

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.9-022.7-078

Останкова Ю.В.¹, Семенов А. В.^{1,2}, Зуева Е.В.¹, Вашукова М.А.³, Тотолян А.А.^{1,2}

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ПРЯМОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ 16S РРНК И MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург;

²Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

³ГК «Медика», 194017, Санкт-Петербург

*Внутригоспитальные, или внутрибольничные инфекции – одна из наиболее серьезных проблем медицины, особенно при наличии у пациентов фоновой иммуносупрессии различного генеза, обусловленной как самим заболеванием, так и соответствующей терапией. Для выбора адекватной терапии не только необходимо установление наличия инфекции, но также идентификация возбудителя и определение его резистентности. При этом высокая гетерогенность штаммов и множественная резистентность нозокомиальных инфекций к антибиотикам и антимикробным химиопрепаратам, стандартизация антибактериальной профилактики и ряд других причин становятся препятствием не только для определения лекарственной чувствительности бактерии, но и для самой идентификации патогена у пациента. Одним из наиболее сложных в антибактериальной терапии патогенов, вызывающих гнойно-септические заболевания, служат бактерии рода *Stenotrophomonas* spp., единственный клинически значимый вид которых – *Stenotrophomonas maltophilia* – обладает первичной множественной антибиотикорезистентностью. Очевидна значимость ранней идентификации *S. maltophilia*. При использовании MALDI-ToF масс-спектрометрии показано сокращение времени видовой идентификации первичной бактериальной культуры до 1–2 ч, включая пробоподготовку и анализ полученных спектров. При использовании секвенирования 16S рРНК показано сокращение общего времени видовой идентификации патогена из клинического образца (крови) до 10–12 ч, включая пробоподготовку и сравнение с последовательностями, представленными в международной базе данных. Данный метод позволяет исключить из анализа длительный этап получения чистой гемокультуры возбудителя. Использование секвенирования 16S рРНК и MALDI-ToF масс-спектрометрии в качестве альтернативных высокоточных методов сокращает время идентификации бактерий, в том числе позволяя выявить возбудитель непосредственно в крови пациента, таким образом оптимизируя комплексное лечение и сокращая время подбора адекватной терапии, что особенно важно для онкологических больных, поскольку чувствительность культуральных методов может быть снижена вследствие профилактической антибиотикотерапии.*

Ключевые слова: внутрибольничные инфекции; *Stenotrophomonas maltophilia*; MALDI-ToF масс-спектрометрия; секвенирование 16S рРНК.

Для цитирования: Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.В., Вашукова М.А., Тотолян А.А. Идентификация *Stenotrophomonas maltophilia* с использованием методов прямого секвенирования 16S РРНК и MALDI-ToF масс-спектрометрии. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (3): 165-170. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170>
Ostankova Yu. V.¹, Semenov A. V.^{1,2}, Zueva E. V.¹, Vashukova M. A.³, Totolian A. A.^{1,2}

THE IDENTIFICATION OF STENOTPHOMONAS MALTOPHILIA USING THE TECHNIQUES OF DIRECT SEQUENATION 16S P RNA AND MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY

¹The Pasteur research institute of epidemiology and microbiology of the Rospotrebnadzor, 197101 St. Petersburg, Russia

²The I.P. Pavlov first Sankt-Pereburgskii` state medical university of Minzdrav of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

³Medika, 194017 St. Petersburg, Russia

*The in-hospital infections are one of the most serious problems of medicine, especially if patients have a background immunosuppression of various genesis conditioned by both disease itself and corresponding therapy. The detection of presence of infection and identification of agent and detection of its resistance are needed for choosing adequate therapy. At that, high heterogeneity of strains and multiple resistance of nosocomial infections to antibiotics and antimicrobial pharmaceuticals and standardization of antibacterial prevention and number of other causes becomes an obstacle for both determination of medicinal sensitivity of bacterium and for identification of pathogen itself in patient. One of the most complicated in antibacterial therapy pathogens causing pyo-septic diseases, are bacteria *Stenotrophomonas* spp., the only significant species out of them - *Stenotrophomonas maltophilia* has primary multiple antibiotic resistance. The significance of early identification of *S. maltophilia* is obvious. The application of MALDI-ToF mass-spectrometry requires shortage of time of species identification of primary bacterial culture up to 1-2 hours including sampling preparation and analysis of obtained specters. The sequencing of 16S rRNA requires shortage of total time of species identification of pathogen from clinical sample (blood) up to 1-12 hours, including sampling preparation and comparison with successions presented in international data base. The given technique permits to exclude out of analysis prolonged period of obtaining a pure hemoculture of agent. The application of sequencing of 16S rRNA and MALDI-ToF mass-spectrometry as an alternative high-precision techniques shorten time of identification of bacteria, including detection of agent directly in blood of patient. Hence, occurs optimization of complex treatment and shortage of time of selection of adequate therapy that is especially important in case of oncological patients because sensitivity of cultural methods can be diminished due to preventive antibiotics' therapy.*

Key words: in-hospital infections; *Stenotrophomonas maltophilia*; MALDI-ToF mass-spectrometry; sequencing of 16S rRNA.

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, науч. сотр. лаб.молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»; e-mail: shenna1@yandex.ru

For citation: Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.V., Vashukova M.A., Totolian A.A. The identification of *Stenotrophomonas maltophilia* using the techniques of direct sequencing 16S rRNA and MALDI-ToF mass-spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (3): 165-170. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-165-170>

For correspondence: Ostankova Yu.V., research worker of the laboratory of molecular immunology. e-mail: shennal@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.10.2016
Accepted 29.11.2016

Введение. Одна из серьезнейших проблем при госпитализации пациентов с иммуносупрессией различного генеза – осложнения основного заболевания в виде внутрибольничных инфекций, нередко приводящих к летальному исходу. При этом наибольшую опасность для здоровья и жизни пациентов несут штаммы с повышенной устойчивостью к антибактериальным препаратам. Высокую распространенность внутрибольничных инфекций со множественной резистентностью объясняют активным использованием антибиотиков [5].

Для выбора адекватной терапии не только необходимо установить наличие инфекции, но также идентифицировать возбудитель и определить его резистентность. На данный момент этапы лабораторного исследования занимают неоправданно большое количество времени, уменьшая вероятность положительного исхода лечения больного. Несмотря на наличие внутрибольничной инфекции практически в любом стационаре, большинство клиницистов уделяют этому факту недостаточно внимания, рассматривая некоторые внутрибольничные инфекции как условно-патогенные, и не включают выявление и идентификацию патогена в постоянную практику [1, 8]. При возникновении осложнений у пациента для исключения или подтверждения бактериемии проводят бактериологический посев крови (или другого биологического материала) на стерильность (иногда в 2–3 повторах) и только после этого начинают работы по идентификации возбудителя и определению его устойчивости к лекарственным препаратам [7]. Преимущественно в стационарах используют микроскопические, серологические и биохимические методы, требующие достаточного длительного времени, необходимого для идентификации микроорганизма. Так, например, для диагностики генерализованных инфекций используют запатентованный экспресс-метод, подразумевающий ускоренные сроки получения информации о наличии микроорганизмов в крови, т. е. на 3–4-й день от момента отбора клинического материала [3, 4]. Использование аппаратных модификаций классических методов облегчает работу, уменьшает вероятность контаминаций и сокращает время, необходимое для идентификации микроорганизмов. Однако этапы культивирования некоторых микроорганизмов могут занимать не менее 30 ч. Показано, что, например, при идентификации коллекций клинических изолятов грамотрицательных палочек с использованием идентификационных карт анализатора Vitek-2 частота ошибочной диагностики может составлять более 30% [23].

Именно недостатки лабораторной диагностики, по мнению ряда авторов (например Г.Г. Онищенко и др., 2007), – одна из главных причин высокого процента смертности от септических осложнений при гнойно-септических заболеваниях [6].

Одним из наиболее сложных в антибактериальной терапии патогенов, вызывающих гнойно-септические заболевания, служат бактерии рода *Stenotrophomonas spp.*, единственный клинически значимый вид которых – *Stenotrophomonas maltophilia* – обладает первичной множественной антибиотико-резистентностью [9, 20]. При этом *S. maltophilia* поражает преимущественно иммуносупрессированных больных, в том

числе с онкологическими заболеваниями, а сама инфекция характеризуется септическим течением с высокой летальностью [2]. Показана распространенность *S. maltophilia* не только в больничной среде, но и в воде, продуктах питания [22]. Высокая гетерогенность штаммов *S. maltophilia* и множественная резистентность к антимикробным препаратам становятся препятствием не только для определения лекарственной чувствительности бактерии, но и для выявления ее у пациента, особенно в случае онкологических заболеваний [16]. Использование антибиотиков в профилактических целях, в том числе в виде интраоперационной профилактики, у больных раком, с одной стороны, снижает смертность пациентов, с другой – уменьшает чувствительность культуральных диагностических тестов [12, 18]. В большинстве случаев раннее использование антибиотиков оправдано, так как оно позволяет эффективно бороться с внутрибольничными инфекциями до того, как они приводят к развитию нозокомиальных осложнений у пациентов с онкологией. Однако, если патогеном оказывается бактерия с множественной резистентностью как *S. maltophilia*, антибактериальные препараты не только не противостоят инфекции, но и затрудняют ее идентификацию [19].

Таким образом, очевидна значимость ранней идентификации *S. maltophilia* с использованием некультуральных методов.

Цель исследования – идентификация *S. maltophilia* в клиническом материале (кровь) и в первичной культуре с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии и секвенирования 16S рНК.

Материал и методы. Пациент Г., 65 лет, рак гортани с метастазированием, IVB стадия. На фоне проведенной химиотерапии развилась картина сепсиса (уровень прокальцитонина (РСТ) в крови 620 нг/мл). В стационаре выделили микроорганизм из крови пациента, но видовая идентификация стандартными культуральными методами результатов не дала.

В дальнейшей работе с целью идентификации возбудителя сепсиса были использованы следующие клинические образцы: 1) кровь, 5 мл в вакуумной пробирке с K_2 EDTA пациента Г.; 2) первичная бактериальная культура от пациента Г.

Идентификацию проводили двумя методами: секвенированием по Сэнгеру 16S рНК и MALDI-TOF масс-спектрометрией выделенной культуры.

1. Идентификация возбудителя в культуре и крови и на основе 16S рНК секвенирования. Выделение нуклеиновых кислот (НК) проводили двумя методами, принцип действия которых основан на лизисе клеток и денатурации клеточных белков с помощью раствора, содержащего гуанидин тиоцианат, и последующим осаждением нуклеиновых кислот изопропанолом и/или этанолом (хлороформ-солевая экстракция) и с помощью тест-системы «АмплиПрайм Рибо-преп» производства ФБУН ЦНИИЭ. Выход рНК при использовании тест-системы был меньше, однако достаточный для дальнейшей работы с полученной НК. Обратную транскрипцию проводили на неспецифичных праймерах. Для ПЦР использовали перекрывающиеся пары универсальных праймеров, совместно фланкирующих фрагмент размером 1423 пар

оснований (п. о.), сконструированных на основе нуклеотидной последовательности 16S рРНК.

Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли по следующей схеме. Реакционная смесь для ПЦР включала: 15 пмоль/л каждого олигопраймера, 2 ммоль/л каждого нуклеозидтрифосфата 5 мкл, 6,7 ммоль/л $MgCl_2$, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы, DMSO 10% конечного объема, 1 мкг матрицы, воду без нуклеаз до конечного объема 25 мкл. Амплификацию проводили при условиях: после денатурации (95°C, 5 мин) устанавливали 32 цикла амплификации в режиме 94°C, 20 с (денатурация); 52–58°C, 30 с (отжиг праймеров); 72°C, 1 мин (синтез). Финальный синтез длился при 72°C 7 мин.

Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по методике, рекомендованной для Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Germany). Для анализа качества очищения осадок растворяли в 30 мкл ТЕ-буфера и визуализировали в агарозном геле. Очищенный фрагмент концентрации 30–50 фмоль использовали для постановки секвенирующих реакций с прямым и обратным праймером. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере и помещали в генетический анализатор.

Анализировали фрагменты на генетическом анализаторе GenomeLab GeXP (Beckman Coulter Inc., USA). Первичный анализ полученной последовательности проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с последовательностями, представленными в международной базе данных. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW [13]. Для построения филогенетических деревьев использовали метод UPGMA, bootstrap, $n = 500$ [21].

2. Идентификация бактериальной культуры с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной (MALDI-ToF) масс-спектрометрии. Для идентификации бактериальной культуры применяли 2 метода нанесения образца.

Метод прямого нанесения бактериальных клеток на мишень. Для этого колонию клеток наносили тонким слоем на поверхность ячейки 96-местной стальной MALDI мишени и подсушивали на воздухе. Затем поверх клеток наносили 1 мкл матрицы. В качестве матрицы использовали раствор α -циано-4-гидрокси-коричной кислоты в 50% ацетонитриле/2,5% трифторуксусной кислоте.

Метод этанольно-муравьинокислотной экстракции и осаждения разрушенных клеток центрифугированием. Образец экстракта (1 мкл) наносили на поверхность ячейки MALDI мишени. После высыхания на образец наслаивали 1 мкл матрицы.

Масс-спектры были получены в линейном режиме на масс-спектрометре Microflex LRF MALDI-ToF (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия) с помощью программного обеспечения Flex Control (Bruker Daltonics). Каждый спектр получен в диапазоне масса/заряд (m/z) от 2000 до 20 000 и представлял собой сумму ионов, полученных от 140 лазерных вспышек, выполненных в различных регионах одной и той же ячейки. Перед каждым

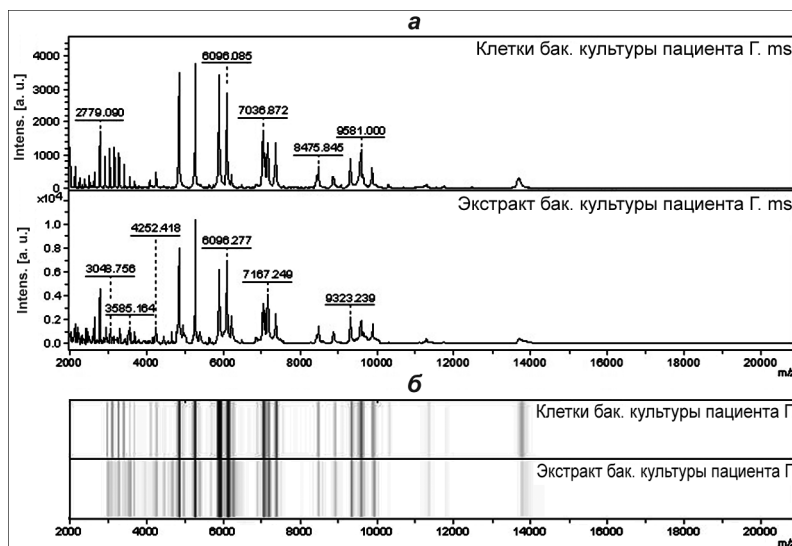


Рис. 1. Спектры образцов клеток и экстракта бактериальной культуры, полученные MALDI-ToF масс-спектрометрией (а); те же масс-спектры в виде псевдогеля (б).

измерением прибор калибровали с помощью бактериального тест-стандарта (БТС) (Bruker Daltonik GmbH, Германия), представляющего собой экстракт *Escherichia coli* DH5alpha. Калибровку считали удовлетворительной в диапазоне масс-спектров белковых пиков ≤ 300 ppm. Идентификацию осуществляли с помощью программы MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonik, Германия), база данных которой содержит

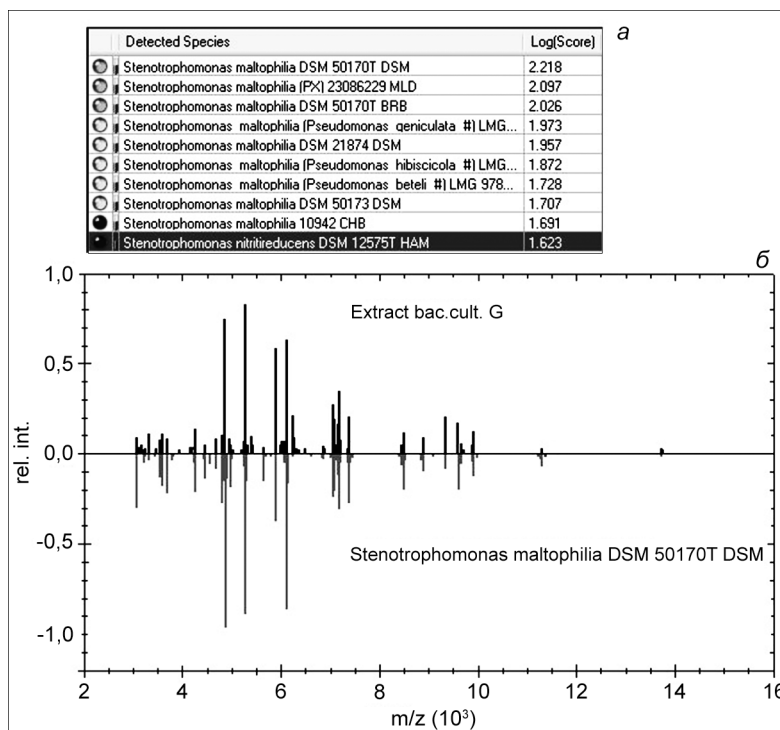


Рис. 2. Количественная оценка совпадения между профилями экстракта бактериальной культуры, выделенной из крови пациента Г. и эталонных штаммов *Stenotrophomonas* spp. из базы данных MALDI Biotyper 3.1 (а); сравнение профиля экстракта бактериальной культуры, выделенной из крови пациента Г. и эталонного профиля *S. maltophilia* DSM 50170T (б).

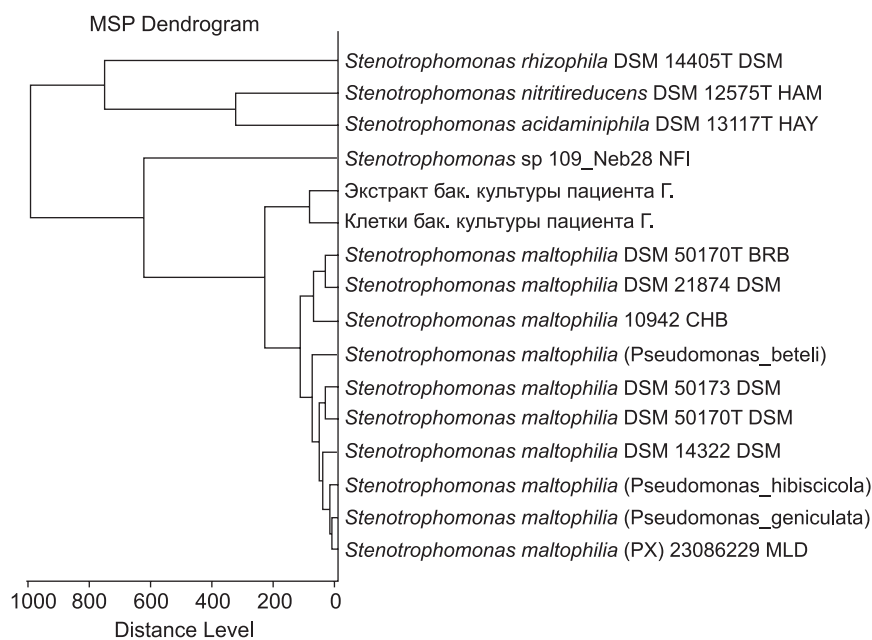


Рис. 3. Дендрограмма на основании профилей масс-спектров клеток и экстракта бактериальной культуры выделенной из крови пациента Г., а также эталонных масс-спектров бактериальных штаммов *Stenotrophomonas* spp. из базы данных MALDI Biotyper 3.1. Расстояние отображено в относительных единицах.

спектры 5627 клеточных организмов. Полученные спектры сравнивали со спектрами, имеющимися в таксономической библиотеке Bruker. Результат сравнения оценивали в баллах (общий десятичный логарифм значений пиков, совпадающих в спектре образца и эталонного спектра). Значения баллов от 3 до 2 соответствовали идентификации до вида, значения от 1,99 до 1,70 означали вероятность идентификации до рода. Более низкие оценки свидетельствовали о ненадежном соответствии спектров с базой данных.

Результаты. Методом MALDI-ToF масс-спектрометрии получены спектры высокого качества как при прямом нанесении клеток на мишень, так и при использовании образца экстракта клеток (рис. 1). Оба образца содержали идентичные основные белковые пики, однако их интенсивность была выше у образца экстракта клеток. В то же время у образца бактериальных клеток в диапазоне $m/z = 2500-3500$ Da наблюдали колоколообразный кластер полисахаридных пиков, служащий исключительной особенностью спектра *S. maltophilia*.

Результаты идентификации бактериальной культуры, выделенной из крови пациента, представлены на рис. 2. Наиболее высокая оценка совпадения исследуемого изолята была со штаммом *S. maltophilia strain DSM 50170T*. Оценка сравнения с эталонными спектрами других штаммов *S. maltophilia* из библиотеки варьировала в широком диапазоне. При этом все 10 наиболее совпадающих профилей представлены штаммами, относящимися к роду *Stenotrophomonas*, что свидетельствует о наличии чистой бактериальной монокультуры. Сравнение меры сходства между исследуемым изолятом и эталонными штаммами *Stenotrophomonas* spp. выполнено с помощью кластерного анализа специфических пиков масс-спектров этих штаммов путем построения дендрограммы. Как видно на рис. 3, исследуемая бактериальная культура вошла в единый кластер профилей штаммов *S. maltophilia*, отличающийся от кластера профилей других видов *Stenotrophomonas*, что

наглядно подтверждает результаты идентификации выделенной культуры.

Методом секвенирования получены последовательности НК. Фрагменты объединяли согласно перекрывающимся участкам. Идентификацию фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с международной базой данных GenBank относительно наиболее идентичных трех нуклеотидных последовательностей с совпадением не менее 99%. Инфекционные агенты в представленных клинических образцах крови и культуры были идентичны друг другу на 100%, что позволило идентифицировать исследуемый образец как *S. maltophilia*. Наиболее идентичным штаммом оказался *S. maltophilia strain S2*.

При сравнении полученного фрагмента с представленными в базе данных последовательностями штаммов *S. maltophilia strain S2* и *strain DSM 50170T* показано их высокое сходство. Отличия составили менее 1% общей протяженности фрагмента. При известной гетерогенности патогена это доказывает идентичность результата анализа методами секвенирования и MALDI-ToF масс-спектрометрии. Типирование на основе 16S последовательности позволяет выявлять различия даже в близкородственных штаммах, идентичность которых составляет 99% (рис. 4, таблица).

Обсуждение. При использовании метода MALDI-ToF масс-спектрометрии показано сокращение времени видовой идентификации бактериальной культуры до 1–2 ч, включая пробоподготовку и анализ полученных спектров, в то время как для традиционных методов идентификации культуры с помощью автоматических микробиологических анализаторов необходимо до 2 сут.

Время, затраченное на видовую идентификацию патогена из клинического образца (крови) методом прямого секвенирования 16S рНК, не превышало 10–12 ч, включая пробоподготовку и сравнение с последовательностями, представленными в международной базе данных. Данный метод позволяет исключить из анализа длительный этап выделения из крови пациента живых возбудителей инфекции, включающий в себя инкубацию в бактериологическом анализаторе для регистрации бактериального роста, высев на твердые питательные среды для получения чистой культуры возбудителя.

Пациенту Г. проводили профилактическую терапию антибиотиками цефалоспоринового ряда, что позволяет предполагать устойчивость выделенного инфекционного агента [14, 15]. В последние годы получает все более широкое распространение активное применение цефалоспоринов последних поколений в профилактической терапии пациентов с онколо-

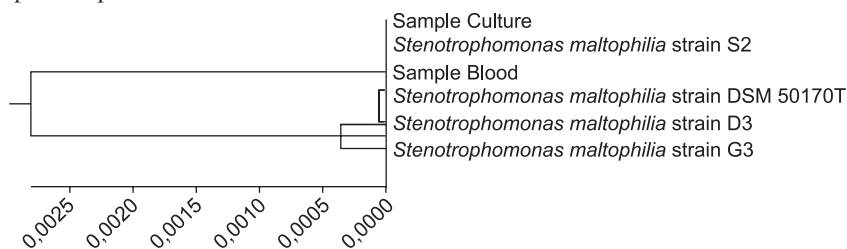


Рис. 4. Степень генетического сходства идентифицируемых фрагментов *S. maltophilia*, полученных из образцов крови и бактериальной культуры с последовательностями, представленными в международной базе данных.

Степень генетического различия штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* strain S2 и *Stenotrophomonas maltophilia* strain DSM 50170T

Штамм	Последовательность
<i>S. maltophilia</i> strain S2	...GC-AGT...GGACG...CTGGG...CT-GC...
<i>S. maltophilia</i> strain DSM 50170T	...GCAAGT...GGGCG...CT-GG...CTTGC...

гическими заболеваниями. Можно предположить, что именно этот факт стал причиной повышения частоты встречаемости *S. maltophilia* как внутрибольничной инфекции, приводящей к тяжелым сепсисам [9, 11]. Исходя из распространенности *S. maltophilia* в природной и техногенной окружающей среде, а также у здоровых людей, мы считаем необходимым внимательно рассмотреть вероятность того, что применение некоторых цефалоспоринов может становиться толчком к активации «спящей» бактерии *S. maltophilia* в качестве септического агента. Мы видим здесь два возможных пути. Возможно, некоторые цефалоспорины III поколения могут инициировать процесс токсинообразования у данной бактерии (как это отмечено в работах с *Clostridium difficile*), для которой, как и для *S. maltophilia*, показаны распространенность во внутрибольничной и внебольничной среде, возможность бессимптомного носительства, а также тяжелые клинические формы, приводящие к летальному исходу [10, 17]. Вторая возможная причина – невольный селективный отбор, осуществляющийся за счет воздействия цефалоспоринов на более простые внутрибольничные инфекции и позволяющий активное развитие устойчивой к данным антибиотикам *S. maltophilia*, которая в норме не выдерживает конкуренции за источники питания с другими патогенами.

При комплексном лечении пациентов с онкологическими или иными заболеваниями, характеризующимися выраженной иммуносупрессией, проводимая периоперационная антибиотикопрофилактика, нередко без оснований перерастающая в так называемую профилактическую антибиотикотерапию, в случае актуальности *S. maltophilia* и других возбудителей может значительно минимизировать возможности рутинных методов бактериологической диагностики и тем самым привести к тяжелым последствиям, вплоть до развития внутригоспитального сепсиса и летального исхода. Показанная возможность применения MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах, а также возможность применения прямого секвенирования для ускорения идентификации микроорганизмов из клинических образцов, без затрат времени на выращивание чистой культуры позволяют успешно бороться с данной проблемой.

Использование современных высокоточных методов сокращает время идентификации бактерий, в том числе позволяя выявлять возбудитель непосредственно из крови пациента без затрат времени на посев, выращивание культуры и дальнейшую идентификацию стандартными бактериологическими методами и вне зависимости от используемой в отношении пациента тактики антибактериальной терапии. Введение предложенных методов в практику в дополнение к уже существующим культуральным позволит своевременно подобрать адекватную терапию для пациентов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 9–23 см. REFERENCES)

1. Акимкин В.Г., Музыченко Ф.В. Профилактика внутрибольничных инфекций в лечебнопрофилактических учреждениях Министерства обороны Российской Федерации. *Военно-медицинский журнал*. 2007; 328 (9): 51–6.

2. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas* spp. и сходных микроорганизмов. *Инфекции и антимикробная терапия*. 2003; 5 (1): 1–16.

3. Каргальцева Н.М. Способ диагностики бактериемии. Патент РФ № 2098486; 1995.

4. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Кафтырева Л.А., Пастушков В.Л., Колосовская Е.Н., Кучеренко Е.В. и др. *Микробиологические методы диагностики инфекции кровотока*. СПб.; 2010.

5. Козлов Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (2): 16–30.

6. Онищенко Г.Г. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 2 октября 2007 г. № 0100/9938-07-32 «О заболеваемости ВБИ в Российской Федерации». М.; 2007.

7. Организация лечебного процесса и особенности лечения внутрибольничных инфекций – Комплексный и индивидуальный подходы к терапии ВБИ. Этиотропная, патогенетическая, симптоматическая и иммунотерапия ВБИ. 17.08.2012. Available at: <http://bolezni.by/vnutribolnichnye-infektsii/158-organizatsiya-lechebnogo-protsessa-i-osobennosti-lecheniya-vnutribolnichnykh-infektsij>.

8. Покровский В.И., Семина Н.А., Ковалева Е.П. Эпидемиология и профилактика внутрибольничных инфекций в Российской Федерации. *Стерилизация и госпитальные инфекции*. 2006; (1): 8–11.

REFERENCES

1. Akimkin V.G., Muzychenko F.V. Prevention of nosocomial infections in health care facilities of the Ministry of Defense of the Russian Federation. *Voennomeditsinskiy zhurnal*. 2007; 328 (9): 51–6. (in Russian)

2. Zubkov M.N. Non-fermenting bacteria: classification, general characteristics, role in human pathology. Identification of *Pseudomonas* spp. and similar microorganisms. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya*. 2003; 5 (1): 1–16. (in Russian)

3. Kargal'tseva N.M. *Method for Diagnosing Bacteremia*. Patent RF N 2098486; 1995. (in Russian)

4. Kargal'tseva N.M., Kocherovets V.I., Kaftyreva L.A., Pastushenkov V.L., Kolosovskaya E.N., Kucherenko E.V. et al. *Microbiological Methods of Diagnosing Bloodstream Infections [Mikrobiologicheskie metody diagnostiki infektsii krovotoka]*. St. Petersburg; 2010. (in Russian)

5. Kozlov R.S. Nosocomial infections: epidemiology, pathogenesis, prevention and control. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2000; 2 (2): 16–30. (in Russian)

6. Onishchenko G.G. Letter of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare on October 2, 2007 № 0100/9938-07-32 “The incidence of nosocomial infections in the Russian Federation.” Moscow; 2007. (in Russian)

7. Organization of the treatment process and especially the treatment of hospital-acquired infections – Comprehensive and individual approaches to the treatment of nosocomial infections. Causal, pathogenetic, symptomatic and immunotherapy. 17.08.2012. Available at: <http://bolezni.by/vnutribolnichnye-infektsii/158-organizatsiya-lechebnogo-protsessa-i-osobennosti-lecheniya-vnutribolnichnykh-infektsij>. (in Russian)

8. Pokrovskiy V.I., Semina N.A., Kovaleva E.P. Epidemiology and prevention of nosocomial infections in the Russian Federation. *Sterilizatsiya i gospital'nye infektsii*. 2006; (1): 8–11. (in Russian)

9. Denton M., Kerr K.G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11 (1): 57–80.

10. Dubberke E.R., Gerding D.N., Classen D. Strategies to prevent *clostridium difficile* infections in acute care hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2008; 29 (Suppl. 1): 81–92.

11. Gales A.C., Jones R.N., Forward K.R., Linares J., Sader H.S., Verhoef J. Emerging importance of multidrug-resistant *Acinetobacter* species and *Stenotrophomonas maltophilia* as pathogens in seriously ill patients: Geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997–1999). *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (Suppl. 2): S104–13.

12. Guembe M., Marin M., Martín-Rabadán P., Echenagusia A., Camúñez F., Rodríguez-Rosales G. et al. Use of universal 16S rRNA gene PCR as a diagnostic tool for venous access port-related bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (3): 799–804.

13. Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. CLUSTAL W: improved soft-

- ware for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* 1992; 8 (2): 189–91.
14. Higgins C.S., Murtough S.M., Williamson E. Resistance to antibiotics and biocides among non-fermenting bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001; 7 (6): 308–15.
 15. Ismaeel N.A. Susceptibilities of 97 strains of *Xanthomonas maltophilia* to antibiotics and the effect of beta-lactamase inhibitors. *Microbios.* 1997; 91 (367): 97–103.
 16. Kataoka D., Fujiwara H., Kawakami T. The indirect pathogenicity of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2003; 22 (6): 601–6.
 17. Kim J., Smathers S.A., Prasad P., Leckerman K.H., Coffin S., Zaoutis T. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001–2006. *Pediatrics.* 2008; 122 (6): 1266–70.
 18. Ley B.E., Linton C.J., Bennett D.M., Jalal H., Foot A.B., Millar M.R. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 17 (4): 247–53.
 19. Maha I.Z., Tawfik R.E., Muhammed I.Z., Seham M.S., Maggie R.M., Wafaa M.B. Value of 16S rRNA Gene Amplification for Early Detection of Bacteremia in Immunocompromised Patients. *The Journal of American Science.* 2014; 10 (1): 165–72.
 20. Schaumann R., Stein K., Eckhardt C., Ackermann G., Rodloff A.C. Infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* – a prospective. *Infection.* 2001; 29 (4): 205–8.
 21. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G. Nei: MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28 (10): 2731–9.
 22. Wilkinson F.H., Kerr K.G. Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)*. 1998; 7 (1): 12–4.
 23. Zbinden A., Böttger E.C., Bosshard P.P., Zbinden R. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of Gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (7): 2270–3.

Поступила 17.10.16
Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 612.112.94.083

Шерстеникова А.К.¹, Кашутин С.Л.¹, Николаев В.И.², Хлопина И.А.¹

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ НА ЛИМФОЦИТАХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗМЕРОВ ИХ ЦИТОПЛАЗМЫ

¹ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», 163000, Архангельск;

²ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», 195067, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Как известно, лимфоциты являются истинными иммунными клетками, специализированными на распознавании антигена (Ag) в организме. Их поведение в крови регулируется несколькими классами белков адгезии, в том числе селектинами, интегринами, иммуноглобулинами. Сведений об уровне экспрессии молекул адгезии на лимфоцитах в зависимости от размеров их цитоплазмы у практически здоровых лиц нет. Цель исследования: определение уровня экспрессии молекул адгезии лимфоцитов в зависимости от размеров их цитоплазмы. В венозной крови на проточном цитометре определяли уровень экспрессии молекул адгезии у 50 человек (22 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 20 до 60 лет, не имеющих хронической патологии в анамнезе. При изучении лимфоцитогаммы дифференцировали лимфоциты по величине клетки с учетом размеров цитоплазмы: малые лимфоциты – до 8 мкм, средние – от 8 до 12 мкм, большие – больше 12 мкм. У мужчин наблюдали тенденцию к снижению концентрации лимфоцитов с экспрессированной молекулой L-селектина. Выявлено отсутствие гендерных различий в уровне лимфоцитов с рецептором LFA-1, а также лимфоцитов с молекулой ICAM-1. У мужчин концентрация лимфоцитов с рецептором LFA-3 была выше, чем у женщин, но только в виде тенденции. Отмечался более низкий уровень экспрессии молекулы PECAM-1 у мужчин. Корреляционный анализ между уровнем экспрессии молекул адгезии и концентрацией лимфоцитов, различающихся по размеру цитоплазмы, показал, что при увеличении размеров цитоплазмы лимфоцитов увеличивается количество статистически достоверных корреляций. Большая часть лимфоцитов (67,97%) экспрессировала молекулу LFA-1. Шеддинг молекул L-селектина среди лимфоцитов протекает значительно активнее, чем у моноцитов. При этом к миграции более предрасположены среднеплазменные лимфоциты и большие гранулярные лимфоциты, идентифицированные как естественные киллеры. Однако лимфоциты вступающие в состояние лимфолиферации, обладают меньшей способностью к адгезии.

Ключевые слова: лимфоциты; молекулы адгезии; размер цитоплазмы лимфоцитов.

Для цитирования: Шерстеникова А.К., Кашутин С.Л., Николаев В.И., Хлопина И.А. Уровень экспрессии молекул адгезии на лимфоцитах в зависимости от размеров их цитоплазмы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (3): 170–172. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-3-170-172>

Sherstennikova A.K.¹, Kashutin S.L.¹, Nikolaev V.I.², Khlopina I.A.¹

THE LEVEL OF EXPRESSION OF MOLECULES OF ADHESION ON LYMPHOCYTES DEPENDING ON AMOUNT OF THEIR CYTOPLASM

¹The Northern state medical university, 163000 Arkhangelsk, Russia

²The I.I. Mechnikov North-Western state medical university, 195067 St. Petersburg, Russia

The lymphocytes are true immunocytes specialized in discerning antigen in organism. Their behavior in blood is regulated by several classes of adhesion proteins, including selectin, integrin, immunoglobulin. In healthy humans there is no data concerning level of expression of adhesion molecules on lymphocytes depending on size of their cytoplasm. The study was carried out