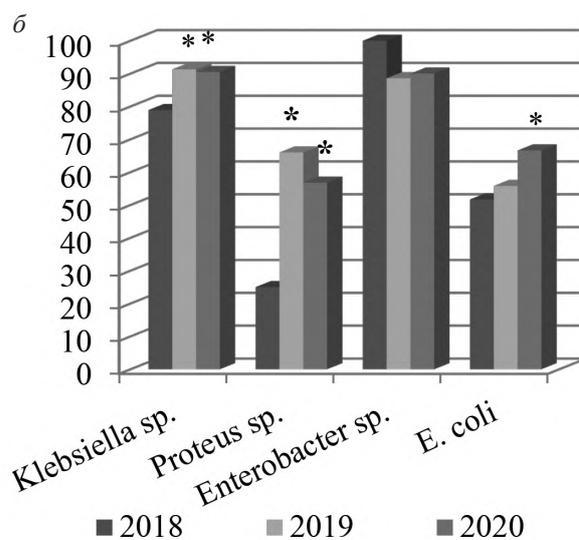
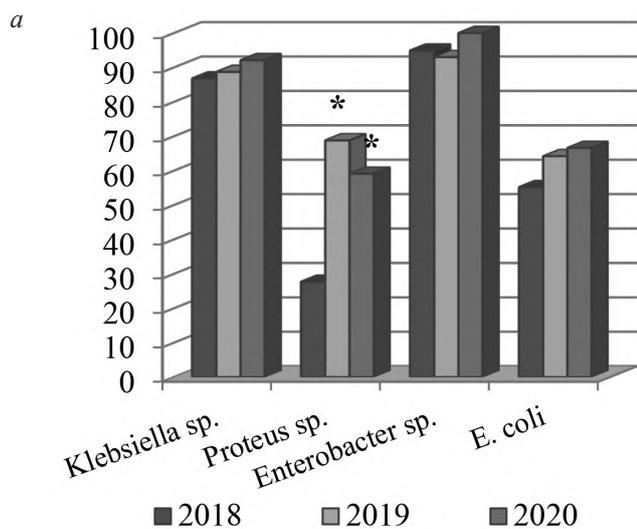
Результаты и обсуждение. В 2018 г. выделено 263 клинических штаммов энтеробактерий, в том числе: *K. pneumoniae* ($n=100$), *Proteus sp.* ($n=77$), *E. coli* ($n=37$), *E. cloacae* ($n=49$). За 2019 г. выделено 329 штаммов энтеробактерий: *K. pneumoniae* ($n=146$), *Proteus sp.* ($n=70$), *E. coli* ($n=68$), *E. cloacae* ($n=45$), в 2020 г. – 320 штаммов: *K. pneumoniae* ($n=103$), *Proteus sp.* ($n=61$), *E. coli* ($n=71$), *E. cloacae* ($n=85$).

В 2018 г. цефазолин эффективен в отношении 72,3% штаммов *Proteus sp.* и 44,8% штаммов *E. coli*. Резистентны к препарату 86,8% штаммов *K. pneumoniae* и 94,9% штаммов *Enterobacter sp.* В 2019 – 2020 гг. число устойчивых к цефазолину штаммов *Proteus sp.* значительно превышало показатели 2018 г. В 2020 г. препарат не эффективен в отношении 100% штаммов *Enterobacter sp.* и 92,1%. – *K. pneumoniae* (см. рисунок, а).

В 2018 г. чувствительны к цефуроксиму 75% штаммов *Proteus sp.* и 48,3% штаммов *E. coli* (см. рисунок, б). Препарат не эффективен в отношении 100% изолятов *Enterobacter sp.* и 78,9% *K. pneumoniae*. В 2019-2020 гг. количество устойчивых к цефуроксиму штаммов *E. coli* и *Proteus sp.* составляло 55-67%.

Наибольшее количество резистентных к цефтазидиму штаммов среди изолятов *Klebsiella sp.* (72,2% в 2018 г., 81,8% – 2019 г., 88,7% – 2020 г.). На втором месте – бактерии рода *Enterobacter* (62,5% – 2018 г., 48,4% – 2019 г., 68,2% – 2020 г.). В 2018 г. цефтазидим эффективен в отношении 73,7% бактерий рода *Proteus*, в 2019 г. и 2020 г. количество резистентных штаммов в 2 раза превысило показатели 2018 г. Количество устойчивых штаммов

MICROBIOLOGY



Устойчивость энтеробактерий к АМП.

a – к цефазолину; *б* – к цефуроксиму; *в* – цефтазидиму; *г* – цефотаксиму; *д* – цефтриаксону; *е* – цефепиму. * – различия значимы по сравнению с 2018 г., $p < 0,05$.

E. coli, на протяжении трёхлетнего периода снижалось (см. рисунок, в).

В 2018 г. активность цефотаксима к энтеробактериям, за исключением штаммов *Klebsiella sp.*, высокая (см. рисунок, з). Количество устойчивых штаммов не превышало 49,3%. Наиболее эффективным препарат был в отношении бактерий рода *Proteus* (81,5% чувствительных штаммов). Количество устойчивых штаммов *Klebsiella sp.* составляло 63,2%. В 2019 г. и 2020 г. количество устойчивых к цефотаксиму штаммов энтеробактерий варьировало в пределах 68-100%. Препарат оказался не эффективным в отношении штаммов *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.*, *E. coli* (число устойчивых изолятов составило 100%, 96,7%, 80%, 68,4% соответственно).

В 2018 г. цефтриаксон – эффективный препарат в отношении энтеробактерий, число чувствительных штаммов варьировало от 50 до 79,5% (см. рисунок, д). Наиболее чувствительные к антибиотику штаммы *Proteus sp.* (79,5% чувствительных изолятов). В 2019 г. и 2020 г. цефтриаксон, по сравнению с показателями 2018 г., оказался не эффективным. Количество резистентных штаммов энтеробактерий в пределах 72,4-100%.

В 2018 г. цефепим эффективен в отношении 71,7% изолятов *Proteus sp.*, 55,1% – *E. coli*, 45,2% – *Enterobacter sp.*, 23,6% – *Klebsiella sp.* В сравнении с 2018 г., за 2019 г. количество устойчивых к препарату штаммов *Proteus sp.* увеличилось в 2 раза, *E. coli* – в 1,2 раза, *Klebsiella sp.* – в 1,1 раза. В 2020 г. относительно 2019 г. отмечается рост числа устойчивых к цефепиму штаммов *Klebsiella sp.* до 91,4%, *Proteus sp.* до 64,9%, *E. coli* до 61,8%, *Enterobacter* – 64,4% (см. рисунок, е).

Мониторинг активности цефалоспоринов в отношении энтеробактерий за период с 2018-2020 гг. показал снижение клинического эффекта всех препаратов.

В 2018 г. к цефалоспорином I поколения резистентны в среднем 66,2% энтеробактерий, в 2019 г. – 78,7%, в 2020 г. – 79,5%.

Цефалоспорины II поколения наиболее активные в отношении *Proteus sp.*, но к 2020 г. наблюдалось снижение их клинического эффекта.

Среди цефалоспоринов III поколения в 2018 г. наибольшую активность проявлял цефотаксим (количество чувствительных штаммов в среднем составляло 58,6%), в 2020 г. количество устойчивых штаммов увеличилось вдвое и составило 86,3%. Цефтазидим активен в отношении 47,1% изолятов энтеробактерий в 2018 г., в 2019 г. – 45% штаммов, в 2020 г. – 37,2% штаммов бактерий. Высокая активность цефтриаксона отмечена в 2018 г. только в отношении штаммов *Proteus sp.* В 2019 и 2020 гг. применение цефтриаксона в эмпирической терапии показало свою неэффективность (среднее количество устойчивых штаммов в 2019 г. составило 81,2%, в 2020 г. – 92,8%).

Препараты IV поколения в 2018 г. наибольшую активность проявляли к бактериям рода *Proteus* (71,7% чувствительных штаммов), наименьшую активность – в отношении *K. pneumoniae* (23,6% чувствительных штаммов). В период с 2019-2020 гг. наблюдалось значимое снижение эффективности цефепима.

Цефалоспорины I поколения устойчивы к гидролитическому действию стафилококковых β-лактамаз и, как правило, чувствительны к β-лактамазам грамотрицательных бактерий [7, 10, 11, 17]. Среди бактерий рода *Enterobacteriaceae* препарат эффективен, в основном, в

отношении *E. coli* и *Proteus spp.* [10-11]. Цефалоспорины II поколения, по сравнению с I группой, обладают несколько большей активностью в отношении энтеробактерий, обусловленной устойчивостью ко многим β-лактамазам и лучшим проникновением в клеточную стенку [8, 10, 11, 17]. Цефалоспорины III поколения применяются при гнойно-септических осложнениях, вызванных мультирезистентными штаммами [10, 11]. Они обладают улучшенными фармакологическими свойствами. Цефалоспорины III поколения не эффективны в отношении бактерий, продуцирующих плазмидные β-лактамазы расширенного спектра действия, хромосомные β-лактамазы класса C, плазмидные β-лактамазы класса D [10, 11]. Цефалоспорины IV поколения хорошо проникают в клеточную стенку грамотрицательных микроорганизмов, достаточно устойчивы к гидролизу β-лактамаз [10, 11, 18].

Нерациональное использование цефалоспоринов может привести к появлению панрезистентных штаммов и неэффективности антибактериальной терапии [1, 2, 5, 12]. Возникает необходимость пересмотра позиционирования цефалоспориновых АМП с учётом современных данных антибиотикорезистентности грамотрицательных микроорганизмов.

Заключение. Мониторинг профилей резистентности к АМП цефалоспоринового ряда выявил их низкую эффективность в отношении энтеробактерий, выделенных из ран и свищей пациентов с хроническим остеомиелитом, что показывает нецелесообразность их эмпирического применения.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4, 6-8, 11, 17 см. REFERENCES)

- Петухов В.И., Булавкин В.П., Окулич В.К., Плотников Ф.В. Рациональное использование антибиотиков в лечении посттравматического остеомиелита с учетом динамики изменения резистентности. *Новости хирургии*. 2012; (1): 71-9.
- Сагинова Д.А., Тулеубаев Б.Е., Кошанова А.А. Микробный пейзаж у больных хроническим остеомиелитом и бактериологическая эффективность локального транспорта антибиотика на штаммы *S.aureus*. *Медицина (Алматы)*. 2018; 1(187): 44-8.
- Привольнев В.В., Родин А.В., Каракулина Е.В. Местное применение антибиотиков в лечении инфекций костной ткани. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(2): 118-31.
- Божкова С.А., Новокшенова А.А., Конев В.А. Современные возможности локальной антибиотикотерапии перипротезной инфекции и остеомиелита (обзор литературы). *Травматология и ортопедия России*. 2015; 3 (77):92-107.
- Бадиков В.Д. Микробиологические основы антимикробной терапии инфекционных заболеваний. Руководство для врачей. СПб; 2005.
- Терехова Р.П., Митиш В.А., Пасхалова Ю.С., Складан Г.Е., и др. Возбудители остеомиелита длинных костей и их резистентность. *Раны и раневые инфекции*. 2016; 3(2):24-30.
- Бурнашов С.И., Шипицына И.В., Осипова Е.В. Микрофлора операционных ран и свищей у пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости до реконструктивного лечения, при рецидиве инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10): 627-31.
- Ключиш Н.М., Науменко З.С., Розова Л.В., Леончук Д.С. Микрофлора хронического остеомиелита плечевой кости. *Гений ортопедии*. 2014; 3: 57-9.
- Шипицына И.В., Осипова Е.В., Леончук Д.С., Судницын А.С. Мониторинг ведущей грамотрицательной микрофлоры и антибиотикорезистентности при остеомиелите. *Гений ортопедии*. 2020; 26(4): 544-7.

MICROBIOLOGY

16. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования Марафон в 2011-2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014;16: 254-65.
18. Березняков И.Г. Цефепим сегодня и завтра. *Болезни и антибиотики*. 2011; 2(5):65-72.

REFERENCES

1. Sheehy S.H., Atkins B.A., Bejon P., Byren I., Wyllie D., Athanasou N.A., Berendt A.R., McNally M.A. The microbiology of chronic osteomyelitis: Prevalence of resistance to common empirical antimicrobial regimens. *J. Infection*. 2010; 60:338-43.
2. Petukhov V.I., Bulavkin V.P., Okulich V.K., Plotnikov F.V. Rational use of antibiotics in the treatment of post-traumatic osteomyelitis taking into account the dynamics of changes in resistance. *Novosti khirurgii*. 2012; 1: 71-9. (in Russian)
3. Saginova D.A., Tulebaev B.E., Koshanova A.A. Microbial landscape in patients with chronic osteomyelitis and bacteriological efficiency of local antibiotic transport to *S. aureus* strains. *Meditsina (Almaty)*. 2018; 1(187):44-8. (in Russian)
4. Aytaç S., Schnetzke M., Swartman B., Herrmann P., Woelfl C., Heppert V., Gruetzner P., Guehring T. Posttraumatic and postoperative osteomyelitis: surgical revision strategy with persisting fistula. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2014; 134(2):159-65.
5. Privoľnev V.V., Rodin A.V., Karakulina E.V. Topical use of antibiotics in the treatment of bone infections. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14(2):118-31. (in Russian)
6. Bert F., Bialek-Davenet S., Leflon-Guibout V., Noussair L., Nicolas-Chanoine M.H. Frequency and epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates susceptible to third-generation cephalosporins or to aztreonam. *Med. Mal. Infect.* 2014; 44(2):76-8. doi: 10.1016/j.medmal.2013;12.004. Epub. 2014;10. PMID: 24525113.
7. Jones M.E., Karlowsky J.A., Draghi D.C. Antibiotic susceptibility of bacteria most commonly isolated from bone related infections: the role of cephalosporins in antimicrobial therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2004; 23:240-6.
8. Mthethwa P.G., Marais L.C. The microbiology of chronic osteomyelitis in a developing world setting. *S.A. Orthop. j.* [Internet]. 2017; June [cited 2021 Sep 30]; 16(2): 39-45.
9. Bozhkova S.A., Novokshonova A.A., Konev V.A. Current possibilities of local antibiotic therapy of periprosthetic infection and osteomyelitis (literature review). *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2015; 3 (77):92-107. (in Russian)
10. Badikov V.D. Microbiological bases of antimicrobial therapy of infectious diseases. *Rukovodstvo dlya vrachey*. St.Petersburg; 2005. (in Russian)
11. Harrison C.J., Bratcher D. Cephalosporins: a review. *Pediatr Rev*. 2008; Aug; 29(8):264-7; quiz 273. doi: 10.1542/pir.29-8-264. PMID: 18676578.
12. Terekhova R.P., Mitish V.A., Paskhalova YU.S., Skladan G.E. et al. Osteomyelitis agents of the long bones and their resistance. *Rany i ranevye infektsii*. 2016; 3 (2): 24-30. (in Russian)
13. Burnashov S.I., Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Microflora of surgical wounds and fistulas in patients with chronic osteomyelitis of the tibia before reconstructive treatment, in case of recurrence of infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (10): 627-31. (in Russian)
14. Klyushin N.M., Naumenko Z.S., Rozova L.V., Leonchuk D.S. Microflora of chronic osteomyelitis of the humerus. *Geniy ortopedii*. 2014; 3: 57-9. (in Russian)
15. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Leonchuk D.S., Sudnitsyn A.S. Monitoring of the leading gradual microflora and antibiotic resistance in osteomyelitis. *Geniy ortopedii*. 2020; 26(4): 544-7. (in Russian)
16. Sukhorukova M.B., Eidelstein M.B., Skleenova E.Yu. et al. Antibiotic resistance of nosocomial strains of *Enterobacteriaceae* in hospitals in Russia: results of a multicenter epidemiological study Marathon in 2011-2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16: 254-65. (in Russian)
17. Bosco J.A, Bookman J., Slover J., Edusei E., Levine B. Principles of Antibiotic Prophylaxis in Total Joint Arthroplasty: *Current Concepts. J. Am Acad. Orthop. Surg.* 2015; Aug; 23(8):e27-35. doi: 10.5435/JAAOS-D-15-00017. PMID: 26209148.
18. Berезняков И.Г. Цефепим сегодня и tomorrow. *Болезни и антибиотики*. 2011; 2 (5): 65-72. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Червинец В.М.¹, Червинец Ю.В.¹, Чичановская Л.В.¹, Ганзя Д.В.¹, Григорьянц Э.О.¹, Беляев В.С.¹, Миронов А.Ю.^{2,3}

СПЕКТР ГАЗОВЫХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ КИШЕЧНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКИМ ИНСУЛЬТОМ

¹ФГБОУ ВО Тверской государственный университет Минздрава РФ, 170100, Тверь, Россия;

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

³ФГБУ Академия постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, 115682, Москва, Россия

*Представлена характеристика кишечной микробиоты лиц с ишемическим инсультом (ИИ), включающая в себя спектр, частоту встречаемости и количество микроорганизмов, спектр и количество газовых сигнальных молекул, выделяемых лактобациллами. Установлено, что у больных с ИИ в 2-3 раза снижается высеваемость основных представителей нормальной микрофлоры – бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки, в 2-3 раза увеличивается выделяемость клостридий, бацилл, пептострептококков, клебсиелл, в 25% изолируется *C. albicans*. Лактобациллы, выделенные из кишечной микробиоты больных ИИ, представлены широким разнообразием видов *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. curvatus*, *L. salivarius*. Они в большинстве случаев не продуцируют NO, в 2 раза меньше выделяют CO по сравнению со здоровыми людьми. Наиболее активные продуценты NO – *L. plantarum*, CO – *L. rhamnosus*.*

Ключевые слова: газовые сигнальные молекулы; ишемический инсульт; кишечная микробиота.

Для цитирования: Червинец В.М., Червинец Ю.В., Чичановская Л.В., Ганзя Д.В., Григорьянц Э.О., Беляев В.С., Миронов А.Ю. Спектр газовых сигнальных молекул кишечных лактобацилл у больных ишемическим инсультом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 163-169. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-163-169>

Для корреспонденции: Червинец Вячеслав Михайлович, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии; e-mail: chervinets@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.12.2021

Принята к печати 25.12.2021

Опубликовано 25.03.2022

Chervinets V.M.¹, Chervinets Yu.V.¹, Chichanovskaja L.V.¹, Ganzja D.V.¹, Grigoryants E.O.¹, Belyaev V.S.¹, Mironov A.Yu.^{2,3}

THE SPECTRUM OF GAS SIGNALING MOLECULES OF INTESTINAL LACTOBACILLI IN PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKE

¹Tver State Medical University, 170100, Tver, Russia;

²G.N. Gabrichevskogo Moscow research institute for epidemiology and microbiology, 125212, Moscow, Russia;

³Russian academy of post-graduate education Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

The work characterizes the intestinal microbiota of patients with ischemic stroke, including the spectrum, frequency and number of microorganisms, as well as the spectrum and amount of gas signaling molecules secreted by lactobacilli. It was found that in patients with ischemic stroke, the frequency of the main representatives of normal microflora, Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp., Escherichia coli, decreased in 2-3 times, and the same time the prevalence of Clostridia spp., Bacillus spp., Peptostreptococcus spp., Klebsiella spp. increased in 2-3 times; yeast like fungi C. albicans was isolated in 25% of cases. Lactobacilli isolated from the intestinal microbiota of patients with ischemic stroke were represented by a wide variety of species: L. rhamnosus, L. fermentum, L. plantarum, L. brevis, L. pentosus, L. curvatus, L. salivarius. In most cases, they did not produce NO, they released CO 2 times less compared to healthy people. The most active NO producers – L. plantarum, CO – L. rhamnosus.

Key words: gas signaling molecule; ischemic stroke; intestinal microbiota.

For citation: Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Chichanovskaja L.V., Ganzja D.V., Grigoryants E.O., Belyaev V.S., Mironov A.Yu. The microbiome of oral cavity patients with periodontitis, adhesive and biofilm forming properties. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 163-169 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-163-169>

For correspondence: Chervinets V. M., Doctor of Medical Sciences, professor, head of the department of microbiology and virology with course of immunology; e-mail: chervinets@mail.ru

Information about authors:

Chervinets V.M., <https://orcid.org/0000-0001-6549-0010>;
Chervinets Yu.V., <https://orcid.org/0000-0001-9209-7839>;
Chichanovskaja L.V., <https://orcid.org/0000-0002-3808-4866>;
Ganzja D.V., <https://orcid.org/0000-0002-3376-6585>;
Grigoryants E.O., <https://orcid.org/0000-00036-4712-3043>;
Belyaev V.S., <https://orcid.org/0000-0002-7165-5077>;
Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4148-0752>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 10.12.2021

Accepted 25.12.2021

Published 25.03.2022

Введение. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) – самый густо заселённый микроорганизмами биотоп организма человека. ЖКТ содержит от 100 тыс. до 100 млн микроорганизмов, суммарно включает более 600 родов [1,2]. Наиболее часто в ЖКТ встречаются представители типа *Firmicutes* (79.4%), *Bacteroidetes* (16.9%), *Actinobacteria* (2.5%), *Proteobacteria* (1%) [3]. Согласно современным представлениям, число клеток микроорганизмов в микробиоте человека в 100 раз превышает количество его соматических клеток. Продукты их метаболизма могут влиять на различные стороны жизнедеятельности организма [4,5].

Среди регуляторов внутри- и межклеточной коммуникации в организме млекопитающих [6], помимо известных сигнальных молекул (аминокислот, биогенных аминов, пептидов, катехоламинов, эндорфинов, гормонов и т. д.), особая роль принадлежит простым по химической структуре газообразным соединениям эндотелиального и микробного происхождения: оксиду азота – NO, оксиду углерода – CO, сероводороду – H₂S, водороду – H₂, метану – CH₄, аммиаку – NH₃ и др. Газовые молекулы (ГМ) могут проявлять свою биологическую активность в месте своего образования, в соседних клетках, системно, вдали от места своего синтеза. После образования ГМ не накапливаются, а быстро проникают через цитоплазматические мембраны в различные клетки и взаимодействуют в них с внутриклеточными ферментами и ионными каналами сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, дыхательной и других систем организма, что свидетельствует об универсальном значении ГМ для жизнедеятельности всех живых организмов [7–9].

Биологически активные соединения (аутоиндукторы – АУ), связанные с метаболической активностью пробиотических микроорганизмов, потенциально способны участвовать в любых физиологических функциях, метаболических, сигнальных, поведенческих реакциях, внутри- и межклеточном обмене информации. Механизмы их воздействия могут быть различны у симбиотических и пробиотических микроорганизмов. АУ позволяют симбиотическим микроорганизмам распознавать окружающую среду, взаимодействовать между собой и с клетками организма хозяина. АУ запускают каскад процессов в прокариотических и эукариотических клетках, когда их количество достигает определённого уровня («quorum sensing» – QS). АУ взаимодействуют с рецепторами клеток, с распознающими их регуляторными белками и, в конечном счёте, активируют экспрессию соответствующих генов в ДНК микроорганизмов, митохондрий и эукариотических клеток хозяина. Благодаря АУ, микроорганизмы и клетки организма обмениваются информацией и координируют свою деятельность. Сигнальные молекулы рассматривают в научной литературе как «слова» в информационном молекулярном «языке». Пробиотические микроорганизмы синтезируют и распознают широкий спектр АУ различной химической природы. Наиболее изученными являются летучие и другие органические кислоты, лактоны, пептидные феромоны, фураноны и другие АУ, участвующие в реализации QS; белки, АТФ и другие соединения, продуцируемые при стрессовых воздействиях; белки, пептиды и аминокислоты, простейшие метаболиты микроорганизмов (CH₄, H₂S, NO, CO, H₂, H₂O₂ и т. д.); нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, нуклеозиды, витамины, амины, полиамины, гормоноподобные субстанции, нейротранс-

миттеры, полисахариды, олигосахариды, пептидогликаны, липотейхоевые кислоты, гликопептиды, липополисахариды, антимикробные соединения различной химической структуры, лектины, биосурфактаны, пигменты и т. д. [10 – 14,29].

Ряд метаболитов микробиоты имеют связь с развитием инсульта. Например, триметиламин-N-оксид (ТМАО), уровень которого в сыворотке крови выше у пациентов с ишемическим инсультом (ИИ) [15]; короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), низкий уровень которых в кале коррелирует со степенью тяжести инсульта [16]. Особый интерес среди метаболитов микробиоты представляют ГМ: NO, CO, H₂S, H₂, CH₄, NH₃ и др., регулирующие метаболизм организма хозяина [17–19].

Цель работы – определение видового спектра и количества микробиоты толстой кишки у больных с ИИ и выявление продукции ГМ у лактобацилл в сравнении со здоровыми людьми.

Материал и методы. В исследование включена контрольная группа здоровых – 25 человек (5 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 19 до 20 лет, проживающих в городе Твери и не имеющих в анамнезе перенесенного инсульта, и не предъявляющих жалоб на состояние здоровья.

В основную группу больных вошли 132 человека с ИИ в возрасте от 38 до 86 лет (средний возраст 60,8±10,2 лет), среди них 72 мужчины и 60 женщин, находившихся на лечении в специализированных отделениях для лечения острой недостаточности мозгового кровообращения (ОНМК), и в реабилитационном центре г. Твери. Все обследованные пациенты характеризовались не грубым неврологическим дефицитом (медиана составила 2 балла по шкале NIHSS).

Согласие на обработку персональных данных и взятие биоматериала для микробиологических исследований проводили согласно разрешению Этического комитета ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России.

На момент развития ИИ 47% больных курили, гипертоническая болезнь отмечалась у 87% обследованных, ишемическая болезнь сердца – у 27% больных, фибрилляция предсердий – у 12% пациентов, хроническая сердечная недостаточность – у 16% больных, сахарный диабет 2 типа – у 18% обследованных. 82% больных перенесли первый ИИ, а 18% – повторный ИИ.

Для микробиологического исследования брали кал у лиц контрольной здоровой и основной групп. Материал брали утром и в течение 2-х часов доставляли в бактериологическую лабораторию. Осуществлялось стандартное бактериологическое исследование материала для определения спектра и распространённости кишечной микробиоты, и их количественных показателей.

Использованы питательные среды: Эндо для энтеробактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, агар Бёрда-Паркера для выявления лецитиназной активности, M 304-стрептококковый агар и Колумбийский кровяной агар для стрептококков и энтерококков, МРС-лактоагар для лактобактерий, для грибов рода *Candida* – Сабуро декстроза агар и хромогенные среды (HiMedia, Индия). Для культивирования анаэробов использован бифидоагар и кровяной агар Шедлера. Анаэробные условия созданы в анаэростатах при помощи газогенераторных пакетов BBL®. Культивирование проводили при температуре 37° С в течение 24–48 ч. Количество колоний выражали в lg КОЕ/г или lg КОЕ/мл. идентификацию осу-

ществляли по биохимической активности с применением API тест-систем (bioMérieux, Франция). Идентификацию энтеробактерий осуществляли с помощью идентификационных систем EnterotubeII и Oxi/FermTube (BBL®). Определение вида анаэробов проводили на API тест-системах bioMérieux (API 20 A), стрептококков – (API 20 Strept), стафилококков – (API 20 Staph), грибов – API AUX. В работе использован программно-аппаратный комплекс Диаморф Цито® (ДиаМорф, Россия).

Производство сигнальных ГМ (H_2 , O_2 , N_2 , CO , CH_4 , CO_2 , NO , H_2S) определяли методом газовой хроматографии на приборе Хроматэк-Кристалл 5000.2, оснащённым детектором по теплопроводности (ДТП), пламенно-ионизационным детектором (ПИД), электрозахватным детектором (ЭЗД), подключаемыми последовательно, что обеспечивает одновременный анализ горючих и негорючих компонентов [28,29]. ПИД использован для детекции углеродсодержащих газов (CO , CO_2 , CH_4), ЭЗД для определения NO , H_2S , H_2O ; ДТП – для H_2 , O_2 , N_2 [28,29]. Анализ проводился в режиме программирования температуры в течение от 6 до 15 минут. Количество выделенных газов измеряли в ppm (от англ. parts per million, – «частей на миллион»), млн¹ или мд. 1 mg/mL=1000 ppm, 1 ppm=0.001 mg/mL с учётом контроля газов над незасеянной питательной средой [12].

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

Результаты. Из фекалий контрольной здоровой группы обследуемых лиц в большинстве случаев выделены бактерии рода *Bifidobacterium* spp., в 88% – *Escherichia coli*, в 84% – *Enterococcus* spp., в 56% – *Lactobacterium* spp., в 48% – *Staphylococcus* spp., в 32% – *Bacteroides* spp., в 28% – *Bacillus* spp., в 24% – *Streptococcus* spp., в 16% – *Clostridium* spp., *Proteus mirabilis* и *Peptostreptococcus* spp., менее чем в 10% – *Staphylococcus aureus*, *Candida tropicalis*, *Micrococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Peptococcus* spp., *Proteus vulgaris*, *Veillonella* spp., *Enterobacteriaceae* и *Corynebacterium* spp. Количество выделенных микроорганизмов варьировало от 4,34 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* spp. до 7,66 lg КОЕ/мл у *Peptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp.

Из фекалий основной группы лиц с ИИ в 78% случаев выделены бактерии рода *Enterococcus* spp., в 50% – *Clostridium* spp., в 44,44% – *Bacillus* spp., в 42% – *Peptostreptococcus* spp., в 39% – *Enterobacteriaceae* spp. и *Bifidobacterium* spp., в 36% – *Escherichia coli*, в 33% – *Staphylococcus* spp. и *Klebsiella pneumoniae*, в 28% – *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., в 25% встречалась *Candida albicans*, которая не выделялась от здоровых людей, в 19% случаев выделен *Proteus vulgaris*, *Streptococcus* spp. Менее чем в 10% случаев выделены – *Micrococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Veillonella* spp., *Peptococcus* spp. Количество выделенных микроорганизмов варьировало 5-6 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* spp., *Streptobacillus* spp., *Peptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *C. albicans*, 6-7 lg КОЕ/мл у *Enterococcus* spp., *Lactobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Proteus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. В количестве 7,4-7,8 lg КОЕ/мл выделены *Bifidobacterium* spp., *Veillonella* spp., *Actinomyces* spp.

Кишечная микробиота здоровых лиц содержала лактобациллы видов: *L. rhamnosus* (6), *L. fermentum* (4),

L. plantarum (2), *L. paracasei* (1), *L. casei* (1). Кишечная микробиота больных ИИ включала большее количество видов лактобацилл: *L. rhamnosus* (5), *L. fermentum* (1), *L. plantarum* (7), *L. brevis* (1), *L. pentosus* (1), *L. curvatus* (1), *L. salivarius* (1).

Определена продукция сигнальных ГМ лактобациллами нормофлоры, выделенными от здоровых лиц и от пациентов с ИИ. Лактобациллы кишечника больных ИИ по сравнению с лактобациллами здоровых лиц имеют следующие показатели продукции сигнальных ГМ. Оксид азота (NO) лактобациллы в основном потребляли и только два штамма выделяли небольшое его количество (*Lactobacillus fermentum* – 144 ppm, *Lactobacillus plantarum* – 327 ppm). У здоровых людей NO выделялся в гораздо большем количестве, в среднем 15544,1 ppm. Продукция CO лактобациллами, выделенными от больных с ИИ, в среднем на 30 ppm меньше (87,8 ppm у здоровых лиц и 57,2 ppm у пациентов с ИИ). В 2 раза меньше выделяют CO , лактобациллы, выделенные от больных с ИИ (148658,9 ppm у здоровых лиц и 76395,9 ppm у пациентов с ИИ). Потребление азота (N_2) лактобациллами, выделенными у здоровых людей, в 6 раз больше, чем у больных (-31,852 ppm у здоровых лиц и -7,686 ppm у пациентов с ИИ). В небольших количествах отмечено потребление кислорода (O_2) лактобациллами обеих групп (-8,26 ppm у здоровых лиц и -5,039 ppm у пациентов с ИИ). (табл. 1 и 2), (рис. 1).

Обе группы характеризуются выделением H_2S в небольших количествах. Лактобациллы пациентов с ИИ выделяют больше H_2S , в среднем 3,5 ppm, практически не выделяют H_2 и CH_4 .

Проанализирована продукция основных газовых сигнальных молекул (NO и CO), выделяемых лактобациллами разных видов от здоровых лиц и пациентов с ИИ (рис. 2).

При сравнении количества продукции оксида азота кишечными лактобациллами двух групп, выявлено, что NO выделяют в основном лактобациллы у здоровых лиц, причём наибольшая продукция характерна для *L. plantarum* (45710,785 ppm), а наименьшая для *L. rhamnosus* (4594,039 ppm). У пациентов с ИИ оксид азота синтезируют в небольшом количестве только два штамма лактобацилл: *Lactobacillus plantarum* – 327 ppm и *L. fermentum* – 144,043 ppm. Остальные штаммы – потребляют NO .

При сравнении количества продукции CO кишечными лактобациллами двух групп, выявлено, что выделение CO характерно для всех кишечных лактобацилл обеих групп. В группе здоровых лиц наибольший синтез CO выявлен у *L. rhamnosus* (89,5 ppm), минимальный – у *L. plantarum* (11,1 ppm). У лиц с ИИ максимальные показатели CO зарегистрированы у *L. plantarum* (76,5 ppm), минимальные – у *L. fermentum* (52,2 ppm).

Различный в продукции других сигнальных ГМ (CH_4 , H_2 , H_2S), выделяемых лактобациллами разных видов от здоровых лиц и пациентов с ИИ не выявлено.

Обсуждение. Среди регуляторов внутри- и межклеточной коммуникации в организме млекопитающих особая роль принадлежит простым по химической структуре ГМ эндотелиального и микробного происхождения: NO , CO , H_2S , H_2 , CH_4 , NH_3 и др. ГМ проявляют биологическую активность в месте своего образования, в соседних клетках, системно. ГМ проникают через мембраны в различные клетки и взаимодействуют в них с

Таблица 1

Продукция газовых сигнальных молекул лактобациллами у здоровых лиц

Проба	O ₂ %	N ₂ %	H ₂ ppm	NO ppm мг/мл	H ₂ S ppm	CH ₄ ppm	CO ₂ ppm	CO ppm
<i>L.rhamnosus</i> 24	-6,78	-16,907	0,475	5565,861	-	0,561	27484,072	80,118
<i>L.rhamnosus</i> 7	-6,697	-15,921	1,732	4852,255	-	0,871	29787,664	58,925
<i>L.fermentum</i> 11	-9,466	-24,454	0,971	19759,856	-	-0,597	220029,74	10,675
<i>L.fermentum</i> 2	-16,652	-57,135	1,067	19336,578	1,158	-1,052	222828,516	-16,724
<i>L.fermentum</i> 279	-15,013	-47,578	-	3569,541	0,710	-0,665	255600,967	73,744
<i>L.fermentum</i> 11	-17,016	-54,155	0,817	26494,468	-	-1,13	252486,74	-17,312
<i>L. paracasei</i> 237	16,081	-49,624	0,403	25194,88	0,803	-0,884	256080,976	-25,076
<i>L.rhamnosus</i> 32	-7,079	-18,218	-	9120,103	-	0,128	67300,383	45,184
<i>L.rhamnosus</i> 38	-2,42	-6,454	-	736,949	-	0,087	520,874	196,256
<i>L.rhamnosus</i> 381	-14,896	-49,132	-	4912,396	3,016	-0,644	253548,358	94,297
<i>L.rhamnosus</i> 263	-14,618	-47,151	-	2376,667	2,773	-0,678	236102,685	62,237
<i>L. plantarum</i> 46	-7,466	-19,238	2,357	6127,288	-	1,241	34674,331	-0,795
<i>L. casei</i> 17	-9,748	-30,277	0,686	4276,058	-	0,135	14661,246	45,531
<i>L. plantarum</i> 357	-3,9	-9,687	-	85294,282	-	-0,478	210118,07	22,944
Среднее	-8,26	-31,852	1,0635	15544,084	1,692	-0,22	148658,90	87,857

Таблица 2

Газовые сигнальные молекулы лактобацилл больных ишемическим инсультом

Проба	O ₂ %	N ₂ %	NO ppm	H ₂ S ppm	CH ₄ ppm	CO ₂ ppm	CO ppm
<i>Lactobacillus brevis</i> 25	-14,342	-46,477	-15,327	0,920	-1,302	257075,248	1,511
<i>Lactobacillus pentosus</i> 10	-4,6	-1,018	-7,434	8,334	-1,228	244149,779	8,071
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18	-2,628	-2,516	-5,94	-	-0,003	4802,078	23,633
<i>Lactobacillus salivarius</i> 1	-7,54	-2,1	-7,308	-	-0,278	685,393	86,828
<i>Lactobacillus plantarum</i> 5	-4,739	-7,249	-1,342	1,954	0,72	39279,577	13,663
<i>Lactobacillus plantarum</i> 37	-3,422	-7,908	-12,765	-	0,076	36689,42	125,969
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	-4,222	-6,778	-0,117	11,157	0,236	22151,255	49,595
<i>Lactobacillus plantarum</i> 27	-4,516	-8,462	0,531	11,175	0,826	45411,565	26,269
<i>Lactobacillus plantarum</i> 7	-6,653	-3,177	1,669	-	0,669	18557,738	193,755
<i>Lactobacillus plantarum</i> 38	-2,041	-6,142	327,02	-	-1,007	247459,48	13,445
<i>Lactobacillus plantarum</i> 29	-3,22	-6,596	6,736	-	-0,203	31766,088	106,117
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 27	-4,279	-8,16	-7,104	18,563	1,079	42711,201	34,109
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 26	-5,915	-6,011	-6,62	4,033	0,082	5537,2	55,173
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 35	-5,773	-3,858	-1,157	0,785	-0,527	1367,345	64,507
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 25	-4,041	-5,566	-4,698	2,660	1,181	30195,167	100,872
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 26	-4,717	-4,027	-3,288	-	1,237	28544,256	18,14
<i>Lactobacillus fermentum</i> 19	-3,021	-4,612	144,043	-	-0,947	242345,358	52,154
Среднее	-5,039	-7,686	23,968	3,5	-0,003	76395,773	57,283

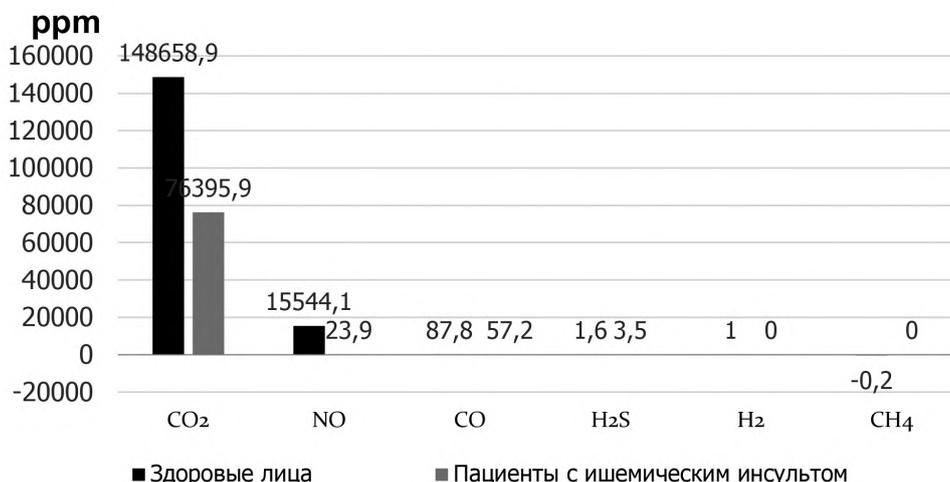


Рис. 1. Газовая метаболическая активность кишечных лактобацилл здоровых лиц и больных с ишемическим инсультом.

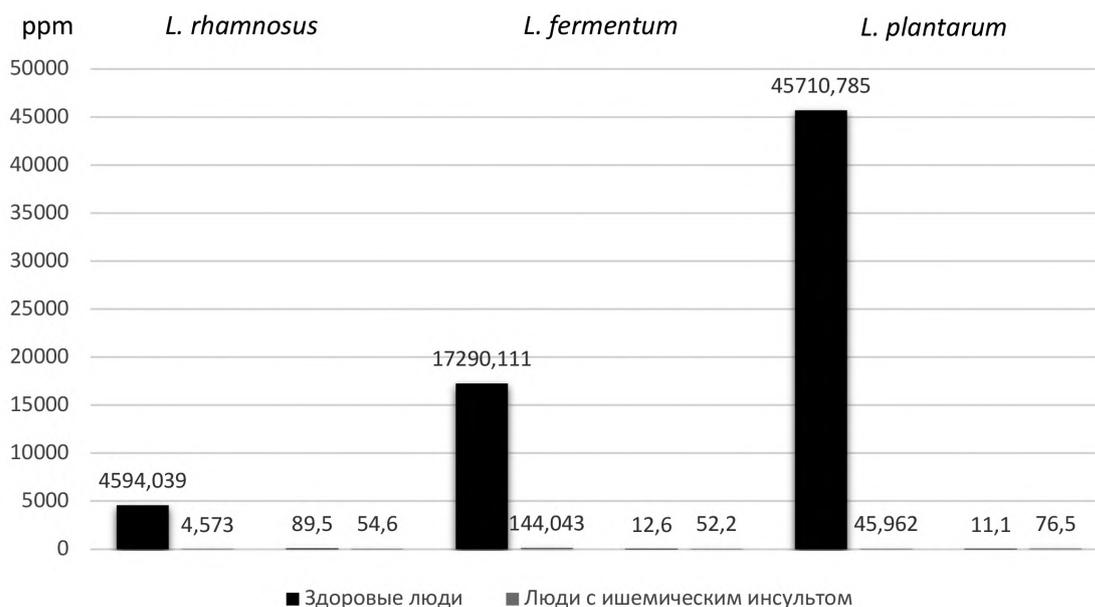


Рис. 2. Продукция NO и CO кишечными лактобациллами у здоровых лиц и больных с ишемическим инсультом.

внутриклеточными ферментами и ионными каналами сердечно-сосудистой, нервной, иммунной, дыхательной и других систем организма [7–9].

Ряд метаболитов микробиоты взаимосвязаны с развитием инсульта. Особый интерес среди метаболитов микробиоты представляют ГМ: NO, CO, H₂S, H₂, CH₄, NH₃ и др., регулирующие метаболизм хозяина [17–19]. Особую роль среди них играет NO, являющийся вазодилататором, его синтез в организме опосредуют 3 изоформы фермента NO-синтазы: нейрональная NOS (nNOS или NOS-1), цитокин-индуцибельная NOS (iNOS или NOS-2), эндотелиальная NOS (eNOS или NOS-3). Основным механизмом действия NO заключается в стимуляции растворимого фермента гуанилатциклазы в клетках гладких мышц сосудов, чтобы вызвать образование цГМФ. Циклический ГМФ активирует протеинкиназу G, способствующую обратному захвату цитозольного кальция в саркоплазматический ретикулум, изгнанию кальция из клетки и открытию активируемых кальцием калиевых каналов. Внутриклеточная концентрация кальция снижается и КЛЦМ больше не может фосфорилировать миозин, при этом наступает расслабление гладкомышечных клеток [20]. Содержание NO в плазме крови у здоровых лиц выше 15,3 мкмоль/л, чем у пациентов с ИИ на 1-й и 2-й дни (<10 мкмоль/л). На 7-й день содержание NO в крови пациентов с ИИ приблизилось к значениям здоровой группы [21].

Особое внимание следует обратить на NO бактериального происхождения, как на потенциальный предиктор ИИ. NO образуется в результате ферментации нитратов оральной и кишечной микробиотой. Данный путь метаболизма называется энтеросаливарный или путь нитрат-нитрит-NO. Нитраты продуктов при попадании в полость рта подвергаются ферментативному восстановлению до нитрита нитратредуктазами бактерий. Нитрит заглатывается и может метаболизироваться двумя путями: 1) протонирование до HNO₂ в желудке; 2) дальнейшее восстановление нитритредуктазами кишечных бактерий до NO. Далее NO в виде нитрожир-

ных кислот попадает в кровоток [22, 23]. Представители микробиоты полости рта, способные восстанавливать нитраты до нитритов локализуются на крипах языка. К ним относят *P. melaninogenica*, *V. dispar*; *H. parainfluenzae*, *N. subflava*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *C. concisus*, *L. buccalis*, *P. intermedia*, представители родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*. При дисбиозе полости рта, обусловленном, в частности, пародонтизом, пародонтопатогенные микроорганизмы, такие как *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola* вызывают в тканях пародонта выброс цитокинов IL-1b, 6, 8 и TNF-а, ингибирующих выработку NO в системном кровотоке [24]. В кишечнике наиболее активными продуцентами NO считаются представители родов *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*), *Streptomyces* и *Bifidobacterium* (*B. longum infantis*). Нитрат может восстанавливаться в нитрит *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* прямо в кишечнике. Однако, для этого необходимы два условия: как можно более высокая концентрация нитратов и 0–2% содержание кислорода в среде. То же самое касается восстановления нитрата до NO. При введении различного количества нитритов в среду продукция лактобациллами NO обратно пропорциональна повышению pH среды (чем среда щелочнее, тем ниже продукция NO) [25].

Низкое содержание лактобацилл и бифидобактерий ведёт к недостатку выработки ими ГМ (NO, CO, H₂S, H₂), являющихся плейотропными медиаторами, имеющими свои мишени в различных тканях и органах, прежде всего, в нервной и сердечно-сосудистой системах. CO способен проявлять антиоксидантные свойства. Проявляя антиапоптотические и антипролиферативные свойства, CO способен защищать ткани от гипоксии и реперфузионных повреждений. NO является нейромедиатором и может участвовать в восстановлении нейронов ЦНС после локальных повреждений при ИИ, участвует в процессах долговременной синаптической потенциации, связанной с образованием памяти [26]. Эндогенно образующийся NO проявляет выраженные антигипер-

тензивные свойства, тормозит агрегацию тромбоцитов в сосудах, оказывает цитопротективное действие в условиях ишемии, снижает выраженность окислительного стресса. Недостаток в крови NO может явиться критерием риска развития артериальной гипертензии [27].

При комплексном лечении ИИ необходимо восстановить уровень нормальной микрофлоры ЖКТ путём применения пробиотиков на основе лактобацилл, продуцирующих сигнальные ГМ (прежде всего NO, CO), оказывающих нейромодулирующее, кардиостимулирующее, иммуномодулирующее и другие полезные воздействия на организм. Для этого необходима разработка пробиотиков и кисломолочных продуктов на основе штаммов лактобацилл, образующих в физиологических концентрациях NO, CO, участвующих в восстановлении нейронов ЦНС.

Заключение. У больных с ИИ в 2-3 раза снижена высеваемость основных представителей нормальной кишечной микрофлоры – бифидобактерий, лактобацилл, *E. coli* и в 2-3 раза увеличена выделяемость клостридий, бацилл, пептострептококков, клебсиелл и других энтеробактерий, в 25% изолировались *C. albicans*.

Лактобациллы кишечной микрофлоры больных ИИ, представлены *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. curvatus*, *L. salivarius*. Они в большинстве случаев не продуцируют, а потребляют NO, в 2 раза меньше выделяют CO по сравнению со здоровыми людьми. У пациентов с ИИ наиболее активными продуцентами сигнальных ГМ являются *L. plantarum* (по синтезу NO) и *L. rhamnosus* (по синтезу CO).

При комплексном лечении ИИ возникает необходимость восстановить уровень нормальной микрофлоры ЖКТ путём применения пробиотиков на основе штаммов лактобацилл, продуцирующих сигнальные ГМ (прежде всего NO, CO), оказывающих нейромодулирующее, кардиостимулирующее, иммуномодулирующее и другие полезные воздействия на организм.

Необходима разработка пробиотиков и кисломолочных продуктов на основе штаммов лактобацилл, образующихся в физиологических концентрациях NO, CO, участвующих в восстановлении нейронов ЦНС.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 5, 7–10, 14–17, 19–25 см. REFERENCES)

2. Чаплин А.В., Ребриков Д.В., Болдырева М.Н. Микробиом человека. *Вестник российского государственного медицинского университета*. 2017; 2: 5-13.
4. Шендеров Б.А. Функциональное и персональное питание. Современное состояние и перспективы. *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. 2010; 2-3: 2-5.
6. Шендеров Б.А. Роль эндогенных и микробных газовых молекул в физиологии и патофизиологии нервной, сердечно-сосудистой системы. *Вестник восстановительной медицины*. 2015; 5: 58-65.
11. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Тверь: Издательство РИЦ ТГМА; 2016.
12. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Беляева Е.А. и др. Способ диагностики газового состава метаболитов микробиоты человека. Патент РФ № 2683949; 2019.
13. Шендеров Б.А. Микробная экология человека и её роль в поддержании здоровья. *Метаморфозы*. 2014; 5: 72-80.
18. Ситдикова Г.Ф., Зефилов А.Л. Сероводород: от канализации Парижа к сигнальной молекуле. *Природа*. 2010; 9: 29-37.
26. Кузнецова В.Л., Соловьёва А.Г. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 4: 927-34.
27. Умнягина И.А., Блинова Т.В., Страхова Л.А., Иванова Ю.В., Трошин В.В., Колесов С.А., Фомина Ю.Н. Эндотелин-1 и метаболиты оксида азота в диагностике риска артериальной гипертензии у лиц молодого и среднего возраста, работающих во вредных условиях труда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (9): 525-32.
28. Миронов А.Ю. Газовая хроматография и масс-спектрометрия в диагностике анаэробов. *Альманах клинической медицины*. 2012; 26: 45-51.
29. Миронов А.Ю., Зур Н. В. Молекулярные маркёры патогенов. М.: ООО «Тираж»; 2013.

REFERENCES

1. Dang A.T., Marsland B.J. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis. *Mucosal immunology* 2019; 12: 843-50. DOI: 10.1038/s41385-019-0160-6
2. Chaplin A.V., Rebrikov D.V., Boldyreva M.N. Human mikrobiom. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2017; 2: 5-13. (in Russian)
3. Bingula R., Filaire M, Radosevic-Robin N., Bey M., Berthon J.Y., Bernalier-Donadille A et al. «Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer» *Journal of oncology*. 2017 (2017): 5035371. DOI:10.1155/2017/5035371.
4. Shenderov B.A. Functional and personal nutrition. Modern condition and perspectives. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga*. 2010: 2-3: 2-5. (in Russian)
5. Pflughoeft K.J., Versalovic J. Human Microbiome in Health and Disease. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis* 2012; 7: 99-122.
6. Shenderov B.A. The role of endogenous and microbial gas molecules in physiology and pathophysiology of nervous and cardiovascular system. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny*. 2015; 5: 58-65. (in Russian)
7. Althaus M. Gasotransmitters: novel regulators of epithelial Na(+) transport? *Frontiers in Physiology*. 2012; 3:83. DOI:10.3389/fphys.2012.00083.
8. Althaus M, Clauss WG. Gasotransmitters: novel regulators of ion channels and transporters. *Frontiers in Physiology*. 2013; 4: 27. DOI:10.3389/fphys.2013.00027.
9. Hezel M.P., Weitzberg E. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis. *Oral Diseases*. 2015; 21(1): 7-16. DOI:10.1111/odi.12157.
10. Shenderov B.A., Sinita A.V., Zakharchenko M.M., Christine Lang. Metabiotics. Present state, challenges and perspectives. *Springer Nature Switzerland AG*. 2020, (eBook). DOI:10.1007/978-3-030-34167-1.
11. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Mironov A.Yu. Symbiotic relationship between lactobacilli and microorganisms of the gastrointestinal tract. Tver': Tverskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya; 2016. (in Russian)
12. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Beljaeva E.A., Chervinets L.F., Chervinets A.V., Lebedev S.N. Method for diagnosing the gas composition of human microbiota metabolites. Patent RF № 2683949; 2019. (in Russian)
13. Shenderov B.A. The human microecology and its role in supporting of the human health. *Metamorfozy*. 2014; 5: 72-80. (in Russian)
14. Shenderov B.A. Probiotic (symbiotic) bacterial languages. *Anaerobe*. 2011; 17: 490-5.
15. Rexidamu M, Li H, Jin H, Huang J. Serum levels of Trimethylamine-N-oxide in patients with ischemic stroke. *Bioscience reports*. 2019; 39(6):BSR20190515. DOI:10.1042/BSR20190515.
16. Tan C., Wu Q., Wang H, Gao X., Xu R., Cui Z. et al. Dysbiosis of Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Acute Ischemic Stroke and the Subsequent Risk for Poor Functional Outcomes. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2021; 45(3):518-29. DOI:10.1002/jpen.1861.

17. Tinajero-Trejo M., Jesse H.E., Poole R.K. Gasotransmitters, poisons, and antimicrobials: it's a gas, gas, gas! *F1000Prime Report*. 2013; 5:28. DOI:10.12703/P5-28.
18. Sitdikova G.F., Zefirov A.L. Hydrogen sulfide: from the sewers of Paris to the signaling molecule. *Priroda*. 2010; 9: 29-37. (in Russian)
19. Kim-Shapiro D.B., Gladwin M.T. Mechanisms of nitrite bioactivation. *Nitric oxide: biology and chemistry*. 2014. 38:58-68 DOI:10.1016/j.niox.2013.11.002.
20. Yingzi Zhao, Paul M. Vanhoutte, Susan W.S. Leung, Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences* 2015; 129(2): 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002>.
21. Serrano-Ponz M., Rodrigo-Gasqué C., Siles E., Martínez-Lara E., Ochoa-Callejero L., Martínez A. Temporal profiles of blood pressure, circulating nitric oxide, and adrenomedullin as predictors of clinical outcome in acute ischemic stroke patients. *Molecular medicine reports* 2016; 13(5):3724-34. DOI:10.3892/mmr.2016.5001.
22. Koch C.D., Gladwin M.T., Freeman B.A., Lundberg J.O., Weitzberg E., Morris A. Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: Intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health. *Free radical biology & medicine* 2017; 105:48-67. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.
23. DeMartino A.W., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Gladwin M.T. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling. *British journal of pharmacology* 2019; 176(2):228-45. DOI:10.1111/bph.14484.
24. Pignatelli P., Fabietti G., Ricci A., Piattelli A., Curia M.C. How Periodontal Disease and Presence of Nitric Oxide Reducing Oral Bacteria Can Affect Blood Pressure. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(20):7538. DOI:10.3390/ijms21207538.
25. Tiso M, Schechter AN. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0119712. Published 2015 Mar 24. DOI:10.1371/journal.pone.0119712.
26. Kuznetsova V.L., Solov'eva A.G. Nitrogen oxide: properties, biological role, mechanisms of action. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* 2015; 4: 927-34. (in Russian)
27. Umnyagina I.A., Blinova T.V., Strakhova L.A., Ivanova Yu.V., Troshin V.V., Kolesov S.A., Fomina Yu.N. Endothelin-1 and nitrogen oxide metabolites in risk diagnostics of arterial hypertension in persons of young and middle ages occupied in harmful working conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* 2021; 66 (9): 525-32. DOI:10.51620/0869-2084-2021-66-9-525-532. (in Russian)
28. Mironov A. Yu. Gas chromatography and mass spectrometry in the diagnosis of anaerobes. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2012; 26: 45-51. (in Russian)
29. Mironov A. Yu., Zur N. V. Molecular markers of pathogens [Molekulyarnye markery patogenov]. Moscow: Tirazh; 2013. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Гафарова М.Т.¹, Бондаренко Е.И.², Малый К.Д.¹, Алиева Э.Э.³, Евстафьев И.Л.⁴, Товпинец Н.Н.⁴, Малая Н.К.¹, Кубышкин А.В.¹

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТРАНСМИССИВНЫХ КЛЕЩЕВЫХ РИККЕТСИОЗОВ НА КРЫМСКОМ ПОЛУОСТРОВЕ

¹Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», 295051, Симферополь, Россия;

²АО «Вектор-Бест», 630117, Новосибирск, Россия;

³ФГБУ «Сакский военный клинический санаторий им. Н. И. Пирогова» Министерства обороны России, 296500, Саки, Россия;

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе Федерального значения Севастополе», 295034, Симферополь, Россия

Представлены результаты исследования распространённости иксодовых клещей – переносчиков возбудителей клещевых риккетсиозов для оценки их потенциальной роли в заболеваемости местного и прибывающего населения. Эктопаразиты собраны в различных природно-климатических зонах Крымского полуострова в период 2016-2018 гг. В результате проведенного скрининга с помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в клещах выявлен генетический маркер (участок гена *gltA*) риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки. Наиболее часто ДНК-маркер риккетсий обнаружен в клещах в восточных районах степной зоны – 50,6 %, в северо-западной части степной зоны эта величина составила 12,0%. Реже ДНК-мишень риккетсий выявлена в клещах, собранных в горнолесной и южнобережной зоне – 4,5%. В результате секвенирования положительных образцов ДНК по фрагментам генов *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* установлен видовой состав риккетсий. Идентифицирована ДНК 8 видов риккетсий: *R. conorii*, *R. massiliae*, *R. sibirica* subsp. *mongolotimonae*, *R. slovaca*, *R. aeschlimannii*, *R. monacensis*, *R. helvetica*, *R. raoultii*. ДНК трёх видов – *R. massiliae*, *R. slovaca*, *R. helvetica* в Крыму установлена впервые. Определены особенности географического распространения выявленных видов риккетсий, что обусловлено наличием клещей-переносчиков. Разнообразие видов риккетсий и их переносчиков связано с изолированностью ареалов основных животных-прокормителей и сложившимися маршрутами миграций птиц на территории Крымского полуострова. Результаты дают основание предполагать, что заболевания клещевыми риккетсиозами в Крыму, могут быть вызваны не только *R. conorii*, как считалось ранее, но и другими видами патогенных для человека риккетсий.

Ключевые слова: иксодовые клещи; ДНК-маркер риккетсий; ПЦР-РВ; виды риккетсий.

Для цитирования: Гафарова М.Т., Бондаренко Е.И., Малый К.Д., Алиева Э.Э., Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н., Малая Н.К., Кубышкин А.В. Распространённость возбудителей трансмиссивных клещевых риккетсиозов на Крымском полуострове. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 170-176.
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-170-176>

Для корреспонденции: Гафарова Мунивер Тейфуковна, д-р мед. наук, проф. каф. инфекционных болезней; e-mail: muniver@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.07.2021

Принята к печати 12.10.2021

Опубликовано 25.03.2022

Gafarova M. T.¹, Bondarenko E. I.², Maliy K. D.¹, Alieva E. E.³, Evstafiev I. L.⁴, Tovpinets N. N.⁴, Malaya N. K.¹, Kubyshekin A. V.¹

PREVALENCE OF CAUSATIVE AGENTS OF TRANSMISSIVE TICK-BORNE RICKETTSIOSIS IN THE CRIMEAN PENINSULA

¹Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, 295051, Simferopol, Russia;

²AO "Vector-Best", 630117, Novosibirsk, Russia;

³Federal State Budgetary Institution "N. I. Pirogov Saki Military Clinical Sanatorium", Ministry of Defense of Russia, 296500, Saki, Russia;

⁴FBUZ "Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the federal city of Sevastopol", 295034, Simferopol, Russia

The paper presents the results of a study of the prevalence of Ixodid ticks – potential carriers of tick-borne rickettsiosis pathogens. Ectoparasites were collected in various natural and climatic zones of the Crimean Peninsula within the year 2016-2018. As a result of screening with the help of real-time PCR analysis (PCR-RT), a genetic marker (a section of the *gltA* gene) of the rickettsia group of tick-borne spotted fever was detected in ticks. The most common DNA marker of rickettsia was found in ticks in the eastern regions of the steppe zone – 50,6 %, in the north-western part of the steppe zone this value was 12,0 %. The least amount of rickettsia target DNA was detected in ticks collected in the mountain forest and south bank zones – 4,5 %. As a result of sequencing of positive DNA samples from fragments of the *gltA*, *ompA*, *ompB*, and *sca4* genes, the species composition of rickettsias was established. The DNA of 8 species of rickettsia was identified: Circulation of three *R. conorii*, *R. massiliae*, *R. sibirica* subsp. *mongolotimonae*, *R. slovaca*, *R. aeschlimannii*, *R. monacensis*, *R. helvetica*, *R. raoultii*. *R. massiliae*, *R. slovaca*, and *R. helvetica* were established in the Crimean Peninsula for the first time. The peculiarities of the geographical distribution of the identified rickettsia species were determined, which was due to the spread of mites-carriers of pathogens. The revealed diversity of rickettsia species and their vectors, due to the isolation of the areas of the main feeding animals and the established routes of migratory

birds, suggests the circulation of other rickettsia species on the territory of the Crimean Peninsula. The obtained results suggest that the diseases of tick-borne rickettsiosis in the Crimean Peninsula can be caused not only by *R. conorii*, as previously thought, but also by other types of rickettsii.

Key words: ixodid ticks; DNA marker of rickettsia; PCR-RT; rickettsia species.

For citation: Gafarova M.T., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Alieva E.E., Evstafiev I.L., Tovpinec N.N., Malaya N.K., Kubyshkin A.V. Prevalence of causative agents of transmissible tick-borne rickettsiosis in the Crimean peninsula. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 170-176 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-170-176

For correspondence: Gafarova M.T., MD, PhD Department of Infectious Diseases S.I.; e-mail: muniver@mail.ru

Information about authors:

Gafarova M.T., <https://orcid.org/0000-0002-4067-5825>;
Bondarenko E.I., <https://orcid.org/0000-0002-4699-9548>;
Malyi K.D., <https://orcid.org/0000-0002-6591-2719>;
Alieva E.E., <https://orcid.org/0000-0002-0321-7913>;
Evstafiev I.L., <https://orcid.org/0000-0003-1586-8411>;
Tovpinec N.N., <https://orcid.org/0000-0003-1789-9633>;
Malaya N.K., <https://orcid.org/0000-0002-3300-1590>;
Kubyshkin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1309-4005>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 10.07.2021
Accepted 12.10.2021
Published 25.03.2022

Введение. Риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) являются трансмиссивными природно-очаговыми зоонозами. Географическое распространение их инфекционных агентов связано с ареалом переносчиков (иксодовые клещи), которые являются основным резервуаром риккетсий в природе. К наиболее значимым представителям группы КПЛ в Российской Федерации относятся *R. sibirica* и *R. conorii*. Совершенствование методов лабораторной диагностики и идентификации способствует увеличению числа вновь выявляемых риккетсий группы КПЛ. К настоящему времени этот список пополнили 14 видов риккетсий: *R. aeschlimannii*, *R. africana*, *R. asiatica*, *R. felis*, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. hoogstraalii*, *R. japonica*, *R. massiliae*, *R. peacockii*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. tamurae* [1, 2].

Целесообразность изучения возбудителей группы КПЛ в Крыму обусловлена природно-климатическими особенностями региона, благоприятствующими формированию особых биогеоценозов, в которых активно функционируют природные очаги риккетсиозов, большим количеством прибывающего населения (туристов, отдыхающих) в сезон эпидемической активности очагов. Широкое видовое разнообразие возбудителей и их переносчиков на фоне происходящих климатических изменений и интенсивного антропогенного воздействия на природу обуславливает необходимость более подробного и глубокого изучения этой инфекционной патологии, особенно с учётом широкого круга патогенных видов риккетсий [2, 3]. На территории Крымского полуострова находятся природные очаги средиземноморской («марсельской») лихорадки, которую регистрируют здесь с 30-х годов XX века, в основном в прилегающих к морю зонах [4, 5]. Установлено, что на территории Крыма, как и в других регионах Европы, в очагах циркулирует *R. conorii*, переносчик и природный резервуар возбудителя – клещи *Rhipicephalus sanguineus* [3, 6]. В 1962 г. А. Л. Лейбман и Е. А. Ключкина [6] установили ведущее значение клещей *Rhipicephalus sanguineus* в существовании природных и антропогенных очагов марсельской

лихорадки на полуострове и заболеваемости населения этой инфекцией.

Применение современных молекулярно-генетических методов исследования позволяет значительно улучшить идентификацию патогенов в исследуемых переносчиках [7].

Цель работы – исследовать распространённость возбудителей КПЛ в различных природно-климатических зонах Крымского полуострова для оценки их потенциальной роли в заболеваемости местного и прибывающего населения. Задачи исследования – изучение распространённости клещей – переносчиков возбудителей, оценка их заражённости риккетсиями с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и определение вида риккетсий.

Материал и методы. В период 2016-2018 гг. с апреля по сентябрь собрано и исследовано 1972 экзemplяров клещей. Клещи собирались практически во всех районах (Краснопереконский, Раздольненский, Сакский, Черноморский, Красногвардейский, Джанкойский, Советский, Нижнегорский, Кировский, Ленинский, Белогорский, Симферопольский, Бахчисарайский) и некоторых городах полуострова (Евпатория, Керчь, Феодосия, Судак, Севастополь, Ялта, Алушта). Сборы проводили на флаг и волокушу, при осмотрах и при очёсах с крупного и мелкого рогатого скота, с собак и кошек. Определение вида собранных клещей проводили по морфологическим таблицам Н. А. Филипповой. Собранных клещей замораживали и хранили при -20°С. Материал для исследования методом ПЦР-РВ получали путём дезинтеграции каждой особи клеща индивидуально с проведением предварительной отмывки, как это описано ранее [8]. Полученные индивидуальные образцы суспензий клещей в объёме 100 мкл использовали для выделения суммарной ДНК/РНК с применением набора реагентов «РеалБест экстракция 100» согласно инструкции производителя (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Элюцию нуклеиновых кислот проводили в объёме 300 мкл соответствующего раствора, входящего в состав набора для выделения. Полученные образцы нуклеиновых

MICROBIOLOGY

кислот анализировали с помощью ПЦР-РВ на наличие ДНК-маркёра риккетсий (консервативного участка гена *gltA*) с использованием коммерческого набора реагентов «РеалБест ДНК *Rickettsia species*» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск), в соответствии с рекомендациями производителя.

Постановку ПЦР-РВ проводили на амплификаторе с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени CFX96 (Bio-Rad, США) в Центре коллективного пользования Центральной научно-исследовательской лаборатории Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». Положительные образцы с высокой нагрузкой ДНК риккетсий (Ct до 33-35 циклов в ПЦР-РВ) дополнительно амплифицированы по фрагментам генов *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4*, с помощью праймеров (табл. 1), концентрация которых в реакционной смеси составляла 0,5 мкМ. Протокол амплификации: 1 стадия: 94° С – 1 мин; 2 стадия, 5 циклов: 94° С – 15 с, 62° С – 20 с, 72° С – 20 с; 3 стадия, 45 циклов: 94° С – 15 с, 60° С – 30 с, 72° С – 30 секунд. Разработка дизайна, анализ синтезированных праймеров и зондов, используемых в данных исследованиях, опубликованы ранее [9]. Олигонуклеотиды получены в лаборатории химического синтеза АО «Вектор-Бест».

Секвенирование полученных продуктов методом Сэнгера проводили на секвенаторе ABI Prism 3100 GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems, США) в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Полученные нуклеотидные последовательности сопоставляли с последовательностями риккетсий, представленные в международной базе данных NCBI с помощью приложения BLAST.

Результаты. Клещи идентифицированы по видам: *Haemaphysalis punctata* – 1062 особи (53,8%), *Ixodes*

ricinus – 337 особей (17,1%), *Rhipicephalus sanguineus* – 305 особей (15,5%), *Hyalomma marginatum* – 139 особей (7,0%), *Dermacentor marginatus* – 110 особей (5,6%), *Dermacentor reticulatus* – 19 особей (1,0%).

Выявление генетических маркёров риккетсий в клещах различных видов. Каждая особь из числа собранных клещей подвергалась спиртовой отмывке от примесей, индивидуальной гомогенизации и выделению суммарных нуклеиновых кислот (НК). С помощью ПЦР-теста «РеалБест ДНК *Rickettsia species*» выделенные пробы НК проанализированы на присутствие специфического ДНК-маркёра риккетсий. Генетический маркёр риккетсий (консервативный участок гена цитратсинтазы, *gltA*), присущий для всех видов риккетсий группы КПЛ выявлен в 554 из 1972 (28,1%) суспензиях анализированных клещей, существенно различаясь по видам обследованных эктопаразитов (табл. 2).

Результаты видовой идентификации риккетсий. Определение видового состава риккетсий проводили в тех образцах суспензий гомогенизированных клещей, в которых содержалась ошутимая нагрузка ДНК-маркёра (участка гена *gltA*) возбудителя (Ct менее 35 цикла в ПЦР-РВ, что соответствует не менее 30 геном/эквивалентам риккетсий в 50 мкл реакции). ДНК риккетсий из положительных образцов подвергалась дополнительной амплификации по фрагментам генов: *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4*, с длиной продуктов от 400 до 1100 п.н. (см. табл. 1). Секвенирование ДНК по всем четырём фрагментам генов удалось провести не для всех проб, в связи с чем, установление вида риккетсий в каждом конкретном образце проводилась как минимум по трём полученным последовательностям ДНК разных генов, сравнением их с последовательностями, представленными в базе данных GenBank. Из 554 суспензий клещей, содержащих ДНК риккетсий, удалось секвенировать и устано-

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры, применяемые для амплификации и секвенирования участков генов риккетсий

Ген	Праймеры	Структура праймера (5'→3')	Длина ампликона (п.н.)
<i>gltA</i>	RS-F1	GCAAGTATTGGTGAGGATGTA	1153
	RS-R1	GTTCAGGGTCTTCGTGCA	
<i>ompA</i>	RSp-F14	GCGATAATGCTGAGTAGTAGC	316
	RSp-R2	GCAACAAGTTACCTCCCGTTA	
<i>ompB</i>	PKO-ompB-F1	TCTACAGCTACCATAGTAGCCA	815
	PKO-ompB-R2	TCCTGTAACGTTAAAGTCGGTA	
<i>sca4</i>	R.Sca4-F3	GCAGATGTTAGAAAAGGCAGTA	576
	R.Sca4-R1	TCCGCTGATGCCATAATAAGT	

Таблица 2

Выявление ДНК-маркёра риккетсий в различных видах клещей

Вид клеща	Количество исследованных клещей	Выявлен ДНК-маркёр риккетсий по участку гена цитратсинтазы (<i>gltA</i>)	%
<i>Haemaphysalis punctata</i>	1062	334	31,5
<i>Ixodes ricinus</i>	337	47	13,9
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	305	62	20,3
<i>Hyalomma marginatum</i>	139	48	34,5
<i>Dermacentor marginatus</i>	110	58	52,7
<i>Dermacentor reticulatus</i>	19	5	26,3
Общее количество исследованных клещей	1972	554	28,1

Маркёры видов риккетсий в различных видах анализированных клещей (%)*

Вид риккетсий	Удельный вес от общего количества (абс. число)	<i>Haemaphysalis punctata</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>R. raoultii</i>	30,8 (37)	24,0 (6)	13,6 (3)	6,7 (1)	71,4 (20)	23,3 (7)
<i>R. aeschlimannii</i>	23,3 (28)	56,0 (14)	31,8 (7)	46,6 (7)	-	-
<i>R. slovaca</i>	13,3 (16)	20,0 (5)	4,5 (1)	6,7 (1)	28,6 (8)	3,4 (1)
<i>R. helvetica</i>	12,5 (15)	-	-	-	-	50,0 (15)
<i>R. conorii</i>	7,5 (9)	-	36,4 (8)	6,7 (1)	-	-
<i>R. monacensis</i>	6,7 (8)	-	-	6,7 (1)	-	23,3 (7)
<i>R. mongolotimonae</i>	4,2 (5)	-	4,5 (1)	26,6 (4)	-	-
<i>R. massiliae</i>	1,7 (2)	-	9,2 (2)	-	-	-
Всего	100 (120)**	25	22	15	28	30

Примечание. * – В скобках указано количество идентифицированных риккетсий каждого вида; ** – видовые особенности риккетсий, обнаруженных в клещах *Dermacentor reticulatus*, выявить не удалось.

вид риккетсий в 120 (21,7%) случаях. В этих пробах ДНК клещей идентифицированы 8 видов риккетсий: *R. conorii* (9 образцов – 7,5%), *R. massiliae* (2 образца – 1,7%), *R. mongolotimonae* (5 образцов – 4,2%), *R. slovaca* (16 образцов – 13,3%), *R. aeschlimannii* (28 образцов – 23,3%), *R. monacensis* (8 образцов – 6,7%), *R. helvetica* (15 образцов – 12,5%), *R. raoultii* (37 образцов – 30,8%).

Установлено, что в Сакском районе обнаружена заражённость клещей риккетсиями трёх видов: *R. conorii* (1 образец – 0,4% от всех собранных в этом районе особей), *R. aeschlimannii* (2 образца – 0,9%), *R. mongolotimonae* (4 образца – 1,7%). В Симферопольском районе выявлены представители трёх видов риккетсий: *R. helvetica* (15 образцов – 8,6%), *R. monacensis* (8 образцов – 4,6%), *R. slovaca* (1 образец – 0,6%). Клещи в Белогорском районе содержали генетический материал двух видов риккетсий: *R. raoultii* (18 образцов – 21,4%) и *R. slovaca* (5 образцов – 6,0%). В Советском районе выявлены два вида риккетсий: *R. aeschlimannii* (2 образца – 22,2%), *R. slovaca* (4 образца – 44,4%). В Ленинском районе отмечено наибольшее видовое разнообразие: *R. raoultii* (16 образцов – 2,3%), *R. aeschlimannii* (24 образца – 3,4%), *R. slovaca* (5 образцов – 0,7%), *R. mongolotimonae* (1 образец – 0,1%).

Полученные результаты позволяют предполагать о распространённости на Крымском полуострове не только средиземноморской (марсельской) лихорадки, как считалось ранее, но и других риккетсиозов из группы КПП.

Распределения идентифицированных видов риккетсий в клещах различных видов приведено в табл. 3.

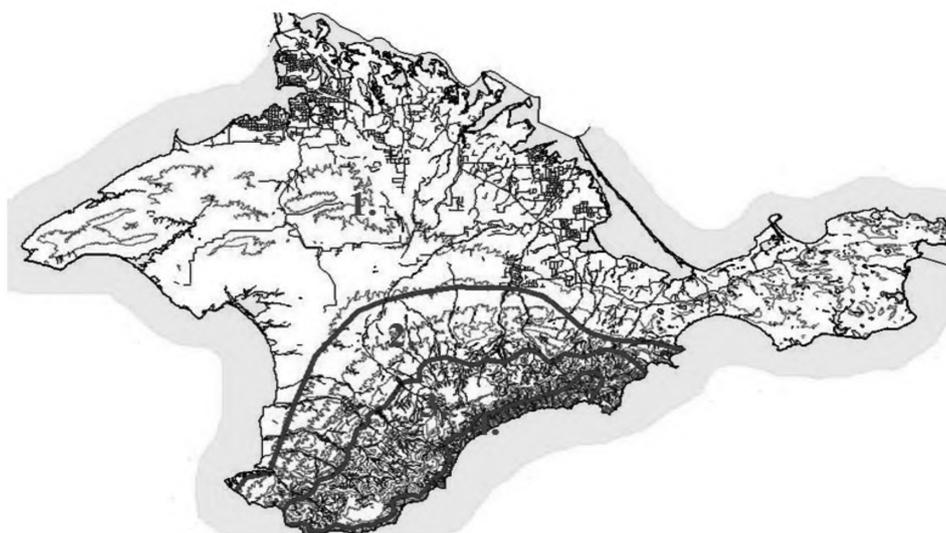
Наибольшее количество выявленных маркёров видов риккетсий относится к виду *R. raoultii* (см. табл. 3). Идентифицированы ДНК следующих видов: *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*. В разных видах клещей определялся свой спектр риккетсий. Наибольшее разнообразие (шесть видов из восьми выявленных) обнаружены в клещах *Rhipicephalus sanguineus* и *Hyalomma marginatum*. В клещах *Rhipicephalus sanguineus* чаще всего присутствовала ДНК *R. conorii* (36,4%) и *R. aeschlimannii* (31,8%). В клещах *Hyalomma marginatum* с наибольшей частотой определялись *R. aeschlimannii* (46,6%) и *R. sibirica subsp. mongolotimonae* (26,6%). В клещах *Ixodes ricinus* обнаружены риккетсии 4-х видов, из них наиболее часто *R. helvetica* (в 50% всех исследованных особей), *R. monacensis* и *R. raoultii* (каждый с частотой в 23,3%). В клещах *Haemaphysalis punctata*, доля которых в сбо-

рах наибольшая, обнаружено три вида риккетсий – *R. aeschlimannii* (50%), *R. raoultii* (24%), *R. slovaca* (20%). В клещах *Dermacentor marginatus* – *R. raoultii* (71,4%) и *R. slovaca* (28,6%).

Выявлена определенная специфичность связей видов клещей и риккетсий. В условиях Крыма зарегистрирована высокая избирательность в выборе хозяев риккетсиями *R. helvetica*, которые встречались только в клещах *Ixodes ricinus*, в других видах клещей данный вид риккетсий не обнаружен. Наименьшую избирательность по отношению к клещам демонстрируют риккетсии *R. raoultii* и *R. slovaca*, которые обнаружены практически во всех исследованных видах иксодовых клещей, при этом демонстрируя некоторое «предпочтение» клещам *Dermacentor marginatus*.

Для риккетсий вида *R. slovaca*, как и вида *R. aeschlimannii*, занимающего по распространённости второе место после *R. raoultii*, в роли успешных хозяев выступают клещи вида *Haemaphysalis punctata*. Размножаются *R. aeschlimannii* в клещах видов *Rhipicephalus sanguineus* и *Hyalomma marginatum*. Ещё большую специфичность по отношению к клещам демонстрируют *R. conorii*, встречаясь в основном в клещах *Rhipicephalus sanguineus*. Высокая специфичность обнаруживается у *R. sibirica subsp. mongolotimonae*, по отношению к *Hyalomma marginatum*. Возможна высокая избирательность *R. monacensis* по отношению к *Ixodes ricinus* и *R. massiliae* к *Rhipicephalus sanguineus*, но пока речь идёт о единичных случаях, и для большей определённости необходимо увеличение числа наблюдений.

Распределение клещей по природно-климатическим зонам Крымского полуострова. Выявленное видовое разнообразие риккетсий необходимо связывать не только с комплексом «клещи-переносчики – животные-прокормители», но и с наличием различных природно-климатических зон. Территория Крымского полуострова, несмотря на сравнительно небольшую площадь, чётко разделяется на различные природно-климатические зоны (см. рисунок), для которых характерны определённые и специфические зоопаразитарные комплексы мелких млекопитающих и иксодовых клещей: 1 – степная зона, включающие в себя северные, северо-западные, северо-восточные территории; 2 – лесостепная зона предгорного Крыма; 3 – горнолесная зона; 4 – южнорезная субтропическая зона. Для получения по возможности более определённой картины ареалов риккетсий и их приуроченности к конкретным паразитарным эко-



Природно-климатические зоны Крымского полуострова: 1 – степная зона; 2 – лесостепная зона предгорного Крыма; 3 – горно-лесная зона; 4 – южнобережная субтропическая зона.

Таблица 4

ДНК-маркёр *Rickettsia species* в клещах различных природно-климатических зон (количество собранных клещей/количество клещей, содержащих геном риккетсий)

Вид клещей	Степная зона			Лесостепная зона		Горно-лесная и южно-бережная зоны
	Северо-западная прибрежная степная часть	Центральная часть	Восточная прибрежная часть	Центральная часть	Западная часть	
<i>Haemaphysalis punctata</i>	291/31 (10,7%)	11/0	592/293 (49,5%)	154/4 (2,6%)	13/5 (38,5%)	1/1 (100%)
<i>Dermacentor marginatus</i>	2/0	3 /3 (100%)	2/2 (100%)	102/52 (51,0%)	1/1 (100%)	0/0
<i>Dermacentor reticulatus</i>	-	-	-	18/5 (27,8%)	1/0	0/0
<i>Hyalomma marginatum</i>	62/11 (17,7%)	6/5 (83,3%)	63/30 (47,6%)	3/1 (33,3%)	2/1 (50,0%)	3/0
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16/2 (12,5%)	-	50/33 (66%)	134/8 (6,0%)	93/19 (20,4%)	2/0
<i>Ixodes ricinus</i>	3/1 (33,0%)	-	3/1(33,0%)	290/44 (15, 2%)	25/1 (4,0%)	16/0

системам, сбор клещей проводился в различных частях полуострова.

Доля (в %) присутствия ДНК-маркёра риккетсий в клещах одного и того же вида в различных районах Крыма различалась порой значительно (табл. 4). В северо-западной части степной зоны ДНК риккетсий в клещах *Haemaphysalis punctata* обнаружена в 10,7% случаев, в восточной части степной зоны – в 49,5%. В клещах *Hyalomma marginatum* этот показатель составил 17,7% в северо-западной части степной зоны и 47,6% в восточной части степной зоны; в клещах *Rhipicephalus sanguineus* – соответственно 12,5% и 66,0%.

Наиболее высокое содержание ДНК-маркёра риккетсий обнаружено в клещах в восточных районах степной зоны (Ленинский район) – 50,6%, в северо-западной части степной зоны эта величина составила 12,0%. Меньше всего ДНК-маркёр риккетсий выявлен в клещах, собранных в горнолесной и южнобережной зоне – в 4,5% собранных здесь клещей.

Наблюдается ряд особенностей географического распределения выявленных видов риккетсий (табл. 5). *R. helvetica* и *R. massiliae* выявлены только в лесостепных районах, там же в основном обнаруживаются *R. raoultii*, *R. conorii*, *R. monacensis*. *R. aeschlimannii* отмечены в основном в степной зоне, и только там обнаружена *R. sibirica subsp. mongolotimoniae*. *R. slovacica* распределена

между этими районами более равномерно. Распространённость различных видов риккетсий по территории Крымского полуострова в значительной мере обусловлена распространением клещей-носителей риккетсий. Ассоциированность *R. helvetica* и *R. raoultii* с клещами *Ixodes ricinus*, *R. conorii* с клещами *Rhipicephalus sanguineus* обуславливает их присутствие в лесостепных предгорных зонах, ассоциированность *R. aeschlimannii* с клещами *Haemaphysalis punctata* и *Hyalomma marginatum* ведёт к высокой встречаемости этого вида риккетсий в степных районах полуострова.

Обсуждение. Полученные предварительные данные по видовому составу риккетсий и встречаемости их в различных видах иксодовых клещей на территории природно-климатических зон Крымского полуострова перекликаются с данными, приводимыми исследователями Франции, Турции, Греции, Италии, Испании [3, 10 – 13].

Клещи *Rhipicephalus sanguineus* являются вектором для риккетсий *R. conorii* [14], что наблюдается и в нашем исследовании. В ходе исследования клещей *Rh. sanguineus*, собранных в г. Севастополь обнаружена одновременно ДНК двух видов риккетсий – *R. conorii conorii* и *R. massiliae* [9]. Выявление возбудителя в черте города объясняется возможностью горизонтальной трансмиссии риккетсий от заражённых клещей незаражённым при совместном нахождении и кормлении на

Распространённость риккетсий в различных климатогеографических зонах

Виды риккетсий	Степная зона	Лесостепная зона
<i>R. aeschlimannii</i>	27 (96,4%)	1 (3,6%)
<i>R. raoultii</i>	3 (8,1%)	34 (91,9%)
<i>R. slovacica</i>	9 (56,2%)	7 (43,8%)
<i>R. helvetica</i>	-	15 (100%)
<i>R. conorii</i>	1 (11,1%)	8 (88,9%)
<i>R. sibirica subsp. mongolotimonae</i>	5 (100%)	-
<i>R. massiliae</i>	-	2 (100%)
<i>R. monacensis</i>	1 (12,5%)	7 (87,5%)

животных (собаках) с высоким уровнем риккетсиемии, контакт животных друг с другом [15].

Крымский полуостров находится в пределах природного ареала средиземноморской («марсельской») лихорадки, основным возбудителем которой считается *R. conorii*. На различных территориях средиземноморских природных очагов риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки в качестве возбудителей отмечены как подвиды, так и близкородственные виды риккетсий – *R. conorii conorii*, *R. conorii israelensis*, *R. aeschlimannii*, *R. slovacica*, *R. massiliae*, *R. sibirica subsp. mongolotimonae* и другие [14].

Клинические случаи заболеваемости средиземноморской («марсельской») лихорадки на Крымском полуострове регистрируются ежегодно, со второй половины 90-х годов отмечается подъём заболеваемости [5, 16]. Наблюдаются выраженные особенности территориального распределения – случаи болезни встречались в основном в прибрежных западных и северо-западных степных районах, в меньшей степени в прибрежных районах южного и юго-восточного Крыма [5, 16]. В нашем исследовании основными видами клещей в северных степных районах являются *Haemaphysalis punctata*, у которых регистрируемый спектр геномов риккетсий не слишком обширен, в основном это *R. aeschlimannii* и *R. slovacica*. Наиболее патогенный вид *R. conorii*, в основном ассоциированный с клещами *Rhipicephalus sanguineus* [9], в этом районе выявляется редко (см. табл. 2, 3, 5). Наиболее часто клещи *Rhipicephalus sanguineus* регистрируются в западной части лесостепной зоны, где заболеваемость средиземноморской клещевой («марсельской») лихорадкой высока [16]. В наших результатах наиболее часто встречаются последовательности генов риккетсий *R. aeschlimannii*, *R. raoultii*, *R. slovacica*, которые составляют более 50% всех идентифицированных образцов. Наибольшее количество переносчиков возбудителей этих инфекций – клещей видов *Haemaphysalis punctata* и *Hyalomma marginatum* – собрано в степных районах, где заболеваемость риккетсиозами группы КППЛ либо невелика (Ленинский район) либо не диагностируется (Джанкойский и Нижнегорский районы). При сопоставлении с ранее описанной картиной распределения серологически подтверждённых случаев КППЛ [16] следует, что наиболее вирулентным возбудителем данного риккетсиоза в Крыму является *R. conorii*, другие же виды риккетсий либо не оказывают большого влияния на картину заболеваемости, либо инфицированность ими не приводит к выраженной клинической картине. О последнем свидетельствуют и данные литературы по заболеваемости риккетсиозами группы КППЛ в других регионах Европы. Для многих видов риккетсий, таких как

R. aeschlimannii, *R. slovacica*, *R. massiliae*, *R. raoultii*, *R. helvetica* показана их вирулентность для человека, но их вклад в картину заболеваемости риккетсиозами группы КППЛ в различных частях Средиземноморья значительно варьирует [17, 18]. Ввиду схожей клинической картины риккетсиозов с другими инфекциями, отсутствия современных лабораторных методов возникают трудности при проведении дифференциальной диагностики и соответственно проведении адекватного лечения [19].

Заключение. Полученные результаты являются шагом на пути изучения причин видового разнообразия риккетсий на практически изолированном Крымском полуострове. Одной из причин наблюдаемого разнообразия видов риккетсий может служить участие перелётных птиц, на роль которых в распространении риккетсий и их векторов неоднократно указывалось в опубликованных данных [3, 20, 21]. С одной стороны, территория Крыма является практически «островной», так как довольно изолирована от материковой части, особенно южная, горнолесная часть полуострова. Именно это является основной причиной того, что многие виды иксодовых клещей, как и животных и птиц – их основных прокормителей, имеют ареалы, ограниченные и изолированные на протяжении тысячелетий от основной части видовых ареалов. С другой стороны, северные районы Крыма, а именно Присивашье, лежит на пути перелётных маршрутов разнообразных мигрирующих видов птиц. Приведённые факторы могут служить, как объяснением полученных результатов исследований, так и основанием для поиска других видов риккетсий, несомненно, присутствующих в многообразных природных экосистемах Крымского полуострова. Полученная впервые для региона картина распространения различных видов риккетсий на территории полуострова, причинно-следственная оценка их значения в патологии человека, требует продолжения данного направления исследований.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 9-14, 17, 18, 20, 21
 см. REFERENCES)

1. Рудаков Н.В., Рудакова С.А. Клещевые трансмиссивные инфекции Сибири: практическое руководство. Омск: ООО Издательский центр «Омский научный вестник»; 2019.
2. Карташов М.Ю. Встречаемость и генетическое разнообразие риккетсий в клещах в некоторых регионах России. Дис.... канд. биол. наук. Новосибирск; 2017.
4. Алымов А.Я. Марсельская лихорадка. *Советская Медицина*. 1939; 13: 30-3.
5. Гафарова М.Т. Марсельская лихорадка (эпидемиология, клиника, диагностика). Симферополь: Тарпан; 2004.

MICROBIOLOGY

6. Ключкина Е.А. О клеще *Rhipicephalus sanguineus Latreille* – переносчике марсельской лихорадки. *Журнал микробиологии*. 1966; (11): 146.
7. Шутикова А.Л., Леонова Г.Н., Лубова В.А. Молекулярно-генетический мониторинг как основа современного эпидемиологического надзора за клещевыми инфекциями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 424-9.
8. Бондаренко Е.И., Щучинова Л.Д., Ечешева А.Б., Вараксин Н.А., Офицеров В.И. К вопросу об условиях хранения клещей, используемых для обнаружения генетического материала патогенных микроорганизмов. *Новости «Вектор-Бест»*. 2020; 3 (97): 2-7.
15. Еремеева М.Е., Шпынов С.Н., Токаревич Н.К. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4 (2): 113-34.
16. Малый К.Д., Андрухив И.Ю., Товпинец Н.Н., Кириченко В.Е., Дегтярева А.А., Альянки Л.Н. и др. Марсельская лихорадка. Динамика заболеваемости в Крыму по данным лабораторной диагностики. *Таврический медико-биологический вестник*. 2000; 3-4: 240-3.
19. Зверева Н.Н., Сайфуллин М.А., Карань Л.С., Ларичев В.Ф., Бутенко А.М., Базарова М.В. и др. Случай клещевой пятнистой лихорадки у ребенка, прибывшего из Крыма. *Детские инфекции*. 2018; 17 (4): 69-72.

REFERENCES

1. Rudakov N.V., Rudakova S.A. Tick-transmitted infections of Sibiria: practical guide. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2019. (in Russian)
2. Kartashov M.Y. Occurrence and genetic diversity of rickettsia in ticks in some regions of Russia. Diss. ... Novosibirsk; 2017. (in Russian)
3. Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Medianikov O., Kernif T. et al. Update on tick -borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26 (4): 657-702.
4. Alymov A.Ya. Marseille fever. *Sovetskaya Meditsina*. 1939; 13:30-3. (in Russian)
5. Gafarova M.T. Marseille fever (epidemiology, clinic, diagnostics) [Marsel'skaya likhoradka (epidemiologiya, klinika, diagnostika)]. Simferopol': Tarpan; 2004. (in Russian)
6. Klyushkina E.A. About the tick *Rhipicephalus sanguineus Latreille* – a carrier of Marseille fever. *Zhurnal mikrobiologii*. 1966; 11:146. (in Russian)
7. Shutikova A.L., Leonova G.N., Lubova V.A. Molecular-genetic monitoring as the basis of modern epidemiological surveillance of tick-borne infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (7): 424-9. (in Russian)
8. Bondarenko E.I., Shchuchinova L.D., Echesheva A.B., Varaksin N.A., Ofitserov V.I. On the question of the storage conditions of ticks used to detect the genetic material of pathogenic microorganisms. *Novosti «Vector-Best»*. 2020; 3 (97): 2-7. (in Russian)
9. Alieva E.E., Bondarenko E.I., Maliy K.D., Shvalov A.N., Verbenets E.A., Gafarova M.T. The role of *Rhipicephalus sanguineus* mites parasitizing on dogs in the spread of tick-borne rickettsiosis pathogens in Sevastopol. *New Microbes New Infect.* 2020; 36: 100704.
10. Keskin Ad. Bursali A., Keskin Ay., Tekin S. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in ticks removed from humans in Turkey. *Ticks Tick-borne Dis.* 2016; 7 (5): 951-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis>. – 2016.04.015.
11. Kachrimanidou M., Souliou E., Pavlidou V. Antoniadis A., Papa A. First detection of Rickettsia slovaca in Greece. *Exp. Appl. Acarol.* 2010; 50: 93-6. DOI 10.1007/s10493-009-9283-x.
12. Tomassone L., Portillo A., Nováková M., de Sousa R., Oteo J.O. Neglected aspects of tick-borne rickettsioses *Parasites & Vectors*. 2018; 11: 263. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2856-y>.
13. Herrador Z., Fernandez-Martinez A., Gomez-Barroso D., LeoÂn I., Vieira C., Muro A. et al. Mediterranean spotted fever in Spain, 1997-2014: Epidemiological situation based on hospitalization records. *PLoS ONE*. 2017; 12(3): 0174745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174745>.
14. Brouqu P., Parola P., Fournier P.E., Raoult D. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2007. 49: 2-12.
15. Eremeeva M.E., Shpynov S.N., Tokarevich N.K. Modern approaches to laboratory diagnosis of rickettsial diseases. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(2):113-34. (in Russian)
16. Maliy K.D., Andrukhiv I.Yu., Tovpinets N.N., Kirichenko V.E., Degtyareva A.A., Alyanaki L.N. et al. Marseilles fever. Morbidity dynamics in Crimea according to laboratory diagnostics data. *Tavrichesky mediko-biologicheskij vestnik*. 2000. 3-4: 240-3. (in Russian)
17. Walker D.H., Valbuena G.A., Olano J.P. Pathogenic Mechanisms of Diseases Caused by Rickettsia. 2003. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003; 990: 1-11.
18. Oteo J.A., Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2012; 3 (5-6): 271-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.035>.
19. Zvereva N.N., Saifullin M.A., Karan L.S., Bazarova M.V., Saifullin R.F., Smetanina S.V. The Case of Tick-borne Spotted Fever in a Child Arriving from the Crimea. *Detskie Infektsii*. 2018; 17(4):69-72. (in Russian)
20. Socolovschi C., Reynaud P., Kernif T., Raoult D., Parola P. Rickettsiae of spotted fever group, *Borrelia valaisiana*, and *Coxiella burnetii* in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012; 3: 355-60.
21. Leblebicioglu H., Eroglu C., Erciyas-Yavuz K., Hokelek M., Acici M., Yilmaz H. Role of Migratory Birds in Spreading Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Turkey. 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 2014; 20 (8): 1331-4.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Годовалов А. П., Задорина И. И., Быкова Л. П., Пастухов Д. М., Яковлев М. В.

СПОСОБ ЭКСПРЕСС-ДЕТЕКЦИИ *ESCHERICHIA COLI* И БАКТЕРИЙ ГРУППЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Россия

В последнее время при диагностике заболеваний решающее место отводится лабораторным методам исследования, которые должны быть информативными, относительно простыми в исполнении и быстрыми. Описана апробация метода экспресс-детекции Escherichia coli и бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в ротовой полости. В исследовании участвовали 44 добровольца, у которых проводили забор материала из ротовой полости с последующей инкубацией в питательной среде Кода. В исследовании использовали ротовую (n=11) и десневую жидкости (n=11); мазки-отпечатки со слизистой оболочки полости рта (n=11); зубную биоплёнку (n=11). Через 24 часа оценивали изменение цвета и прозрачности среды. Сохранение средой исходного зелёного цвета и прозрачности означало отсутствие в пробе E. coli и БГКП. Изменение цвета среды на жёлтый, мутность и/или образование пузырьков означало присутствие E. coli и БГКП. Параллельно осуществляли посев материала на среду Эндо с последующей идентификацией штаммов до вида. Показано полное совпадение результатов бактериологического метода и способа с применением среды Кода. В последнем случае существенным преимуществом является быстрота получения результата (18-20 ч), в отличие от классического метода, интерпретация результатов которого доступна только спустя 72 ч и более, что соответствует современному положению клинической микробиологии и быстрой диагностике по принципу «у постели больного / в кабинете врача». Представленный способ может быть успешно применён в клинической практике для топической диагностики микроорганизмов E. coli и БГКП в ротовой полости.

Ключевые слова: экспресс-диагностика; *Escherichia coli*; бактерий группы кишечной палочки (БГКП); микробиота полости рта.

Для цитирования: Годовалов А.П., Задорина И.И., Быкова Л.П., Пастухов Д.М., Яковлев М.В. Способ экспресс-детекции *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки в ротовой полости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 177-179. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-177-179>

Для корреспонденции: Годовалов Анатолий Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., доц., e-mail: AGodovalov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 24.06.2021

Принята к печати 22.12.2021

Опубликовано 25.03.2022

Godovalov A. P., Zadorina I. I., Bykova L. P., Pastukhov D. M., Yakovlev M. V.

EXPRESS DETECTION OF *ESCHERICHIA COLI* AND BACTERIA OF *ESCHERICHIA COLI* GROUP AT THE ORAL CAVITY

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Currently, in the diagnosis of diseases, a decisive place is given to laboratory methods, which should be informative, relatively simple to perform and rapid. The article describes the approbation of a method for rapid detection of Escherichia coli and bacteria of Escherichia coli group in the oral cavity. Research involved 44 volunteers, who were sampled from the oral cavity, followed by incubation in Koda's medium. The study used oral (n=11) and gingival fluids (n=11); smears-prints from the oral mucosa (n=11); dental biofilm (n=11). After 24 hours, the change in color and transparency of the medium was assessed. The preservation of the initial green color and transparency by the medium meant the absence of E. coli and bacteria of Escherichia coli group in the sample. A change in the color of the medium to yellow, turbidity and / or the formation of bubbles indicated the presence of E. coli and bacteria of Escherichia coli group. In parallel, the material was inoculated onto Endo agar; followed by identification of strains to species. As a result of the study, a complete coincidence of the results of the classical bacteriological method and the method using Koda medium was shown. In the latter case, a significant advantage is the speed of obtaining the result (18-20 hours), in contrast to the classical method, the interpretation of the results of which is available only after 72 hours or more. All of this is in line with the state of the art in clinical microbiology and rapid diagnosis based on «point-of-care testing / doctor's office» diagnostic principle. The presented method can be successfully applied in clinical practice for topical diagnosis of microorganisms E. coli and bacteria of Escherichia coli group in the oral cavity.

Key words: microbiological rapid diagnostics; *Escherichia coli*; bacteria of the *E. coli* group; oral microbiota.

For citation: Godovalov A.P., Zadorina I.I., Bykova L.P., Pastukhov D.M., Yakovlev M.V. Express detection of *Escherichia coli* and bacteria of the *Escherichia coli* group at the oral cavity. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 177-179 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-177-179>

For correspondence: Godovalov A.P.; e-mail: AGodovalov@gmail.com

Information about authors:

Godovalov A. P., <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>;
Zadorina I.I., <https://orcid.org/0000-0002-1819-4793>;
Bykova L.P., <https://orcid.org/0000-0002-4235-7302>;
Pastukhov D. M., <https://orcid.org/0000-0002-7363-5774>;
Yakovlev M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2895-387X>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 24.06.2021

Accepted 22.12.2021

Published 25.03.2022

Введение. Микробиоценоз полости рта представлен более чем 700 видами различных микроорганизмов, среди которых весомую часть составляют резидентные таксоны [1]. К факторам, влияющим на резидентную микрофлору полости рта, относят: плохую гигиену, иммунодефицитные состояния, изменение микробиоты другой близлежащей области (носоглотки, пищеварительного тракта и др.). В биотопах полости рта здоровых людей постоянно не встречаются грамотрицательные энтеробактерии и присутствие *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки (БГКП; микроорганизмы родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) ассоциируется с развитием как дисбиотических состояний [2, 3], так и ряда воспалительных заболеваний [4].

В клинической практике достаточно часто встречаются ситуации, когда при смешанной (нетипичной) клинической симптоматике затруднена постановка диагноза. В таких случаях решающее место отводится дополнительным методам исследования, в том числе лабораторным, которые должны быть информативными, относительно простыми в исполнении и быстрыми [5].

Из существующих лабораторных микробиологических тестов представляет интерес метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии, который основан на методике извлечения из биологических проб (выдыхаемый воздух) маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов, стеринов) [6, 7]. Однако такой метод отличается высокой стоимостью, необходимостью специального оборудования (газовый хроматограф масс-спектрометр) и специально обученного персонала, обладающего навыками работы. Не описана корреляция детектируемых метаболитов с конкретным видом микроорганизмов ротовой полости, что определяет невозможность топической диагностики [8].

В санитарной микробиологии внедрены тесты ускоренной детекции отдельных групп микроорганизмов, основанные на изменении цвета среды [9, 10]. Применение таких питательных сред в клинической практике будет перспективным, в связи с чем предлагается применение селективной питательной среды Кода для детекции в биоматериалах ротовой полости *E. coli* и БГКП, без выделения чистой культуры и идентификации микроорганизмов.

Цель исследования – апробировать способ экспресс-детекции *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки в различных биотопах ротовой полости.

Материал и методы. У 44 добровольцев проведено исследование биологического материала различных биотопов полости рта: забор ротовой жидкости ($n=11$) и десневой жидкости ($n=11$) осуществляли с помощью микропипетки; со слизистой оболочки полости рта ($n=11$) брали мазок-отпечаток с помощью стерильного

ватного тампона; зубную биоплёнку ($n=11$) – с помощью экскаватора № 3 (Экрадент, Россия). Биоматериалы помещали в питательную среду Кода, разлитую по микропробиркам типа Эппендорф, в объеме 1,8 мл, инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре 37° С, после чего оценивали изменение цвета и мутности питательной среды. Сохранение средой исходного зелёного цвета и прозрачности означало отсутствие в пробе *E. coli* и БГКП. Изменение цвета среды на жёлтый, мутность и (или) образование пузырьков означало присутствие *E. coli* и БГКП [11].

Одновременно все пробы подвергали культуральному исследованию с использованием агара Эндо для селективного выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Все выросшие штаммы идентифицировали до вида.

От всех добровольцев, участвовавших в исследовании, получено добровольное, информированное согласие. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России.

Результаты и обсуждение. Установлено полное совпадение полученных результатов при культивировании биологических материалов в среде Кода и на среде Эндо. В случае помутнения и изменения цвета среды Кода на интенсивный жёлтый, на среде Эндо наблюдали рост красных колоний с металлическим блеском, которые впоследствии идентифицированы как *E. coli*. В случае, когда цвет среды Кода не менялся, на среде Эндо отсутствовал рост бактерий. При использовании среды Кода можно получить результаты через 18-20 ч, а при проведении культурального метода – через 72 ч и более.

Предлагаемый подход может быть успешно применён для определения биотопов полости рта, колонизированных *E. coli* и БГКП. Установлено присутствие *E. coli* в ротовой и десневой жидкостях у 25% обследованных. При этом во всех случаях наблюдалась локализация *E. coli* и БГКП в зубной биоплёнке.

Микрофлора полости рта отличается рядом особенностей и представляет уникальную сложно организованную структуру, состоящую из большого числа микроорганизмов. В такой ситуации точная идентификация того или иного вида микроорганизмов в биотопах ротовой полости имеет существенное значение для диагностики воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта и тканей пародонта, приобретает принципиальную важность при коррекции или разработке схемы лечения. В клинической микробиологии в последнее время ведущим направлением является разработка ускоренных тестов, позволяющих проводить диагностику «у постели больного / в

кабинете врача» [12]. Предлагаемый способ детекции *E. coli* и БГКП предполагает использование селективной питательной среды и существенно сокращает сроки получения результата исследования. Среда Кода за счёт наличия сульфанола (алкиларилсульфонат) обеспечивает преимущественный рост таких грамотрицательных энтеробактерий, как *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* [13]. Указанные микроорганизмы обладают широким спектром факторов патогенности и способны вызывать гнойно-воспалительные заболевания в биотопах, нетипичных для их обитания, которым является ротовая полость [14].

Заключение. Предлагаемый способ экспресс-детекции позволяет своевременно и в короткие сроки провести топическую детекцию *E. coli* и БГКП в полости рта, что является ключевым маркером в диагностике дисбиоза полости рта. Полученные результаты исследования могут быть использованы для коррекции или разработки плана медикаментозной терапии и последующей оценки эффективности лечения.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-5, 7, 8, 12, 14
см. REFERENCES)

2. Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Изотова Г.Н., Старостина А.Е., Лапченко А.С. Клинико-микробиологическая характеристика дисбиотических изменений слизистой оболочки полости рта и ротоглотки. *Медицинский совет*. 2016; 6: 32-5.
6. Сурдина Э.Д., Родионов Г.Г., Силин А.В., Плавинский С.Л., Каспина А.И., Болотова М.Е., Ворошилова Т.М. Оценка микробиоты полости рта, тонкой и толстой кишки у больных красным плоским лишаем слизистой оболочки рта. *Пародонтология*. 2017; 2 (83): 47-52.
9. Зайнуллина А.Р., Халиуллин Э.М., Яковлева Г.Ю., Петухова Е.В. Разработка микробиологических тестов для анализа качества пищевых продуктов. *Вестник Технологического университета*. 2018; 21(2): 233-6.
10. Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Марговецкий М.Н., Храмов М.В. Разработка и использование новой питательной среды для выявления и идентификации санитарно-показательных микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2008; 6: 70-2.
11. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Задорина И.И., Яковлев М.В., Пастухов Д.М. Способ экспресс-диагностики *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки в ротовой полости. Патент РФ № RU 2732412 C1; 2020.
13. Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. Оболensk; 2017.
1. Sharma N., Bhatia S., Sodhi A.S., Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol*. 2018; 4(1): 42-66.
2. Kryukov A.I., Kunel'skaya N.L., Gurov A.V., Izotova G.N., Starostina A.E., Lapchenko A.S. Clinical and microbiological characteristics of dysbiotic changes in the mucous membrane of the oral cavity and oropharynx. *Meditsinskiy sovet*. 2016; 6: 32-5. (in Russian)
3. Gavriush T.V. Dysbioses of the oral cavity and intestines and immune reactivity in of adolescent bronchial asthma patients. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2001; 6: 74-7.
4. He X., Tian Y., Guo L., Lux R., Zusman D.R., Shi W. Oral-derived bacterial flora defends its domain by recognizing and killing intruders – a molecular analysis using *Escherichia coli* as a model intestinal bacterium. *Microb. Ecol*. 2010; 60(3): 655-64.
5. Lagier J.C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev*. 2015; 28(1): 208-36.
6. Surdina Ye.D., Rodionov G.G., Silin A.V., Plavinskiy S.L., Kaspina A.I., Bolotova M.E., Voroshilova T.M. Evaluation of the microbiota of the oral cavity, small and large intestine in patients with lichen planus of the oral mucosa. *Parodontologiya*. 2017; 2 (83): 47-52. (in Russian)
7. Smith M.L., Miguez A.M., Styczynski M.P. Gas chromatography-mass spectrometry microbial metabolomics for applications in strain optimization. *Methods Mol. Biol*. 2019; 1927: 179-89.
8. Ozeki M., Nozaki T., Aoki J., Bamba T., Jensen K.R., Murakami S., Toyoda M. Metabolomic analysis of gingival crevicular fluid using gas chromatography/mass spectrometry. *Mass. Spectrom. (Tokyo)*. 2016; 5(1): A0047.
9. Zaynullina A.R., Haliullin Ye.M., Yakovleva G.Yu., Petuhova E.V. Development of microbiological tests for the analysis of food quality. *Vestnik Tehnologicheskogo universiteta*. 2018; 21(2): 233-6. (in Russian)
10. Polosenko O.V., Marchihina I.I., Sholokhova L.P., Martoveckiy M.N., Khramov M.V. Development and use of a new culture medium for the detection and identification of sanitary-indicative microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2008; 6: 70-2. (in Russian)
11. Godovalov A.P., Bykova L.P., Zadorina I.I., Yakovlev M.V., Pastuhov D.M. A method for express diagnostics of *Escherichia coli* and bacteria of the *Escherichia coli* group in the oral cavity. Patent RF № RU 2732412 C1; 2020. (in Russian)
12. Kozel T.R., Burnham-Marusich A.R. Point-of-care testing for infectious diseases: past, present, and future. *J. Clin. Microbiol*. 2017; 55(8): 2313-20.
13. Shepelin A.P., Dyatlov I.A. Culture media for enterobacteriaceae. Obolensk; 2017. (in Russian)
14. van Winkelhoff A.J., Rurenga P., Wekema-Mulder G.J., Singadji Z.M., Rams T.E. Non-oral gram-negative facultative rods in chronic periodontitis microbiota. *Microb. Pathog*. 2016; 94: 117-22.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Новикова И.Е.¹, Садеева З.З.¹, Шакирзянова Р.А.¹, Алябьева Н.М.¹, Лазарева А.В.¹, Карасева О.В.²,
Вершинина М.Г.¹, Фисенко А.П.¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В РУТИННОЙ ПРАКТИКЕ ПЕДИАТРИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

²ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения г. Москвы, 119180, Москва, Россия

Цель – оценка ПЦР-РВ для детекции генов резистентности к карбапенемам грамотрицательных бактерий. Исследовано 499 изолятов грамотрицательных микроорганизмов, выделенных в двух педиатрических стационарах в 2019–2020 г. г. Видовую идентификацию проводили методом MALDI-ToF масс-спектрометрии (Bruker Daltonics, Германия). Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) меропенема и имипенема определяли методом E-тестов (BioMerieux, Франция). Наличие генов приобретённых карбапенемаз групп IMP, NDM, VIM, KPC, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-58 определяли методом ПЦР-РВ. Среди отобранных штаммов выявлены Klebsiella pneumoniae (34%), Escherichia coli (4%), Serratia marcescens (6%) и другие представители порядка Enterobacterales (6%), грамотрицательные неферментирующие глюкозу бактерии Acinetobacter baumannii (14%), Pseudomonas aeruginosa (36%). Продукция карбапенемаз обнаружена у 385 изолятов (77%). Основным механизмом, определяющим резистентность к карбапенемам P. aeruginosa стала продукция bla_{VIM} (100%). Среди штаммов A. baumannii выявлены карбапенемазы OXA-23 (55%) и OXA-40 (45%). Основной детерминантой резистентности среди штаммов K. pneumoniae стала карбапенемаза OXA-48, выявленная у 63% образцов, 13% обладали bla_{NDM-group}, сочетание генов карбапенемаз bla_{NDM-group} и bla_{OXA-48-like} обнаружено у 16% изолятов. Карбапенемаза группы KPC детектирована у 8% штаммов K. pneumoniae. Среди штаммов S. marcescens преобладала карбапенемаза группы OXA-48 (95%). Большинство изолятов E. coli обладали металло-бета-лактамазой группы NDM (89%). Другие представители порядка Enterobacterales чаще всего обладали карбапенемазой OXA-48 (57%), у 39% изолятов обнаружено носительство bla_{NDM-group}. У одного штамма выявлена комбинация bla_{NDM-group} и bla_{OXA-48-like}. ПЦР-РВ является быстрым и надёжным методом выявления приобретённых карбапенемаз и может быть рекомендована для использования в рутинной практике бактериологических лабораторий.

Ключевые слова: Klebsiella pneumoniae; Acinetobacter baumannii; Pseudomonas aeruginosa; карбапенемазы; ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Новикова И.Е., Садеева З.З., Шакирзянова Р.А., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Карасева О.В., Вершинина М.Г., Фисенко А.П. Использование полимеразной цепной реакции для детекции генов резистентности у грамотрицательных бактерий в рутинной практике педиатрического стационара. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (3): 180-185. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-180-185>

Для корреспонденции: Новикова Ирина Евгеньевна, мл. науч. сотр. лаб. микробиологии; e-mail: novikovayudina@outlook.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 13.07.2021

Принята к печати 28.10.2021

Опубликовано 25.03.2022

Novikova I.E.¹, Sadeeva Z.Z.¹, Shakirzyanova R.A.¹, Alyabieva N.M.¹, Lazareva A.V.¹, Karaseva O.V.², Verшинina M.G.¹, Fisenko A.P.¹

THE USING OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DETECTION OF RESISTANCE GENES IN GRAM-NEGATIVE BACTERIA IN ROUTINE PRACTICE IN A PEDIATRIC HOSPITAL

¹Federal State Autonomous Institution «National Medical Research Center of Children's Health» of the Ministry of Health, 119991, Moscow, Russia;

²Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Trauma/CRIEPST (Publicity funded health facility of Moscow City Health Department), 119180, Moscow, Russia

Objective – assessment of RT-PCR for the detection of carbapenem-resistance genes in gram-negative bacteria. A total, 499 strains of gram-negative microorganisms isolated in two pediatric hospitals in 2019–2020 were studied. Species identification was performed using MALDI-ToF mass-spectrometry (Bruker Daltonics, Germany). Meropenem and imipenem minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by E-test method (BioMerieux, France). The presence of acquired carbapenemase genes of IMP, NDM, VIM, KPC, OXA-48, OXA-23, OXA-40, OXA-58-groups was determined by RT-PCR. Klebsiella pneumoniae (34%), Escherichia coli (4%), Serratia marcescens (6%) and other members of Enterobacterales (6%), also gram-negative non-glucose-

fermenting bacteria *Acinetobacter baumannii* (14%), *Pseudomonas aeruginosa* (36%) were found among selected strains. Carbapenemase production was found in 385 isolates (77%). The main mechanism determining carbapenem resistance in *P. aeruginosa* was the production of bla_{VIM} (100%). *A. baumannii* strains harbored OXA-23 (55%) and OXA-40 (45%) carbapenemases. The major determinant of carbapenem resistance in *K. pneumoniae* isolates was OXA-48 carbapenemase, detected in 63% strains, 13% of the strains possessed $bla_{\text{NDM-group}}$, 16% isolates had a combination of $bla_{\text{NDM-group}}$ and $bla_{\text{OXA-48-like}}$. Carbapenemase of KPC-group was found in 8% *K. pneumoniae* strains. OXA-48 carbapenemase prevailed (95%) among *S. marcescens* strains. Most of *E. coli* isolates harbored metallo-beta-lactamase NDM (89%). Other members of Enterobacterales most often had OXA-48 carbapenemase (57%), 39% of the isolates carried $bla_{\text{NDM-group}}$. In one strain, a combination of $bla_{\text{NDM-group}}$ and $bla_{\text{OXA-48-like}}$ was discovered. RT-PCR is a fast and reliable method for the detection of acquired carbapenemases and can be recommended for routine use in bacteriological laboratories.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; carbapenemases; real-time PCR.

For citation: Novikova I.E., Sadeeva Z.Z., Shakirzyanova R.A., Alyabieva N.M., Lazareva A.V., Karaseva O.V., Vershinina M.G., Fisenko A.P. The using of the polymerase chain reaction for the detection of resistance genes in gram-negative bacteria in routine practice in a pediatric hospital. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 180-185 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-180-185>

For correspondence: Novikova I.E., Junior Researcher of the Molecular Microbiology Laboratory; e-mail: novikovayudina@outlook.com

Information about authors:

Novikova I.E., <https://orcid.org/0000-0003-4234-0209>;
Sadeeva Z.Z., <https://orcid.org/0000-0002-4587-0902>;
Shakirzyanova R.A., <https://orcid.org/0000-0003-4538-0273>;
Alyabieva N.M., <https://orcid.org/0000-0001-9365-9143>;
Lazareva A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3896-2590>;
Karaseva O.V., <https://orcid.org/0000-0001-9418-4418>;
Vershinina M.G., <https://orcid.org/0000-0001-6051-5231>;
Fisenko A.P., <https://orcid.org/0000-0001-8586-7946>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.07.2021
Accepted 28.10.2021
Published 25.03.2022

Введение. В этиологической структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), ведущая роль принадлежит грамотрицательным условно-патогенным микроорганизмам (УПМ), таким как *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* [1-5]. Госпитальные штаммы этих УПМ часто обладают фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). По данным многоцентрового исследования МАРАФОН, проведённого в 2015-2016 г. г., фенотипом МЛУ обладали 14,4% госпитальных изолятов Enterobacterales, 76,2% – *A. baumannii*, 35,0% – *P. aeruginosa* [6-8].

Наблюдается рост устойчивости грамотрицательных УПМ к антимикробным препаратам (АМП), особенно из группы карбапенемов, которые в течение длительного времени считались АМП резерва [9-10]. Основным механизмом резистентности к б-лактамам, в целом, и к карбапенемам в частности является продукция ферментов, гидролизующих АМП, таких как карбапенемазы [11-12]. В распространении устойчивости к карбапенемам важную роль наряду с представителями порядка Enterobacterales играют *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Природная устойчивость данных УПМ ко многим классам АМП объясняет трудности лечения инфекций, ассоциированных с ними, и обуславливает необходимость использования карбапенемов и их комбинаций с другими АМП широкого спектра действия. Обладая пластичным геномом, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* способны приобретать и интегрировать новые детерминанты резистентности, например, гены карбапенемаз, приобретая фенотип МЛУ и становясь векторами диссеминации устойчивости к карбапенемам не только на уровне вида, но и между видами [13].

Важными детерминантами антибиотикорезистентности многих энтеробактерий и грамотрицательных неферментирующих УПМ являются приобретённые карбапенемазы. Ферменты классов А, С, Д являются сериновыми б-лактамазами, ферменты класса В – металло-бета-лактамазами (МБЛ), они содержат атом цинка в активном центре. Мобильные генетические элементы, в состав которых входят гены, кодирующие карбапенемазы, способствуют их быстрому распространению в госпитальной среде [14-15].

В детских стационарах недостаточно изучен спектр микрофлоры в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), её чувствительность к АМП и механизмы резистентности [16-18]. В России, согласно данным многоцентрового исследования МАРАФОН в 2015-2016 гг., наиболее частыми возбудителями ИСМП являлись *K. pneumoniae* (47,2%), *Escherichia coli* (30,0%), *A. baumannii* (16,8%), *P. aeruginosa* (17,4%) [6-8]. Согласно исследованию, проведённому среди детей, находившихся на искусственной вентиляции лёгких в ОРИТ, в структуре микробиоты преобладали *K. pneumoniae* (45%), *P. aeruginosa* (33%), *A. baumannii* (27-37%) [19].

Развитие и совершенствование молекулярно-генетических технологий внесло существенный вклад в формирование знаний, касающихся механизмов устойчивости к АМП, их эволюции и распространения. ПЦР-РВ является точным и быстрым способом детекции продукции карбапенемаз в диагностических лабораториях. Высокие воспроизводимость, чувствительность и специфичность делают ПЦР-РВ надёжным методом для скрининга на наличие генов карбапенемаз, что позволяет осуществлять мониторинг их эпидемиологического распространения [20-21]. В основе эффективности

антибактериальной терапии лежат актуальные данные о частоте и механизмах резистентности конкретного вида возбудителя инфекционного процесса. Изучение приоритетных патогенов с использованием микробиологических и молекулярно-генетических методов, нацеленное на определение механизмов устойчивости к АМП, будет способствовать рациональному выбору АМП и разработке мер по преодолению устойчивости.

Цель исследования – оценка ПЦР-РВ для детекции генов резистентности к карбапенемам грамотрицательных бактерий.

Материал и методы. Объект исследования – штаммы *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia marcescens* и другие представители Enterobacterales, полученные из биоматериала детей из отделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России и НИИ неотложной детской хирургии и травматологии Департамента здравоохранения г. Москвы. Критериями включения в исследование штаммов послужили рекомендации Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам (EUCAST), который для выявления продукции карбапенемаз у энтеробактерий рекомендует исследовать изоляты, минимальная подавляющая концентрация (МПК) меропенема которых >0,125 мг/л или диаметр зоны подавления роста <28 мм [22]. Включенные в исследование штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa* относились к категории резистентных к карбапенемам в соответствии с критериями EUCAST [22]. Посевы биологического материала производили на питательные среды: кровяной агар и Uri-select agar (BioRad, США), инкубировали в термостате при температуре 37° С в течение 24–48 часов.

Видовую идентификацию проводили на масс-спектрометре MALDI-ToF MS (Bruker Daltonics, Германия). Образцы крови инкубировали в анализаторе гемокультур ВАСТЕС 9050 (Becton Dickinson, США) до момента регистрации роста микроорганизмов, затем проводили высеивание на плотные питательные среды для выделения чистой культуры возбудителя.

Для определения чувствительности к меропенему и имипенему использован метод Е-тестов (BioMerieux, Франция) на среде Мюллера-Хинтона (Biogad, США). Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями EUCAST [22].

Изоляты энтеробактерий протестированы на наличие генов карбапенемаз групп IMP, NDM, VIM, KPC,

OXA-48; *P. aeruginosa* на наличие МБЛ групп IMP, NDM, VIM; *A. baumannii* на наличие карбапенемаз групп OXA-23, OXA-40, OXA-58. Для выделения ДНК использована суточная культура, полученная при посеве на плотные питательные среды, указанные выше. Бактериальную ДНК выделяли с помощью коммерческих наборов «ГК-экспресс» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. Выявление генов приобретенных карбапенемаз проводили с использованием наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (IMP, NDM, VIM), «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (KPC, OXA-48), «АмплиСенс® MDR Ab-OXA-FL» (OXA-23, OXA-40, OXA-58), производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора. В качестве положительного и отрицательного контролей использованы соответствующие образцы, входящие в состав набора. Реакцию амплификации проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты и обсуждение. В период 2019–2020 гг. исследовано 418 образцов биоматериала, из которых выделено 499 штаммов микроорганизмов. Материал доставлен от детей ОПИТ, отделений хирургии, пульмонологии, ревматологии, урологии, новорожденных детей. Локусы исследования представлены в табл. 1.

Среди исследуемых штаммов обнаружены представители порядка Enterobacterales: *K. pneumoniae* (n=169, 34%), *E. coli* (n=22, 4%), *S. marcescens* (n=29, 6%) и другие (n=29, 6%); грамотрицательные неферментирующие глюкозу бактерии: *A. baumannii* (n=71, 14%), *P. aeruginosa* (n=179, 36%) (см. рисунок).

Все представители порядка Enterobacterales имели МПК меропенема >0,125 мг/л. Штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa* определены как нечувствительные к карбапенемам (МПК имипенема >4 мг/л, МПК меропенема >8 мг/л).

Продукция карбапенемаз обнаружена у 385 изолятов (77%). Среди них встречались штаммы *P. aeruginosa* (31%, n=118), *A. baumannii* (17%, n=64), *K. pneumoniae* (37%, n=141), *S. marcescens* (5%, n=20), *E. coli* (5%, n=19) и другие представители порядка Enterobacterales (6%, n=23) (табл. 2).

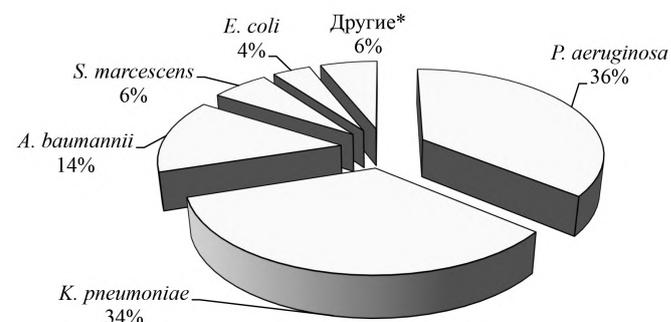
Изоляты *P. aeruginosa* обладали МБЛ группы VIM (n=118, 100%), других карбапенемаз не найдено. Среди штаммов *A. baumannii* преобладала карбапенемаза OXA-23 (n=35, 55%), у остальных изолятов обнаруже-

Таблица 1

Локусы исследования

Локусы	n	%
Анус	137	33
Зев	112	27
Моча	30	7
Нижние дыхательные пути	91	22
Стома	21	5
Рана	17	4
Кровь	5	1
Брюшная полость	5	1
Всего	418	100

Примечание. Здесь и в табл. 2: n – количество исследуемых образцов.



Видовой состав выделенных штаммов.

* – Другие: *Klebsiella oxytoca* (n=2), *Klebsiella variicola* (n=5), *Enterobacter aerogenes* (n=2), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Enterobacter cloacae* (n=6), *Serratia ureilytica* (n=1), *Citrobacter freundii* (n=7), *Citrobacter farmeri* (n=3), *Morganella morganii* (n=2).

Гены резистентности и их комбинации у штаммов, продуцирующих карбапенемазы

Вид	n	OXA-48	KPC	NDM	OXA-48 + NDM	VIM	IMP	OXA-23	OXA-40	OXA-58
<i>K. pneumoniae</i>	141	89 (63%)	11 (8%)	19 (13%)	22 (16%)	0	0	н/о	н/о	н/о
<i>S. marcescens</i>	20	19 (95%)	0	1 (5%)	0	0	0	н/о	н/о	н/о
<i>E. coli</i>	19	2 (11%)	0	17 (89%)	0	0	0	н/о	н/о	н/о
Другие <i>Enterobacterales</i>	23	13 (57%)	0	9 (39%)	1 (4%)	0	0	н/о	н/о	н/о
<i>P. aeruginosa</i>	118	н/о	н/о	0	н/о	118 (100%)	0	н/о	н/о	н/о
<i>A. baumannii</i>	64	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	35 (55%)	29 (45%)	0

Примечание. н/о – не определялись.

на карбапенемаза OXA-40 ($n=29$, 45%). Карбапенемазы OXA-58 и комбинаций генов у исследованных штаммов *A. baumannii* не найдено. Карбапенемаза OXA-48 выявлена у большинства образцов *K. pneumoniae* ($n=89$, 63%), в 19 образцах (13%) детектирован ген $bla_{\text{NDM-group}}$, сочетание генов карбапенемаз $bla_{\text{NDM-group}}$ и $bla_{\text{OXA-48-like}}$ обнаружено у 22 изолятов (16%). Одиннадцать изолятов (8%) продуцировали $bla_{\text{KPC-group}}$. Главной детерминантой резистентности среди штаммов *S. marcescens* была карбапенемаза группы OXA-48 ($n=19$, 95%). Один изолят показал наличие $bla_{\text{NDM-group}}$. Среди изолятов *E. coli* преобладала МБЛ группы NDM ($n=17$, 89%), у остальных штаммах выявлен ген $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ($n=2$, 11%). Другие представители порядка Enterobacterales в большинстве случаев обладали карбапенемазой OXA-48 ($n=13$, 57%), у девяти изолятов обнаружено носительство $bla_{\text{NDM-group}}$ (39%). У одного штамма выявлена комбинация $bla_{\text{NDM-group}}$ и $bla_{\text{OXA-48-like}}$.

У большей части протестированных образцов выявлена продукция карбапенемаз различных групп. По данным исследования МАРАФОН 2015-2016 гг. резистентность к карбапенемам *P. aeruginosa*, главным образом, ассоциировалась с карбапенемазами группы VIM [7]. В исследовании, проведенном нашими коллегами ранее, сообщалось, что носителями карбапенемазы группы VIM являлись 60% карбапенемрезистентных изолятов *P. aeruginosa* [19]. Результаты настоящего исследования подтверждают эти данные.

У штаммов *A. baumannii* обнаружены широко распространенные в мире OXA-23 и OXA-40-подобные карбапенемазы [23]. Ген $bla_{\text{OXA-23}}$ впервые детектирован у нечувствительного к имипенему штамма *A. baumannii*, изолированного от пациента в Шотландии [24], впоследствии обнаружен во многих регионах мира: Бразилии, Кореи, Австралии и других странах [25-29]. OXA-24-подобный фермент, идентичный OXA-40, впервые обнаружен у штамма *A. baumannii* в Испании [30]. В настоящее время карбапенемрезистентные штаммы *A. baumannii*, продуцирующие OXA24/40-подобные карбапенемазы являются причиной вспышек ИСМП в различных регионах [31-33]. Среди карбапенемрезистентных изолятов *A. baumannii* наиболее распространены карбапенемазы группы OXA-40, в меньшей степени группы OXA-23 [8, 34]. При исследовании штаммов *A. baumannii*, выделенных в гемокультуре, обнаружено носительство OXA-23-подобной карбапенемазы в 45,9% случаев [35]. OXA-58-подобные карбапенемазы на территории Российской Федерации встречаются редко [8].

Наиболее частый механизм резистентности у *K. pneumoniae* – наличие карбапенемазы KPC [36]. По нашим данным геном bla_{KPC} обладали только 8% штаммов

K. pneumoniae, основной детерминантой резистентности среди изолятов *K. pneumoniae* и *S. marcescens* стало наличие карбапенемазы OXA-48, которая представлена у 63% и 95% штаммов соответственно. У энтеробактерий OXA-48-подобные карбапенемазы широко распространены в мире и на территории Российской Федерации [6, 37]. Среди исследованных нами штаммов *E. coli* преобладало носительство $bla_{\text{NDM-group}}$. Впервые МБЛ группы NDM обнаружили в Индии в 2008 г. [38], и с тех пор распространилась по всему миру [39], штаммы *K. pneumoniae* и *E. coli* являются основными носителями МБЛ группы NDM [40]. В нашей коллекции обнаружены изоляты, сочетающие карбапенемазы групп OXA-48 и NDM. Продуцентов генов МБЛ групп VIM и IMP среди исследованных нами штаммов энтеробактерий не обнаружено.

Показана перспективность применения ПЦР-РВ для детекции генов карбапенемаз грамотрицательных бактерий в рутинной практике бактериологической лаборатории. Применение ПЦР-РВ может быть оправдано в качестве метода быстрой детекции генов карбапенемаз, что позволяет ускорить назначение АМП с учётом механизмов резистентности возбудителя. Правильный выбор терапии является жизненно важным: промедление применения адекватной терапии при инфекционных состояниях снижает выживаемость пациента примерно на 8% [41]. Необходимо использовать любую возможность ускорить идентификацию не только возбудителя инфекции, но и механизмов резистентности к АМП.

Заключение. Результаты, полученные при помощи метода ПЦР-РВ для идентификации генов карбапенемаз грамотрицательных микроорганизмов, имеют важное значение для выбора эффективной антибиотикотерапии. ПЦР-РВ может быть рекомендован для использования в повседневной работе бактериологических лабораторий.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5, 10, 11, 13, 16-18, 20, 22-33, 36, 38-41 см. REFERENCES)

1. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шек Е.А., Дехнич А.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2017; 19(1): 42-8.
2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2017; 19(1): 49-56.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

3. Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Шек Е.А. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(1): 37-41.

4. Медведева Е.Д., Кецо Ю.Л., Исмагуллин Д.Д., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Жестков А.В. Структура микроорганизмов, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(7): 454-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-7-454-457.

6. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Шайдуллина Э.Р., Шек Е.А. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2015-2016. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2): 147-59. DOI:10.36488/cmasc.2019.2.147-159.

7. Эйдельштейн М.В., Шек Е.А., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шайдуллина Э.Р. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2): 160-70. DOI:10.36488/cmasc.2019.2.160-170.

8. Шек Е.А., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шайдуллина Э.Р. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2): 171-80. DOI:10.36488/cmasc.2019.2.171-180.

9. Прямучук С.Д., Фурсова Н.К., Абаев И.В., Ковалев Ю.Н., Шишкова Н.А., Печерских Э.И. и др. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*, выделенных в России в 2003-2007 гг. *Антибиотики и химиотерапия*. 2010; 55(9-10): 3-10.

12. Зверев В.В., Бойченко М.Н. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.

14. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Медицинский журнал*. 2012; (2): 10-5.

15. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Солнцев Л.А., Гординская Н.А. Молекулярное типирование клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(11): 699-704. DOI:10.18821/0869-2084-2017-62-11-699-704.

19. Лазарева А.В., Катосова Л.К., Крыжановская О.А., Пономаренко О.А., Карасева О.В., Горелик А.Л. и др. Мониторинг и профиль антибиотикорезистентности микробиоты трахеального аспирата у детей с тяжелой черепно-мозговой травмой в отделении реанимации и интенсивной терапии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2014; 59(7-8): 8-15.

21. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (3): 96-106.

34. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А. Спектр антибиотикорезистентности и распространенность ОХА-карбапенемаз среди штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных у пациентов хирургических и реанимационных отделений в Москве. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; (1): 40-5. DOI:10.36233/0372-9311-2016-1-40-45.

35. Хрульнова С.А., Федорова А.В., Фролова И.Н., Клясова Г.А. Молекулярно-генетическое типирование *Acinetobacter baumannii*, выделенных из гемокультуры больных опухолями системы крови, методом ПЦР случайных полиморфных фрагментов ДНК.

Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2020; 19(4): 38-47. DOI:10.31631/2073-3046-2020-19-4-38-47.

37. Шамина О.В., Самойлова Е.А., Новикова И.Е., Лазарева А.В. *Klebsiella pneumoniae*: микробиологическая характеристика, антибиотикорезистентность и вирулентность. *Российский педиатрический журнал*. 2020; 23(3): 191-7. DOI:10.18821/1560-9561-2020-23-3-191-197.

REFERENCES

1. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shek E.A., Dekhlich A.V. et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Acinetobacter spp.* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013-2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(1): 42-8. (in Russian)

2. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Dekhlich A.V. et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013-2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(1): 49-56. (in Russian)

3. Edelstein M.V., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Shek E.A. et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013-2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(1): 37-41. (in Russian)

4. Medvedeva E.D., Kezko J.L., Ismatullin D.D., Lyamin A.V., Kondratenko O.V., Zhestkov A.V. Structure of microorganisms isolated from bronchoalveolar lavage from patients in the department of reanimation and intensive therapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(7): 454-7. DOI:10.18821/0869-2084-2020-65-7-454-457. (in Russian)

5. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2014; 44(2): 152-5. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2014.05.004.

6. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Ivanchik N.V., Skleenova E.Yu., Shajdullina E.R., Shek E.A. et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON 2015–2016». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2): 147-59. DOI:10.36488/cmasc.2019.2.147-159. (in Russian)

7. Shek E.A., Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shajdullina E.R. et al. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON 2015-2016». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2): 160-70. DOI:10.36488/cmasc.2019.2.160-170. (in Russian)

8. Shek E.A., Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shajdullina E.R. et al. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Acinetobacter spp.* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON 2015-2016». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2): 171-80. DOI:10.36488/cmasc.2019.2.171-180. (in Russian)

9. Pryamchuk S.D., Fursova N.K., Abaev I.V., Kovalev Yu.N., Shishkova N.A., Pecherskikh E.I. et al. Genetic determinants of antibacterial resistance among nosocomial *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, and *Enterobacter spp.* isolates collected in Russia within 2003-2007. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2010; 55(9-10): 3-10. (in Russian)

10. Edelstein M., Pimkin I., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3724-32. DOI:10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003.

11. Pfeifer Y., Cullik A., Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens.

- Int. J. Med. Microbiol.* 2010; 300(6): 371-9. DOI:10.1016/j.ijmm.2010.04.005.
12. Zverev V.V., Boychenko M.N. Medical microbiology, virology and immunology. [Meditinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
 13. Potron A., Poirel L., Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015; 45(6): 568-85. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001.
 14. Tapal'skiy D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative bacteria: spread and detection methods. *Meditinskiy zhurnal.* 2012. (2): 10-5. (in Russian)
 15. Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Solntsev L.A., Gordinskaya N.A. The molecular typing of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* producing beta-lactamases of extended specter of action. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2017; 62(11): 699-704. DOI:10.18821/0869-2084-2017-62-11-699-704. (in Russian)
 16. Hsu A.J., Tamma P.D. Treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections in children. *Clinical Infectious Diseases.* 2014; 58(10): 1439-48. DOI:10.1093/cid/ciu069.
 17. Kehl S.C., Dowzicky M.J. Global assessment of antimicrobial susceptibility among Gram-negative organisms collected from pediatric patients between 2004 and 2012: results from the tigecycline evaluation and surveillance trial. *The Journal of Clinical Microbiology.* 2015; 53(4): 1286-93. DOI:10.1128/jcm.03184-14.
 18. Lukac P.J., Bonomo R.A., Logan L.K. Extended-spectrum-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in children: old foe, emerging threat. *Clinical Infectious Diseases.* 2015; 60 (9): 1389-97. DOI:10.1093/cid/civ020.
 19. Lazareva A.V., Katosova L.K., Kryzhanovskaya O.A., Ponomarenko O.A., Karaseva O.V., Gorelik A.L. et al. Monitoring and antibiotic resistance profile of tracheal aspirate microbiota in ICU children with severe craniocerebral trauma. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2014; 59(7-8): 8-15. (in Russian)
 20. Hrabák J., Chudáčková E., Papagiannitsis C.C. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(9): 839-53. DOI:10.1111/1469-0691.12678.
 21. Lopukhov L.V., Edelstein M.V. Polymerase chain reaction in diagnostic clinical microbiology. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2000; 2 (3): 96-106. (in Russian)
 22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Ver. 9.0., 2019. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. Accessed August 01, 2019.
 23. Higgins P.G., Dammhayn C., Hackel M., Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(2): 233-8. DOI:10.1093/jac/dkp428.
 24. Donald H.M., Scaife W., Amyes S.G.B., Young H-K. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44(1): 196-9. DOI:10.1128/aac.44.1.196-199.2000.
 25. Dalla-Costa L.M., Coelho J.M., Souza H.A.P.H.M., Castro M.E.S., Stier C.J.N., Bragagnolo K.L. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(7): 3403-6. DOI:10.1128/jcm.41.7.3403-3406.2003.
 26. Turton J. F., Kaufmann M. E., Glover J., Coelho J. M., Warner M., Pike R. et al. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(7): 3074-82. DOI:10.1128/jcm.43.7.3074-3082.2005.
 27. Jeon B.-C., Jeong S.H., Bae I.K., Kwon S.B., Lee K., Young D. et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(5): 2241-5. DOI:10.1128/jcm.43.5.2241-2245.2005.
 28. Valenzuela J.K., Thomas L., Partridge S.R., van der Reijden T., Dijkshoorn L., Iredell J. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(2): 453-60. DOI:10.1128/jcm.01971-06.
 29. Boo T.W., Walsh F., Crowley B. First report of OXA-23 carbapenemase in clinical isolates of *Acinetobacter* species in the Irish Republic. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58(5): 1101-2. DOI:10.1093/jac/dk1345.
 30. Bou G., Santillana E., Sheri A., Beceiro A., Sampson J. M., Kalp M. et al. Design, synthesis, and crystal structures of 6-alkylidene-2'-substituted penicillanic acid sulfones as potent inhibitors of *Acinetobacter baumannii* OXA-24 carbapenemase. *J. Am. Chem. Soc.* 2010; 132(38): 13320-31. DOI:10.1021/ja104092z.
 31. Kuo S.-C., Huang W.-C., Huang T.-W., Wang H.-Y., Lai J.-F., Lauderdale T.-L., Chen T.-L. Molecular epidemiology of emerging *bla*_{OXA-23-Like} - and *bla*_{OXA-24-Like} -carrying *Acinetobacter baumannii* in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(3): e01215-17. DOI:10.1128/aac.01215-17.
 32. Quinteira S., Grosso F., Ramos H., Peixe L. Molecular epidemiology of imipenem-resistant *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter baumannii* isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese Hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(9): 3465-6. DOI:10.1128/aac.00267-07.
 33. Lolans K., Rice T.W., Munoz-Price L.S., Quinn J.P. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(9): 2941-5. DOI:10.1128/aac.00116-06.
 34. Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Mayanskiy N.A. Spectrum of antibiotic resistance and prevalence of OXA-carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* strains, isolated from patients of surgical and reanimation departments in Moscow. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2016; (1): 40-5. DOI:10.36233/0372-9311-2016-1-40-45. (in Russian)
 35. Khrul'nova S.A., Fedorova A.V., Frolova I.N., Klyasova G.A. Genotyping by random amplified polymorphic DNA assay of *Acinetobacter baumannii* isolated from blood culture of patients with hematological malignancies. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika.* 2020; 19(4): 38-47. DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-4-38-47. (in Russian)
 36. Falagas M.E., Lourida P., Poulidakos P., Rafailidis P.I., Tansarli G.S. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(2): 654-63. DOI:10.1128/aac.01222-13.
 37. Shamina O.V., Samoylova E.A., Novikova I.E., Lazareva A.V. *Klebsiella pneumoniae*: microbiological characterization, antimicrobial resistance, and virulence. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal.* 2020; 23(3): 191-7. DOI:10.18821/1560-9561-2020-23-3-191-197. (in Russian)
 38. Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*_{NDM-17} and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(12): 5046-54. DOI:10.1128/AAC.00774-09.
 39. Khan A.U., Maryam L., Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017; 17(1). DOI:10.1186/s12866-017-1012-8.
 40. Wu W., Feng Y., Tang G., Qiao F., McNally A., Zong Z. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin. Microbiol. Rev.* 2019; 32(2): e00115-18. DOI:10.1128/CMR.00115-18.
 41. La Scola B. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry-based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2011; 11(3): 287-98. DOI:10.1586/erm.11.12.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А., Махова М.А., Колесникова Е.А.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТОМА И ВИРУЛОМА КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора,
603950, Нижний Новгород, Россия

Представлена характеристика структуры резистома и вирулома четырёх клинических карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Два штамма принадлежали к сиквенс-типу ST395, один штамм – ST2262, один штамм – к новому сиквенс-типу 5816. У всех штаммов *Klebsiella pneumoniae* в структуре хромосомы определены гены фимбрий, энтеробактина, β-лактамаз типа SHV, устойчивости к фосфомицину *fosA* и транспорта фторхинолонов *oqxAB*. Вирулом штаммов ST395 – NNKP315 и NNKP343 обогащён детерминантами *yersineobactin* и *aerobactin*, гены последнего расположены в структуре плазмид *IncHIIB* (*IncHIIB/FIB*), высокоомологичных плазмидам вирулентности *pLVPK* и *pK2044*. В составе плазмидной ДНК этих штаммов, несущей репликоны *IncR*, *IncL*, *IncQ*, выявлен набор генов резистентности: *bla_{OXA-48}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{TEM-1}*, *aac(6)-Ib-cr*, *qnrS1*, *catA1*, *catB3*, *tet(A)*, *sul1*, *dfrA1* и др. В результате анализа *in silico* сделано предположение о локализации гена *bla_{OXA-48}* у штамма NNKP315 в структуре плазмиды *IncHIIB*, которая содержит также гены аминогликозидаз в составе интегрона первого класса *In822*. В генах пориновых белков *OmpK35*, *OmpK36*, *OmpK37* обнаружены мутации, вносящие дополнительный вклад в проявление устойчивости к карбапенемам. В вирулом штамма NNKP16 (ST2262) входят хромосомные гены системы утилизации железа *kfuABC*, в вирулом штамма NNKP15 (ST5816) – гены капсульного полисахарида *kvgAS* и микроцина E492. В структуре резистома *K. pneumoniae* NNKP16 не выявлено дополнительных детерминант устойчивости, у штамма NNKP15 обнаружен только ген *bla_{CTX-M-15}*. Отсутствие приобретённых генов резистентности, по-видимому, обусловлено наличием системы CRISPR-Cas типа I-E. Множественная лекарственная устойчивость исследуемых штаммов связана с мутациями, выявленными в структуре маркерных генов, в частности, пориновых белков *OmpK36* и *OmpK37*, активностью эффлюксных систем. У обоих штаммов выявлено наличие стоп-кодона в последовательности регуляторного гена *ramR*, что потенциально может обеспечивать гиперэкспрессию эффлюкс-белков *AcrAB*.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; полногеномное секвенирование; факторы резистентности и патогенности; CTX-M-15; OXA-48; плазмиды; CRISPR-Cas.

Для цитирования: Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А., Махова М.А., Колесникова Е.А. Молекулярно-генетическая характеристика резистома и вирулома карбапенем-устойчивых клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (3): 186-192. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-186-192>

Для корреспонденции: Алексеева Анна Евгеньевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. метагеномики и мол. индикации патогенов; e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Института Пастера (Париж) за курирование и поддержку базы данных BIGSdb-Pasteur (<http://bigsdb.pasteur.fr/>).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.10.2021

Принята к печати 28.10.2021

Опубликовано 25.03.2022

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A., Makhova M.A., Kolesnikova E.A.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF RESISTOME AND VIRULOME OF CARBAPENEM-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL STRAINS

Nizhny Novgorod scientific and research institute of epidemiology and microbiology name acad. I.N. Blokhina of the Rosпотребнадзор, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

The characteristics of resistome and virulome structure of four carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains are present in the work. Two strains belonged to the sequence-type ST395, one strain – ST2262, one strain – to the new sequence-type 5816. The genes of fimbriae, enterobactin, beta-lactamase SHV type, resistance to fosfomycin *fosA* and transport of fluoroquinolones *oqxAB* in all *Klebsiella pneumoniae* strains chromosome structure were identified. The determinants of *yersineobactin* and *aerobactin* are enriched the virulome of ST395 NNKP315 and NNKP343 strains. The *aerobactin* genes are located on *IncHIIB* plasmids (*IncHIIB/FIB*) which highly homologous to the virulence *pLVPK* and *pK2044* plasmids. *IncR*, *IncL*, *IncQ* plasmids carrying *bla_{OXA-48}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{TEM-1}*, *aac(6)-Ib-cr*, *qnrS1*, *tetA*, *sul1*, *dfrA1*, *aac(6)-Ib-cr*, *catA1*, *catB3* etc. were identified in these strains. As a result of *in silico* analysis, an assumption about the localization of the *bla_{OXA-48}* in the structure of the *IncHIIB* plasmid of NNKP315 strain was made. This plasmid also contains the aminoglycosidases genes inserted into a class I integron *In822*. The mutations were found in the porin proteins *OmpK35*, *OmpK36* and *OmpK37* genes, which increases the carbapenem resistance. The virulome of NNKP16 (ST2262) strain additionally includes of the iron utilization system *kfuABC* chromosomal genes, and the virulome of NNKP15 (ST5816) strain contains of the capsular polysaccharide *kvgAS* and microcin E492 genes. Additional determinants of resistance were not identified in the resistome structure of *K. pneumoniae* NNKP16 and only the *bla_{CTX-M-15}* gene was found in the NNKP15 strain. The absence of acquired resistance genes seems to be due to the presence of the type I-E CRISPR-Cas system. Multiple drug resistance of the studied strains is associated with mutations identified in the gene structure of porin proteins *OmpK36* and *OmpK37*, as well as the activity of efflux systems. It was showed the stop codon formation in the nucleotide sequence of the regulatory gene *ramR* to both strains, which can potentially provide overexpression of *AcrAB* efflux proteins.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; whole genome sequencing; resistome; virulome; CTX-M-15; OXA-48; plasmids; CRISPR-Cas.

For citation: Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A., Makhova M.A., Kolesnikova E.A. Molecular genetic characteristics of resistome and virulome of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67(3): 186-192 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-186-192

For correspondence: Alekseeva A.E., Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens; e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Information about authors:

Alekseeva A.E., <https://orcid.org/0000-0001-6482-0268>;
Brusnigina N.F., <https://orcid.org/0000-0003-4582-5623>;
Gordinskaya N.A., <https://orcid.org/0000-0002-4146-0332>;
Makhova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-9443-0030>;
Kolesnikova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-0859-4339>.

Acknowledgments. The authors thank the Institut Pasteur teams for the curation and maintenance of BIGSdb-Pasteur databases at <http://bigsdbs.pasteur.fr/>

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 04.10.2021
Accepted 28.10.2021
Published 25.03.2022

Введение. *Klebsiella pneumoniae* относится к группе условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), широко распространена, встречается в различных объектах окружающей среды, входит в состав микробиома человека и животных [1]. За последние два десятилетия интерес к изучению свойств полирезистентных штаммов *K. pneumoniae* возрос в связи с увеличением их доли как этиологического агента в структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [2, 3]. *K. pneumoniae* включены в группу ESKAPEE, объединяющую наиболее проблемных для мирового здравоохранения возбудителей (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*, *Escherichia coli*) [3, 4]. Реализация патогенного потенциала данных видов бактерий в условиях лечебного учреждения связана, в первую очередь, с их способностью быстро эволюционировать и адаптироваться к воздействию антимикробных препаратов (АМП) и дезинфицирующих средств, главным образом, за счёт приобретения дополнительных генов, локализованных на мобильных элементах [3, 4]. Некоторые исследователи рассматривают штаммы *K. pneumoniae* как ключевое звено в распространении генов антибиотикорезистентности среди других клинически значимых видов грамотрицательных бактерий [3].

Использование современных высокопроизводительных технологий глубокого секвенирования позволяет расшифровать молекулярно-генетические механизмы резистентности, лежащие в основе формирования устойчивых клонов, и разработать подходы, направленные на сдерживание темпов распространения полирезистентных клинических штаммов УПМ, включая *Klebsiella pneumoniae*.

Цель работы – молекулярно-генетическая характеристика факторов патогенности и антибиотикорезистентности клинических штаммов *K. pneumoniae*, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), включая карбапенемы.

Материал и методы. В исследование включены четыре карбапенем-устойчивые штаммы *K. pneumoniae*, выделенные от больных, находящихся на стационарном лечении. Штаммы NNKP315, NNKP343 выделены от взрослых больных с ожоговой болезнью, другие

два штамма – от пациентов детского возраста – изолят NNKP15 из мочи ребёнка с циститом; изолят NNKP16 – из фекалий ребёнка с подозрением на внутриутробную инфекцию. Колумбийский агар, содержащий 5% бараньей крови (Sredoff, СПб), использован для культивирования чистых культур бактерий. Исследование на чувствительность штаммов к различным классам АМП осуществляли на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США). С помощью SENSILA-test (Erba Mannheim, United Kingdom) проводили оценку антибиотикорезистентности на основании критериев EUCAST 2021, результаты представлены в табл. 1.

На секвенаторе MiSeq (Illumina, США) проведено полногеномное секвенирование исследуемых штаммов *K. pneumoniae* с использованием набора MiSeq reagent kit v3 (150 циклов) (Illumina, США). С помощью набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ЦНИИЭ, Россия) выделена ДНК из чистых культур бактерий. Подготовка библиотеки ДНК для секвенирования осуществлена с помощью набора NebNext Ultra II FS DNA Library Preparation kit. Сборка полученных чтений *de novo* проведена с использованием web-сервиса Assembly: алгоритмы SPAdes и plasmid SPAdes, расположенные на сервере PATRIC (<https://patricbrc.org/app/Assembly2>). Собранные последовательности аннотированы с помощью сервиса PGAP (NCBI) [5] и сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/>).

Для типирования штаммов, определения детерминант антибиотикорезистентности и патогенности, использованы базы данных *Klebsiella* PasteurMLST database (<https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>), CARD (<https://card.mcmaster.ca/home>), сервис ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). С помощью алгоритма eBURST определены клональные группы [6]. Для выявления высокомолекулярных последовательностей использован web-сервис BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). С целью типирования по группам несовместимости плазмидной ДНК *in silico* использована программа PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). С помощью web-сервисов Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>), IS-finder (<https://www-is.biotoul.fr/>), CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/>) установлено наличие интегронов, IS-элементов, последовательностей CRISPR Cas.

Результаты. На основании результатов аннотирования контигов, собранных из коротких чтений, получена общая молекулярно-генетическая характеристика исследуемых штаммов *K. pneumoniae* (табл. 2).

При типировании исследуемых штаммов с помощью схемы Multilocus Sequence Typing (MLST) [7] у штамма *NNKP15* выявлен новый аллельный вариант гена *phoE*, который депонирован в базу данных *Klebsiella Pasteur-MLST* под номером 571 и присвоен новый сиквенс-

тип (ST) – 5816. Полученные с помощью программы eBURST результаты определения клональных комплексов, в которые входят сиквенс-типы исследуемых штаммов представлены на рисунке.

Вирусом штаммов *K.pneumoniae NNKP15* и *NNKP16* содержит детерминанты патогенности только хромосомной локализации. У исследуемых штаммов *NNKP315* и *NNKP343*, принадлежащих ST395, обнаружены гены белка-сидерофора аэробактина, которые расположены в структуре последовательности, принадлежащей плазмидной ДНК и несущей репликацию IncHI1B (штамм *NNKP315*) и IncHI1B/FIB (штамм *NNKP343*). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей плазмидной ДНК, выявленных у исследуемых штаммов, и последовательностей плазмид *pLVPK* (AY378100.1) и *pK2044* (AP006726.1), определяющих гипервирулентные свойства штаммов *K.pneumoniae CG43* [8] и *NTUH-K2044* [9], показал их высокое структурное сходство. Отличием является отсутствие у штаммов *NNKP315* и *NNKP343* участков, ответственных за устойчивость к серебру и меди, синтез белка-сидерофора сальмохелина.

Для резистома исследуемых штаммов характерно наличие хромосомных генов β-лактамаз типа SHV, детерминант устойчивости к фторхинолонам *oqxAB* и фосфомицину *fosA*. Штамм *K. pneumoniae NNKP16* не обладает дополнительными детерминантами устойчивости ни в структуре хромосомы, ни в структуре плазмиды.

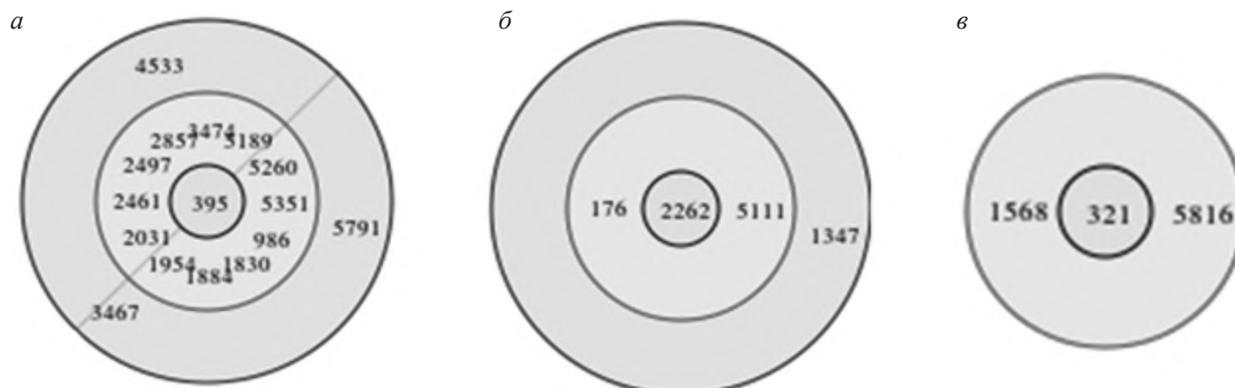
Детерминанта глобально распространенной цефалоспорины CTX-M-15 группы β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) определена у трёх штаммов клебсиелл. Анализ *in silico* показал, что у штаммов *NNKP315* и *NNKP343* ген *bla_{CTX-M-15}* локализован в структуре плазмиды резистентности IncR. Отбор контигов проводился относительно референсной последовательности плазмиды *unnamed1* (CP063020.1) штамма *K.pneumoniae CriePir75*, выделенного в Москве в 2017 г. [10]. В последовательность плазмиды объединены контиги, несущие гены *bla_{OXA-1}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*, *qnrS1*, *tetA*, *sull*, *dfrA1*, *aac(6)-Ib-cr*, *catA1*, *catB3*. При сравнительном анализе с использованием BLASTN установлено, что нуклеотидные последовательности плазмиды IncR штаммов *NNKP315* и *NNKP343* являются высокоомологичными последовательностям IncR плазмид штаммов *K. pneumoniae*, выделенным на территории России: в Москве, Московской области [10], в Нижнем Новгороде

Таблица 1

Антибиотикограмма штаммов *K. pneumoniae*

Препарат	Штамм <i>K.pneumoniae</i>			
	<i>NNKP15</i>	<i>NNKP16</i>	<i>NNKP315</i>	<i>NNKP343</i>
Ампициллин	R	R	R	R
Ампициллин/сульбактам	R	S	R	R
Пиперациллин	R	R	R	R
Пиперациллин/тазобактам	R	S	R	R
Амикацин	R	R	S	R
Гентамицин	R	S	R	R
Тетрациклин	R	R	-	-
Тигециклин	S	S	S	R
Ципрофлоксацин	R	R	R	R
Цефазолин	R	R	R	R
Цефотаксим	R	R	R	R
Цефуросим	R	R	R	R
Цефтазидим	R	R	R	R
Цефтазидим/клавуланат	R	R	R	R
Цефепим	R	R	R	R
Имипенем	R	R	R	R
Меропенем	R	R	S	R
Эртапенем	R	R	R	R
Триметоприм/сульфаметоксазол	S	S	R	R
Азтреонам	R	R	R	R
Фурадонин	R	-	-	-
Полимиксин Е (колистин)	-	-	S	S

Примечание. S – чувствителен, R – устойчив, «-» – для тестирования штамма не использован.



Клональные группы, включающие: а – ST395, б – ST2262, в – ST5816, полученные с помощью алгоритма eBURST.

[11]. У штамма *NNKP15* определить расположение гена *bla_{CTX-M-15}* не удалось, поскольку нуклеотидная последовательность контига, включающего *bla_{CTX-M-15}*, высокомологична как последовательностям, входящим в состав плазмид IncFII, так и плазмид IncN.

У штаммов *K. pneumoniae NNKP315* и *NNKP343* выявлен ген эпидемически-значимой OXA-48 карбапенемазы, расположенный в составе транспозона Tn1999 [12]. У штамма *NNKP343* ген *bla_{OXA-48}* ассоциирован с плазмидной ДНК, несущей репликон IncL. У штамма *NNKP15* репликон IncL отсутствует, однако из набора контигов, принадлежащих плазмидной ДНК данного штамма, отобраны последовательности высокомологичные участку плазмиды *pOXA-48* штамма *K. pneumoniae Kp11978* (JN626286.1) общей длиной

22706 п.н. По-видимому, участок ДНК, содержащий ген *bla_{OXA-48}*, входит в состав плазмиды другой группы несовместимости. Поиск с помощью сервиса BLASTN позволил выявить последовательность плазмиды *unnamed2* (CP062994.1) группы несовместимости H11B, содержащей ген *bla_{OXA-48}*. Плазмиды обнаружены у штамма *K. pneumoniae CriePir200* ST336, выделенного в Москве 2018 году [10]. В результате выравнивания плазмидных контигов штамма *NNKP15* относительно плазмиды *unnamed2* получена последовательность общей длиной 288 тыс. п. н. с уровнем покрытия 99% и идентичностью почти 100%. На основании полученных результатов сделано предположение, что участок, содержащий ген *bla_{OXA-48}* штамма *NNKP15*, входит в состав плазмиды IncH11B. В структуру данной плазмиды, по-видимому,

Таблица 2

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *K. pneumoniae*

Метрические показатели	Штамм <i>K. pneumoniae</i>			
	NNKP315	NNKP343	NNKP15	NNKP16
Размер генома	5690644	5752029	5614635	5406160
Количество тРНК	49	47	58	57
Количество рРНК	4	3	4	4
Количество белок-кодирующих последовательностей	5514	5565	5325	5145
Количество CRISPR-Cas (тип)	1 (тип IV-A)	Только CRISPR без Cas белков	1 (тип I-E)	1 (тип I-E)
Репликоны плазмид	IncH11B(pNDM-MAR), IncR	IncH11B(pNDM-Mar), FIB (pNDM-Mar), IncL, IncR, IncQ1, ColpVC	IncFIB(K), IncFII, IncFII(K), IncN	IncFII(pKP91)-подобный
Сиквенс-тип/К-тип	395/K39	395/K39	5816 (новый)/K3	2262/K64
Детерминанты патогенности	Фимбрии (<i>mrkABCD</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFGHI</i>), ферробактин (<i>fepABCDG, fes</i>), нерсинг-обактин (<i>fyuA, irp1, irp2, ybtAEPOSTUX</i>), аэробактин (<i>iutAiuABC</i>)	Фимбрии (<i>mrkABCD</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFGHI</i>), ферробактин (<i>fepABCDG, fes</i>), нерсинг-обактин (<i>fyuA, irp1, irp2, ybtAEPOSTUX</i>), аэробактин (<i>iutAiuABC</i>)	Фимбрии (<i>mrkABCD-FHIJ</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFGHI, fepABCDG, fes</i>), капсульный полисахарид (<i>kvgAS</i>), микроцин E492 (<i>mceABCDEFGHI</i>)	Фимбрии (<i>mrkABCD-FHIJ</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFGHI, fepABCDG, fes</i>), ABC-система утилизации железа (<i>kfuABC</i>)
Детерминанты антибиотико-резистентности	<i>blaSHV-11, blaOXA-48, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	Бета-лактамазы <i>blaSHV-11, blaOXA-48, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	<i>blaSHV-1, blaCTX-M-15</i>	<i>blaSHV-108</i>
	<i>ant(2'')-Ia, ant(3'')-Ia, aac(6')-Ib-cr</i>	Аминогликозидазы <i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VIa, Δaph(6)-Id</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	oqxAB, qnrS1, aac(6')-Ib-cr	Устойчивость к фторхинолонам oqxAB, qnrS1, aac(6')-Ib-cr	Устойчивость к фторхинолонам oqxAB, qnrS1	Устойчивость к фторхинолонам oqxAB
	<i>fosA</i>	Устойчивость к фосфомицину <i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
	<i>ΔcatB3, catA1</i>	Устойчивость к хлорамфениколу <i>ΔcatB3, catA1</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	<i>tet(A)</i>	Устойчивость к тетрациклам <i>tet(A)</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	<i>dfrA1</i>	Устойчивость к триметоприму <i>dfrA1</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	<i>macAB, mdfA</i>	Устойчивость к макролидам <i>macAB, mdfA</i>	<i>macAB</i>	<i>macAB</i>
	<i>sull</i>	Устойчивость к сульфаниламидам		

входит также участок, включающий интегрон первого класса с кассетными генами амингликозидаз *ant(2'')-Ia* и *ant(3'')-Ia*, который присутствует в нуклеотидной последовательности референсной плазмиды *unnamed 2*.

Резистом штамма *NNKP343* включает детерминанты *aph(3')-VIa* и *Δaph(6)-Id*, располагающиеся в плазмидной нуклеотидной последовательности, несущей репликон IncQ, высокомолекулярной последовательностям целых IncQ плазмид *p3* (CP048948.1) штамма *K. pneumoniae 20467* (ST377) и *unnamed4* (CP062990.1) штамма *K. pneumoniae CriePir26* (ST377) [10], выделенных в Москве в 2018 и 2017 гг. соответственно.

В структуре генома всех исследуемых штаммов клебсиелл присутствуют гены, кодирующие эффлюксные белки, принадлежащие различным семействам, в частности, белки семейства RND – AcrABCDZR, MdtABC, EefABC, OqxAB [13], у штаммов *NNKP315* и *NNKP343* обнаружен ген, кодирующий белок KexD [14]. Гены эффлюксных белков семейства MATE – KdeA, KmrA, MdtK, EmmdR [15]; семейства SMR – KpnEF, SugE [15]; семейства MFS – EmrABD [16] присутствуют в геноме всех исследуемых штаммов. У *K. pneumoniae NNKP15* и *NNKP16* обнаружена мутация в структуре регуляторного гена *ramR*, приводящая к формированию раннего стоп-кодона. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343* выявлены изменения в регуляторном гене *acrR*, сопровождающиеся аминокислотными заменами (P161R, G164A, F172S, R173G, L195V, F197I, K201M).

Структуры CRISPR-Cas определены у трёх исследуемых штаммов *K. pneumoniae*. У штаммов *NNKP15* и *NNKP16* эти последовательности находятся в составе хромосомной ДНК и относятся к типу I-E согласно классификации [17]. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343* CRISPR структуры обнаружены в последовательностях, входящих в состав плазмиды IncHI1B (HI1B/FIB). У штамма *NNKP315* обнаружена структура CRISPR вместе с Cas белками и относится к типу IV-A3 [18]. У штамма *NNKP343* выявлен только участок CRISPR, в генетическом окружении которого белки Cas отсутствуют, однако обнаружен хромосомный ген, кодирующий Cas6/Cse3/CasE типа I-E.

Последовательности генома штаммов *K. pneumoniae* депонированы в базу данных DDBJ/ENA/GenBank под номерами: JAHCSK000000000.1 (*NNKP15*), JAHCSJ000000000.1 (*NNKP16*), JACCIF000000000.1 (*NNKP343*), JACCIG000000000.1 (*NNKP315*).

Обсуждение. Установлено, что исследуемые карбапенем-устойчивые штаммы принадлежат разным сиквенс-типам. Представители сиквенс-типа ST395 являются одними из наиболее эпидемически распространённых как на территории России [10, 19], так и европейских стран [20, 21]. В Европе происходит постепенная смена доминирования глобальной клональной линии CG258 и формирование сложной поликлональной структуры карбапенем-устойчивых штаммов, включающей различные сиквенс-типы (ST101, ST307, ST348, ST395, ST392, ST405 и др.) [20, 21]. Сиквенс-тип 2262, к которому принадлежит штамм *NNKP16*, является редко встречаемым. В базе данных *Klebsiella PasteurMLST database* имеется информация только об одном штамме – *LWC04*, выделенном в 2016 г. в Китае. Упоминается изолят *K. pneumoniae ST2262/K54*, обладающий свойствами гипервирулентных штаммов [22]. Что касается клональной группы, в которую входит новый ST5816, она объединяет редко встречаемые сиквенс-типы, выяв-

ляемые из различных биологических материалов человека, из образцов окружающей среды, согласно данным *Klebsiella PasteurMLST database*.

Общим признаком всех исследуемых штаммов является наличие хромосомных генов *blaSHV*, *oqxAB*, *fosA*. У штаммов присутствуют различные аллельные варианты генов β-лактамаз SHV. Геном штамма *NNKP16* содержит ген *blaSHV-108* – β-лактамазы широкого спектра действия, который впервые выявлен у штаммов клебсиелл в 1999 г. в Португалии [23]. На 1 июня 2021 г. в базу данных GenBank депонировано 44 штамма клебсиелл, несущих данный ген, что свидетельствует о его низком уровне распространенности. Аллельные варианты *blaSHV-1* и *blaSHV-11* не относятся к БЛРС, но являются одними из наиболее распространённых среди *K. pneumoniae* [19].

Структура вирулома штаммов, принадлежащих различным сиквенс-типам, имеет значительные отличия по набору и локализации детерминант патогенности. Штамм *NNKP15* обладает детерминантами *kvgAS* и микроцина E492, которые ранее выявлялись только в структуре генома гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*, ассоциированных с абсцессом печени [24]. В 2019 г. зарегистрированы случаи выявления этих генов у представителей классических *K. pneumoniae* ST405 в Италии [25]. Геном штамма *NNKP16* содержит маркеры ABC-системы утилизации железа *kfuABC*, часто обнаруживаемой у штаммов *K. pneumoniae* с высокоинвазивными свойствами [26]. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343*, являющихся представителями эволюционной линии классических штаммов клебсиелл, обнаружено наличие плазмиды вирулентности IncHI1B (IncHI1B/FIB), данный факт не является исключительным случаем и отмечался ранее [10, 11, 19].

Сравнительный анализ структуры резистома исследуемых штаммов показал, что *K. pneumoniae NNKP315* и *NNKP343* сиквенс-типа 395 обладают значительно большим разнообразием детерминант устойчивости по сравнению со штаммами *NNKP15* и *NNKP16*, что объясняет высокую эпидемическую значимость представителей ST395 в развитии ИСМП. Только у *K. pneumoniae NNKP16* в отличие от других исследуемых штаммов не выявлено дополнительных детерминант устойчивости, что связано с отсутствием плазмид, несущих соответствующие гены. Ген цефалоспорины STX-M-15, который выявлен у трёх штаммов *K. pneumoniae*, является наиболее распространённым среди β-лактамаз группы STX-M. У двух штаммов сиквенс-типа 395 этот ген располагается в структуре последовательностей плазмиды IncR, высокомолекулярной последовательностям соответствующих плазмид штаммов клебсиелл, выделенных на географически близкой территории. У штамма *K. pneumoniae NNKP15* не удалось определить локализацию гена *bla_{CTX-M-15}*, который может быть ассоциирован и с плазмидами IncFII и IncN, репликоны которых обнаружены в структуре плазмидной ДНК. Обе плазмиды обладают широким кругом хозяев, способствуя распространению генов, кодирующих ферменты CTX-M среди других представителей семейства *Enterobacteriaceae* [27, 28].

Ген карбапенемазы OXA-48 выявлен только у представителей сиквенс-типа 395. На территории России случаи обнаружения представителей данного сиквенс-типа среди OXA-48 позитивных штаммов *K. pneumoniae* все чаще находят отражение в научных статьях [10, 11, 19]. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343* имеются разли-

чия в локализации гена *bla*_{OXA-48}. У штамма *NNKP343* ген *bla*_{OXA-48} ассоциирован с плазмидой IncL, что согласуется с результатами исследований [29], свидетельствующими, что плазмиды IncL являются основными носителями гена OXA-48 карбапенемазы. У штамма *NNKP315* согласно результатам *in silico* участок, несущий гены карбапенемазы OXA-48 и интегрона In822 с набором кассетных генов аминогликозидаз входит в структуру плазмиды IncHI1B. Сведения об аналогичных случаях обнаружения гена *bla*_{OXA-48} в структуре плазмид IncHI1B отсутствуют. В литературе описаны примеры комбинации в составе одной плазмиды участков ДНК высокоомологичных последовательностям других плазмид. У штамма *K. pneumoniae* Kp_Goe-39795 обнаружена плазида *pKp_Goe_795-1* (CP018460) длиной 232 тыс. п. н., в структуре которой установлены высокоомологичные участки нуклеотидным последовательностям пяти плазмид [30].

Возникновение мутаций в структуре генов, кодирующих белки пориновых каналов OmpK35, OmpK36, OmpK37, сопровождается изменениями проницаемости, формируя устойчивость к карбапенемам и цефалоспорином штаммов клебсиелл [31, 32]. Такие мутации обнаружены у всех исследуемых штаммов, однако наибольшее значение они имеют для формирования карбапенем-резистентности штаммами *NNKP15* и *NNKP16*, не обладающими карбапенемазной активностью.

Синергетический эффект на развитие полирезистентных свойств штаммов бактерий, включая *K. pneumoniae*, оказывает активность транспортных эффлюкс-систем [15]. В структуре геномов всех исследованных штаммов выявлены гены белков систем эффлюкса, принадлежащих различным семействам. Наиболее важную роль в формировании резистентности играют белки семейства RND, обладающие широкой субстратной специфичностью [13]. Отличительной чертой штаммов *NNKP315* и *NNKP343* является присутствие гена, кодирующего белок KexD и ответственного за транспорт макролидов и тетрациклина [14]. Наличие у этих штаммов аминокислотных замен в структуре регуляторного белка AcrR приводит к сверхпродукции белка AcrA, входящего в состав трёхкомпонентной эффлюксной помпы AcrAB-TolC, и снижению чувствительности к фторхинолонам [33]. У штаммов *NNKP15* и *NNKP16* обнаружена мутация в структуре гена *ramR*, кодирующего белок RamR – негативный регулятор экспрессии белков AcrAB, что может способствовать сверхпродукции этих белков [34] и формированию полирезистентных свойств штаммами *NNKP15* и *NNKP16*.

Последовательности CRISPR-Cas, присутствующие в геноме штаммов *K. pneumoniae*, являются адаптивной иммунной системой бактерий, позволяющей ограничивать приобретение внешних генетических элементов, соблюдая баланс между потребностью в получении полезных характеристик за счёт горизонтального переноса генов и необходимостью защиты от заражения бактериофагом [17, 35]. По-видимому, вследствие наличия CRISPR-Cas структуры штамм *NNKP16* не обладает генами патогенности и резистентности, локализованными на мобильных элементах. У штамма *NNKP315* участок CRISPR-Cas обнаружен в последовательностях, входящих в состав плазмиды IncHI1B, что согласуется с данными о наличии строгой ассоциации структур CRISPR-Cas данного типа с плазмидами группы несовместимости HI1B (HI1B/FIB) [36]. В составе спейсеров

обнаружены последовательности, высокоомологичные участкам плазмидной ДНК, что, по-видимому, обеспечивает преимущество во внутриклеточной межплазмидной конкуренции [37]. У штамма *NNKP343* выявлен только участок CRISPR без белков Cas. У CRISPR-Cas IV типа модуль генов, кодирующих Cas-белки рядом с CRISPR, может отсутствовать [37]. Для функционирования системы IV типа могут быть использованы хромосомные Cas-белки типа I-E. Нами у штамма *NNKP343* обнаружен ген, кодирующий Cas6/Cse3/CasE типа I-E.

Заключение. Результаты исследований свидетельствуют о разнообразии популяционной структуры карбапенем-устойчивых госпитальных штаммов *K. pneumoniae*. Все исследуемые штаммы *K. pneumoniae*, обладая схожим фенотипом устойчивости, имеют существенные отличия по генотиповой принадлежности, набору детерминант резистентности и патогенности. Получены новые данные о продолжающейся эволюции штаммов *K. pneumoniae*, относящихся к эпидемически значимому сиквенс-типу 395. Показано, что карбапенем-устойчивостью могут обладать штаммы *K. pneumoniae*, принадлежащие к редко встречающимся сиквенс-типам и характеризующиеся низким разнообразием маркёров резистентности, что связано с присутствием системы CRISPR-Cas. В формирование полирезистентности данных штаммов оказались вовлечены альтернативные механизмы, ассоциированные с мутационной изменчивостью соответствующих маркёрных генов и активностью эффлюкс-систем.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–10, 12–37 см. REFERENCES)

1. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А. Мобильном клинических карбапенем-устойчивых изолятов *Klebsiella pneumoniae*. *Генетика*. 2020; 56(3): 272-81. DOI: 10.31857/S0016675820030030.

REFERENCES

1. Yang Y., Higgins C.H., Rehman I., Galvao K.N., Brito I.L., Bicalho M.L. et al. Genomic diversity, virulence, and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains from cows and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(6). DOI: 10.1128/AEM.02654-18.
2. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2013; 11(3): 297-30. DOI:10.1586/eri.13.12.
3. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018; 45: 131-9. DOI: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
4. Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(4): e00088-17. DOI: 10.1128/CMR.00088-17.
5. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(14): 6614-24. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
6. Francisco A.P., Bugalho M., Ramirez M., Carriço J.A. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Biol.* 2009; 10: 152. DOI: 10.1186/1471-2105-10-152.
7. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 4178-82. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005.
8. Chen Y.T., Chang H.Y., Lai Y.C., Pan C.C., Tsai S.F., Peng H.L. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*. 2004; 337: 189-98. DOI: 10.1016/j.gene.2004.05.008.
9. Wu K.M., Li L.H., Yan J.J., Tsao N., Liao T.L., Tsai H.C. et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.* 2009; 191(14): 4492-01. DOI: 10.1186/s13756-019-0596-1.
 10. Shelonkov A., Mikhaylova Y., Yanushevich Y., Samoilo A., Petrova L., Fomina V. et al. Molecular typing, characterization of antimicrobial resistance, virulence profiling and analysis of whole-genome sequence of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(5): 1-15. DOI: 10.3390/antibiotics9050261.
 11. Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A. The mobilome of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Genetika*. 2020; 56(3): 280-8. DOI:10.1134/S1022795420030035. (in Russian)
 12. Poirel L., Bonnin R.A., Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56 (1): 559-62. DOI: 10.1128/AAC.05289-11.
 13. Colclough A.L., Alav I., Whittle E.E., Pugh H.L., Darby E.M., Le-good S.W. et al. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2020; 15: 143-57. DOI: 10.2217/fmb-2019-0235.
 14. Ogawa W., Onishi M., Ni R., Tsuchiya T., Kuroda T. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. *Gene*. 2012; 498(2): 177-82. DOI: 10.1016/j.gene.2012.02.008.
 15. Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., van Veen H.W., Pos K.M., Piddock L.J.V. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018; 16(9): 523-39. DOI:10.1038/s41579-018-0048-6.
 16. Kumar S., Mukherjee M.M., Varela M.F. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Int. J. Bacteriol.* 2013; 2013: 204141. DOI:10.1155/2013/204141.
 17. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J. et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020; 18(2): 67-3. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x.
 18. Newire E., Aydin A., Juma S., Enne V.I., Roberts A.P. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System located exclusively on IncHI1B/IncFIB plasmids in *Enterobacteriaceae*. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1937. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01937.
 19. Fursova N.K., Astashkin E.I., Gabrielyan N.I., Novikova T.S., Fedukina G.N., Kubanova et al. Emergence of five genetic lines ST395 NDM-1, ST13 OXA-48, ST3346 OXA-48, ST39 CTX-M-14, and novel ST3551 OXA-48 of multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Microb. Drug Resist.* 2020; 26(8): 924-33. DOI: 10.1089/mdr.2019.0289.
 20. Maida C., Bonura C., Geraci D., Graziano G., Carattoli A., Rizzo A. et al. Outbreak of ST395 KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Palermo, Italy. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2018; 39(4): 496-8. DOI:10.1017/ice.2017.267.
 21. Muggeo A., Guillard T., Klein F., Reffuveille F., François C., Babosan A. et al. Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern France. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018; 13: 98-103. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.10.023.
 22. Li L., Yuan Z., Chen D., Xie X., Zhang B. Clinical and microbiological characteristics of invasive and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infections in a teaching hospital in China. *Infect. Drug Resist.* 2020; 13: 4395-403. DOI: 10.2147/IDR.S282982.
 23. Mendonça N., Ferreira E., Louro D. Antibiotic Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP) Participants, Caniça M. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009; 34(1): 29-37. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.11.014.
 24. Marcoleta A.E., Berríos-Pastén C., Nuñez G., Monasterio O., Lagos R. *Klebsiella pneumoniae* asparagine tDNAs are integration hotspots for different genomic islands encoding Microcin E492 production determinants and other putative virulence factors present in hypervirulent strains. *Front. Microbiol.* 2016; 7(849). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00849.
 25. Fasciana T., Gentile B., Aquilina M., Ciammaruconi A., Mascarella C., Anselmo A. et al. Co-existence of virulence factors and antibiotic resistance in new *Klebsiella pneumoniae* clones emerging in south of Italy. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19: 2019. DOI: 10.1186/s12879-019-4565-3.
 26. Ma L.C., Fang C.Z., Shun C.T., Wang J.T. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(1): 117-28. DOI: 10.1086/430619.
 27. Novais A., Cantón R., Moreira R., Peixe L., Baquero F., Coque T.M. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(2): 796-9. DOI: 10.1128/AAC.01070-06.
 28. Dolejska M., Villa L., Hasman H., Hansen L., Carattoli A. Characterization of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(2): 333-9. DOI: 10.1093/jac/dks387.
 29. Carattoli A., Seiffert S.N., Schwendener S., Perreten V., Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS ONE*. 2015; 10(5): e0123063. DOI: 10.1371/journal.pone.0123063.
 30. Schwanbeck J., Bohne W., Hasdemir U., Groß U., Pfeifer Y., Bunk B. et al. Detection of a new resistance-mediating plasmid chimera in a blaOXA-48-positive *Klebsiella pneumoniae* strain at a German University Hospital. *Microorganisms*. 2021; 9(4): 720. DOI: 10.3390/microorganisms9040720.
 31. Uz Zaman T., Aldrees M., Al Johani S.M., Alrodayyan M., Al-dughashem F.A., Balkhy H.H. Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. *Int. J. Infect. Dis.* 2014; 28: 186-92. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.05.021.
 32. Ruiz E., Ocampo-Sosa A.A., Rezusta A., Revillo M.J., Román E., Torres C. et al. Acquisition of carbapenem resistance in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strains harbouring blaCTX-M-15, qnrS1 and aac(6)-Ib-cr genes. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(5): 672-7. DOI: 10.1099/jmm.0.038083-0.
 33. Schneiders T., Amyes S.G., Levy S.B. Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(9): 2831-7. DOI: 10.1128/AAC.47.9.2831-2837.2003.
 34. Hentschke M., Wolters M., Sobottka I., Rohde H., Aepfelbacher M. ramR mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 2720-3. DOI: 10.1128/AAC.00085-10.
 35. Barrangou R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biol.* 2015; 16: 247. DOI: 10.1186/s13059-015-0816-9.
 36. Newire E., Aydin A., Juma S., Enne V.I., Roberts A.P. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System located exclusively on IncHI1B/IncFIB plasmids in *Enterobacteriaceae*. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1937. Doi: 10.3389/fmicb.2020.01937.
 37. Piñilla-Redondo R., Mayo-Muñoz D., Russel J., Garrett R.A., Randau L., Sørensen S.J. et al. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(4): 2000-12. DOI: 10.1093/nar/gkz1197. 21.