

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.

# Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ И ДИАГНОСТИКА

Том 65

10 • 2020

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

ОКТАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

**Почтовый адрес**

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

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: [clin.lab@yandex.ru](mailto:clin.lab@yandex.ru)

Зав. редакцией *Л.А. Шанкина*

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

Художественный редактор

*Е.М. Архипова*

Сдано в набор 25.09.2020.

Подписано в печать 10.10.2020.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 9,00

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: [oao-meditsina@mail.ru](mailto:oao-meditsina@mail.ru)

WWW страница: [www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, 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](http://www.aks.ru),

[www.pressa-ef.ru](http://www.pressa-ef.ru)

Подписка на электронную версию:

[elibrary.ru](http://elibrary.ru)

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2020. № 10. 593–664.

**РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:**

**Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ**

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

**РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:**

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO  
"MEDITSINA"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 65  
10 • 2020

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

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](mailto: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](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**

**WWW page: [www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)**

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

**Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV**

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*), I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV (*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK (*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*), T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), 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*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

## СОДЕРЖАНИЕ

### БИОХИМИЯ

*Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О., Николаева А. В., Овчинникова Е. А.*  
Хроническая гипонатриемия у пожилых: связь с гериатрическими синдромами (обзор литературы) . . . . . 597

*Копылов В. Ю.*  
Изменение функционального состояния эпителия проксимальных почечных канальцев у пациентов с начальной стадией хронической сердечной недостаточности на фоне терапии симвастатином . . . . . 602

### КОАГУЛОЛОГИЯ

*Петрова О. В., Дымова О. В., Твердохлебова Д. К., Смельцова Е. В., Панова Е. В., Никулина Д. М.*  
Сравнительный анализ влияния систем для взятия крови на результаты исследования показателей системы гемостаза . . . . . 607

### ИММУНОЛОГИЯ

*Андрюков Б. Г., Ляпун И. Н., Бынина М. П., Матосова Е. В.*  
Упрощённые форматы современных биосенсоров: 60 лет использования иммунохроматографических тест-систем в лабораторной диагностике. . . . . 611

### ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

*Козлова В. А., Покровская М. С., Мешков А. Н., Друпкина О. М.*  
Современные подходы к транспортировке биообразцов при низких температурах . . . . . 619

### МИКРОБИОЛОГИЯ

*Наумкина Е. В., Куклина Л. В., Кравченко Е. Н.*  
Микробиологическая диагностика внутриутробных инфекций . . . . . 626

*Давидович Н. В., Галиева А. С., Давыдова Н. Г., Малыгина О. Г., Кукалевская Н. Н., Симонова Г. В., Бажукова Т. А.*  
Спектр и детерминанты резистентности клинических изолятов оральных стрептококков. . . . . 632

*Сужаева Л. В., Егорова С. А.*  
Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *Escherichia coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей . . . . . 638

*Лукова О. А., Заславская М. И., Махрова Т. В., Кропотов В. С., Китаева Е. В.*  
Экспрессия toll-подобных и адгезивных рецепторов на эпителиальных клетках слизистой рта при пародонтите . . . . . 645

*Степанов М. С., Годовалов А. П., Кобзаренко Е. Е., Фадеева М. В., Гирь Э. А.*  
Новый подход к изучению морфологической структуры микробных биоплёнок. . . . . 649

*Немченко У. М., Кунгурцева Е. А., Григорова Е. В., Белькова Н. Л., Маркова Ю. А., Носкова О. А., Чемезова Н. Н., Савилов Е. Д.*  
Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив . . . . . 652

*Шутикова А. Л., Лубова В. А., Леонова Г. Н.*  
Верификация моно- и микст-инфицированности переносчиков клещевых инфекций. . . . . 659

---

## CONTENTS

### BIOCHEMISTRY

- Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Nikolaeva A.V., Ovchinnikova E.A.*  
Chronic hyponatremia in the elderly: association with geriatric syndromes (review of literature) . . . . . 597
- Kopylov V.Yu.*  
Changes in the functional state of the epithelium of the proximal renal tubules in patients with the initial stage of chronic heart failure during simvastatin therapy . . . . . 602

### COAGULOLOGY

- Petrova O.V., Dymova O.V., Tverdokhlebova D.K., Smeltsova E.V., Panova E.V., Nikulina D.M.*  
Comparative analysis of the impact of blood collection systems on the results of the study of indicators hemostasis system . . . . . 607

### IMMUNOLOGY

- Andryukov B.G., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V.*  
Simplified formats of modern biosensors: 60 years of use of immunochromatographic test systems in laboratory diagnostics . . . . . 611

### GENERAL CLINICAL METHODS

- Kozlova V.A., Pokrovskaya M.S., Meshkov A.N., Drapkina O.M.*  
Actual approaches to the transportation of biological samples at low temperatures . . . . . 619

### MICROBIOLOGY

- Naumkina E. V., Kuklina L. V., Kravchenko E. N.*  
Microbiological diagnostics of innerretroic infections . . . . . 626
- Davidovich N.V., Galieva A.S., Davydova N.G., Malygina O.G., Kukalevskaya N.N., Simonova G.V., Bazhukova T.A.*  
Spectrum and resistance determinants of oral streptococci clinical isolates . . . . . 632
- Suzhaeva L. V., Egorova S. A.*  
Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, isolated from children's intestinal microbiota . . . . . 638
- Lukova O.A., Zaslavskaya M.I., Makhrova T.V., Kropotov V.S., Kitaeva E.V.*  
Expression of toll-like and adhesive receptors on epithelial cells of the oral mucosa in periodontitis . . . . . 645
- Stepanov M.S., Godovalov A.P., Kobzarenko E.E., Fadeeva M.V., Gyr E.A.*  
A new approach for the study of the morphological structure of microbial biofilms . . . . . 649
- Nemchenko U.M., Kungurtseva E.A., Grigorova E.V., Belkova N.L., Markova Y.A., Noskova O.A., Chemezova N.N., Savilov E.D.*  
Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active . . . . . 652
- Shutikova A.L., Lubova V.A., Leonova G.N.*  
Verification of mono- and mixed contaminations transmitting agents tick-borne infections . . . . . 659

## БИОХИМИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Булгакова С.В., Тренева Е.В., Захарова Н.О., Николаева А.В., Овчинникова Е.А.

### ХРОНИЧЕСКАЯ ГИПОНАТРИЕМИЯ У ПОЖИЛЫХ: СВЯЗЬ С ГЕРИАТРИЧЕСКИМИ СИНДРОМАМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

*Гипонатриемия чаще встречается у лиц пожилого и старческого возраста. Ряд исследований говорит о том, что даже легкая хроническая гипонатриемия представляет собой серьезную опасность, увеличивая риски развития гериатрических синдромов, таких как падения, низкая костная плотность, переломы, когнитивные нарушения, а также смерти от всех причин. Однако механизм развития подобных осложнений в настоящее время не до конца ясен. Остаются вопросы о необходимости и способах коррекции данного состояния, хотя есть ряд доказательств того, что коррекция гипонатриемии способствует улучшению когнитивных функций, постурального баланса, сводя к минимуму риск падений и переломов. Этим вопросам посвящен данный обзор литературы.*

**Ключевые слова:** гипонатриемия; пожилой возраст; старческий возраст; когнитивные функции; падения; переломы; минеральная плотность костной ткани; остеопороз; обзор.

**Для цитирования:** Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О., Николаева А. В., Овчинникова Е. А. Хроническая гипонатриемия у пожилых: связь с гериатрическими синдромами (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 597-601. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-597-601>

*Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Nikolaeva A.V., Ovchinnikova E.A.*

CHRONIC HYPONATREMIA IN THE ELDERLY: ASSOCIATION WITH GERIATRIC SYNDROMES (REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

*Hyponatremia is more common in the elderly. A number of studies suggest that even mild chronic hyponatremia is a serious danger, increasing the risks of developing geriatric syndromes, falls, low bone density, fractures, cognitive impairment, and death of all causes. Although the mechanism for the development of such complications is currently not completely clear. Questions remain about the need and methods for correcting this condition, although there is some evidence that the correction of hyponatremia improves cognitive functions, postural balance, minimizing the risk of falls and fractures. These issues are addressed in this review of the literature.*

**Key words:** hyponatremia; advanced age; senile age; cognitive functions; falls; fractures; bone mineral density; osteoporosis; review.

**For citation:** Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Nikolaeva A.V., Ovchinnikova E.A. Chronic hyponatremia in the elderly: association with geriatric syndromes (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 597-601 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-597-601>

**For correspondence:** Treneva E.V., Ph.D. (Medicine), associate Professor of the chair of geriatrics and age-related endocrinology; e-mail: [eka1006@yandex.ru](mailto: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>

Nikolaeva A.V. <http://orcid.org/0000-0003-5168-5481>

Ovchinnikova E.A., <http://orcid.org/0000-0001-7500-7168>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 01.06.2020  
Accepted 22.06.2020

**Введение.** Гипонатриемия – самый распространенный вариант дисэлектролитных нарушений, встречающихся в клинической практике. Гипонатриемия определяется при уровне натрия в сыворотке крови менее 135 ммоль/л. По степени тяжести подразделяется на легкую (130–134 ммоль/л),

умеренную (125–129 ммоль/л) и тяжелую (<125 ммоль/л). По течению гипонатриемии разделяют на острую (скорость развития до 48 ч) и хроническую (более 48 ч) [1].

Гипонатриемия чаще встречается у лиц пожилого и старческого возраста, поступивших в стационар,

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



осложняет течение имеющихся хронических заболеваний. Распространенность среди поступивших в плановом порядке составляет около 15%, а по экстренным показаниям – у 50% пациентов [2, 3]. Хроническая гипонатриемия встречается у 10% лиц, проживающих дома и у 20% жителей домов престарелых [4]. По оценкам, до 50% жителей домов престарелых будут страдать от одного или нескольких эпизодов гипонатриемии в течение 12-месячного периода [4]. Более высокая распространенность в пожилом возрасте связана с возрастными изменениями гомеостаза (снижение скорости клубочковой фильтрации, уровня альдостерона, повышение уровня аргинина, вазопрессина, предсердного натрийуретического пептида, низкая чувствительность центра жажды, малый объем употребляемой жидкости и др.), полиморбидностью, большим числом назначаемых медикаментов, среди которых ряд препаратов могут вызывать гипонатриемию (карбамазепин, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, тиазидные диуретики, нейролептики), наличием синдрома неадекватной продукции вазопрессина (СНПВ) [5, 6]. D.S.Sharigo и соавт. [7] выявили СНПВ у 45% пожилых людей с хронической гипонатриемией. Но в связи с малой выборкой (86 человек), результат поставлен под вопрос [6]. Тем не менее, многофакторная природа гипонатриемии у лиц старших возрастных групп сомнения не вызывает [8].

Смертность зависит от тяжести гипонатриемии и может достигать 50% при ее тяжелом течении [9]. Тем не менее, часто наблюдается несоответствие между выраженностью клинических симптомов и степенью гипонатриемии [8]. Отчасти это связано с тем, что скорость возникновения гипонатриемии имеет большее прогностическое значение, чем ее степень тяжести. Две группы исследователей независимо друг от друга показали, что скорость снижения натрия в крови оказала большее влияние на ключевые клинические результаты, такие как длительность пребывания в стационаре, смертность и институционализация, чем ее тяжесть [10, 11]. У пожилых пациентов чаще встречается хроническая гипонатриемия легкой степени 130–134 ммоль/л [12]. Это вариант лишен очевидных неврологических симптомов, наблюдаемых при острой тяжелой гипонатриемии в связи с гомеостатическими компенсаторными механизмами, которые позволяют клеткам мозга адаптироваться к изменениям осмоляльности плазмы в течение более продолжительного времени. В результате легкая хроническая гипонатриемия, как правило, считается бессимптомной, несмотря на то, что она связана с основными гериатрическими синдромами, например, падениями и когнитивными нарушениями, а также патологическими изменениями многих органов. Тем не менее, большое проспективное исследование с участием 98 000 человек показало, что даже легкая гипонатриемия связана с увеличением смертности [13].

#### **Гипонатриемия и когнитивные нарушения.**

Одним из симптомов, часто связанным с гипонатриемией у лиц пожилого и старческого возраста, яв-

ляются когнитивные нарушения. Патогенез острой гипонатриемии хорошо изучен, и считается, что неврологические проблемы связаны с отеком мозга и гипонатриемической энцефалопатией [12]. Однако понимание патогенетических механизмов при более распространенной хронической гипонатриемии оставляет желать лучшего. Ряд исследований обнаружили связь между когнитивными нарушениями и хронической гипонатриемией, даже на уровне от легкой до умеренной [14, 15].

Так, оценка теста MMSE у пациентов с гипонатриемией до и после нормализации уровня электролита показала увеличение балла MMSE после нормализации концентрации натрия в сыворотке крови у 93% пациентов ( $p = 0,001$ ) [16]. R. Gunathilake и соавт. [17] использовали Audio Recorded Cognitive Screening Tool для сравнения показателей когнитивной функции у пациентов с гипонатриемией и контрольной группы. Ученые пришли к выводу, что показатели группы с легкой гипонатриемией были в среднем на 4,67 единиц ниже, чем в контрольной ( $p = 0,01$ , 95% ДИ 1,56–7,79). Интересно, что значительное снижение когнитивных функций произошло, когда уровень натрия снизился всего на 5 ммоль/л [17]. Таким образом, оба исследования, использующие различных методы оценки когнитивных функций, обнаружили, что когнитивные нарушения возникают у пациентов с хронической гипонатриемией, а ее коррекция способствует их улучшению.

M. Gosch M. и соавт. [18] после проведения комплексной гериатрической оценки (стандартизированный инструмент для скрининга функциональных и когнитивных нарушений) пациентам пожилого возраста с гипонатриемией и лицам контрольной группы сопоставимым по полу и возрасту с нормонатриемией показали более низкие результаты когнитивных и функциональных тестов комплексной гериатрической оценки в основной группе.

Однако механизмы, объясняющие связь между гипонатриемией и нарушением когнитивных функций, остаются не до конца ясными. При хронической гипонатриемии, в отличие от острой, уровень натрия в сыворотке крови снижается постепенно, что позволяет организму адаптироваться. Первоначально для предотвращения отека глиальные клетки используют систему  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  для выведения из клеток натрия, затем калия. Если гипонатриемия сохраняется, следующая стадия адаптации головного мозга заключается в потере органических соединений, в основном аминокислот, таких как глутамин, важный нейротрансмиттер, что может объяснить ряд когнитивных дефицитов, неустойчивость походки и падения [1, 19].

Необходимо отметить, что, большая часть когнитивных нарушений у лиц старших возрастных групп может быть вторичной по отношению к состояниям, вызывающим гипонатриемию. Например, известно, что цирроз печени является одной из причин хронической гипонатриемии, и у 62% пациентов с этим состоянием оценка при психометрическом тестировании ниже, чем при нормонатриемии [12]. Необходимы дальнейшие исследования механизмов, с помо-

стью которых хроническая гипонатриемия приводит к когнитивным нарушениям.

Еще одним редким, но потенциально серьезным осложнением гипонатриемии является демиелинизация головного мозга. Церебральная демиелинизация чаще наблюдается у пациентов с хронической гипонатриемией с такими факторами риска, как алкоголизм, заболевания печени, недоедание, гипокалиемия и гипоксия [3].

Хотя мозг, по-видимому, является основной мишенью для гипонатриемии, это состояние может затронуть и другие органы.

**Падения.** Переломы бедра у пожилых обычно связаны с падениями, которые чаще вызваны нарушениями походки и являются распространенной медицинской проблемой в пожилом возрасте. Популяционное исследование показало 35% распространенность нарушений походки среди лиц старше 70 лет [1].

Исследования показали, что легкая хроническая гипонатриемия связана с неустойчивой походкой и падениями. В. Renneboog и соавт. [20] оценивали частоту падений среди 122 пациентов (средний возраст 72 года), поступивших в отделение неотложной помощи с легкой хронической гипонатриемией (средний уровень натрия в сыворотке крови 126 ммоль/л), по сравнению с 244 пациентами контрольной группы с нормонатриемией. Частота падений составила 21,3% в основной группе по сравнению с 5,3% в группе контроля, с откорректированным отношением рисков падений у пациентов с гипонатриемией 67,43 (95% доверительный интервал 7,5–607). Для оценки механизма падений у пациентов с гипонатриемией, авторы выполнили восемь тестов на оценку внимания и походки у 16 взрослых с хронической легкой гипонатриемией (среднее содержание натрия 128 ммоль/л) и вновь протестировали их после коррекции гипонатриемии. У пациентов с гипонатриемией наблюдалась крайне нестабильная походка и нарушение внимания, даже более тяжелые, чем у лиц с умеренным потреблением алкоголя. Коррекция гипонатриемии полностью устранила нарушения внимания и походки. Следовательно, легкая гипонатриемия, сама по себе, может привести к неустойчивой походке, когнитивным нарушениям и падению, вызывая тонкие неврологические изменения [20].

Вышеописанное исследование R. Gunathilake и соавт. [17] обнаружило у пациентов с гипонатриемией не только когнитивный дефицит, но и увеличение риска падения на 32%.

**Гипонатриемия и костная прочность.** Установлено, что гипонатриемия приводит к снижению минеральной плотности костной ткани (МПКТ) и переломам [21]. J.G. Verbalis и соавт. [22] на крысиной модели синдрома неадекватной продукции вазопрессина показали, что у крыс-самцов в возрасте шести недель через три месяца гипонатриемии (средний уровень натрия 110 ± 2 ммоль/л) наблюдалось снижение МПКТ бедренной кости на 30% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольной группой (141 ± 1 ммоль/л). J. Barsony и соавт. [23] для экстраполяции результатов исследования на пожилых людях использовали крыс с моделью СНПВ в возрасте 22 месяцев. Снижение МПК на 16%

( $p < 0,05$ ) отмечено у 15 крыс через 18 нед гипонатриемии (средний уровень натрия 112,7 ± 1,3 ммоль/л) по сравнению с 10 особями группы контроля (142,7 ± 1,1 ммоль/л). Таким образом, оба исследования показали значительное снижение МПКТ бедренной кости в результате хронической гипонатриемии.

Гистоморфометрия костной ткани животных с гипонатриемией выявила снижение плотности трабекулярной и кортикальной костной ткани, увеличение количества остеокластов. У крыс также была снижена сывороточная концентрация остеокальцина -маркера костеобразования. Исследуя клеточную культуру костной ткани с низким содержанием внеклеточного натрия, J. Barsony и соавт. [24] продемонстрировали сходные результаты: стимуляция остеокластогенеза и резорбтивной активности. Кроме того, авторы показали, что хроническое снижение дозы натрия уменьшает уровень внутриклеточного кальция без истощения запасов кальция в эндоплазматической сети, а также снижает клеточное поглощение радиоактивно меченой аскорбиновой кислоты. В свою очередь, снижение аскорбиновой кислоты в культуральной среде имитировало остеокластогенный эффект низкого натрия и окислительный стресс. Это проявлялось в увеличении накопления внутриклеточных свободных радикалов кислорода и пропорциональных изменений в экспрессии и фосфорилировании белка [24]. Эти результаты подтверждаются более ранним исследованием, демонстрирующим, что треть общего натрия в организме находится в костной ткани. Около 40% натрия из костной ткани обменивается с натрием сыворотки крови, подтверждая мнение о том, что хроническая гипонатриемия может привести к снижению концентрации натрия в костной ткани с последующей ее деминерализацией [25].

Важный вопрос, поставленный этими исследователями, заключается в том, как костные клетки ощущают изменения концентрации внеклеточного натрия натрия и/или внеклеточной осмоляльности. Натрий-активированный натриевый канал был описан в мозге и работает как датчик натрия во внеклеточной жидкости. Было показано, что клетки почки крысы имеют этот датчик натрия, который активируется диетой с повышенным содержанием соли, что позволяет предположить его важную роль в мониторинге изменений концентраций натрия в жидкостях [26]. Тем не менее, до сих пор неизвестно, присутствует ли этот датчик натрия в костных клетках. По мнению E.J. Hoop и соавт. [27], натриевые каналы экспрессируются в костной ткани, осуществляя транспорт, т.е. могут быть своеобразным датчиком натрия [27]. Остается доказать, что потоки натрия через эти каналы влияют на микроархитектуру костной ткани и, впоследствии, объяснить ее хрупкость влиянием гипонатриемии [3].

Ряд исследований изучали связь между гипонатриемией и переломами костей. Три исследования «случай-контроль» у пациентов в возрасте 65 лет и старше сравнивали распространенность гипонатриемии в группах с подтвержденными переломами костей (основная) в сравнении с контрольной группой без случаев переломов. Так, Gankam Kengne и соавт. [28] определили распространенность гипонатриемии в ос-

новой группе по сравнению с контрольной в 13,1% и 3,9%, соответственно ( $p < 0,01$ ). В двух других исследованиях было установлено, что распространенность гипонатриемии составляет 9,1% и 16,9% в основных группах по сравнению с 4,1% и 4,6% в контрольных ( $p = 0,007$  и  $p = 0,03$ ) [29, 30]. Таким образом, результаты этих исследований демонстрируют более высокую распространенность гипонатриемии в группах с переломами. Тем не менее, выводы о взаимосвязи между гипонатриемией и остеопорозом сделать невозможно в связи с отсутствием представленных авторами данных о МПКТ.

В трех перекрестных когортных исследованиях у лиц пожилого возраста была оценена связь между гипонатриемией и низкой МПКТ. J.G. Verbalis и соавт. [22] продемонстрировали значительную положительную линейную связь между костной плотностью бедра и уровнем натрия крови у пациентов с гипонатриемией ( $p < 0,01$ ), в то время как у лиц с нормонатриемией этого не наблюдалось ( $p = 0,99$ ). S. Kinsella S. и соавт. [31] сообщили о значительном снижении МПКТ у пациентов с гипонатриемией по сравнению с пациентами с нормонатриемией со средними T- критериями -2,6 и -2,3 соответственно ( $p = 0,03$ ). У пациентов с гипонатриемией распространенность остеопороза также была значительно выше – 57,6% по сравнению с 44,3% в контрольной группе ( $p = 0,04$ ). Кроме того, авторы обнаружили гипонатриемию у 8,7% пациентов с переломами и только у 3,2% без переломов ( $p < 0,001$ ) [31]. Напротив, E. Hoorn [32] не обнаружили корреляции между гипонатриемией и МПКТ шейки бедра и поясничного отдела позвоночника после поправки на возраст и пол ( $p = 0,105$  и  $p = 0,473$ ). S. Kinsella и соавт. [31] для связи между гипонатриемией и переломами костей определили полностью скорректированный с учетом возраста, T-критерия отношение рисков равным 2,25 (95% ДИ: 1,24–4,09), что свидетельствует о том, что гипонатриемия является независимым от МПКТ фактором риска переломов.

По данным Роттердамского исследования, гипонатриемия достоверно связана с увеличением частоты переломов позвонков (OR 1,34; 95% ДИ 1,08-1,68;  $p = 0,09$ ) даже после поправки на возраст, пол и индекс массы тела [32].

Таким образом, связь между хронической гипонатриемией и повышенным риском переломов костей, по-видимому, можно объяснить следующим образом [3]:

Повышенная резорбция костной ткани способствует развитию остеопороза за счет снижения костной плотности и, возможно, нарушения ее микроархитектоники;

Гипонатриемия приводит к когнитивным нарушениям, неустойчивости походки, падениям, что, в свою очередь, увеличивает риск переломов.

После проведенного анализа литературы возникает закономерный вопрос: нужно ли корректировать цифры натрия у пациентов пожилого и старческого возраста при хронической гипонатриемии? Мнения ученых по этому вопросу не однозначны в связи с отсутствием долгосрочных клинических исследований, направленных на изучение эффективности и безопасности раз-

личных схем терапии гипонатриемии и их влияния на гериатрические синдромы. Поэтому решение вопроса о проведении коррекции хронической гипонатриемии необходимо решать строго индивидуально с определением польза--вред и выявления, и коррекции причины к ней приведшей.

**Заключение.** Хроническая гипонатриемия не является доброкачественной, как считалось ранее, а приводит к снижению качества жизни, увеличению рисков развития гериатрических синдромов (падения, низкой костной плотности, переломов, когнитивных нарушений), смерти.

Определение уровня натрия крови необходимо всем пациентам старших возрастных групп с вышеуказанными синдромами. Решение вопроса о проведении коррекции хронической гипонатриемии необходимо решать строго индивидуально после выявления приведшей к ней причины.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Burst V. Etiology and Epidemiology of Hyponatremia. *Front Horm. Res.* 2019; 52: 24-35.
2. Upadhyay A., Jaber B.L., Madias N.E. Incidence and prevalence of hyponatremia. *Am. J. Med.* 2006; 119: 30–5.
3. Ayus J.C., Negri A.L., Kalantar-Zadeh K., Moritz M.L. Is chronic hyponatremia a novel risk factor for hip fracture in the elderly? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2012; 27: 3725–31.
4. Miller M. Hyponatremia and arginine vasopressin dysregulation: mechanisms, clinical consequences, and management. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2006; 54: 345–53.
5. Martin J., Burnier M., Lu H. Approach to the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH). *Rev. Med. Suisse.* 2018; 14(628): 2116-20.
6. Soiza R.L., Hoyle G.E. The syndrome of appropriate antidiuretic hormone: Difficulties with diagnosing SIADH in older people. *Intern. Med. J.* 2010; 39: 132-41.
7. Shapiro D.S., Sonnenblick M., Galperin I., Melkonyan L., Munter G. Severe hyponatraemia in elderly hospitalised patients: prevalence, aetiology and outcome. *Intern. Med. J.* 2010; 40: 574–80.
8. Peri A. Morbidity and Mortality of Hyponatremia. *Front. Horm. Res.* 2019; 52: 36-48.
9. Clayton J.A., Le Jeune I.R., Hall I.P. Severe hyponatraemia in medical in-patients: Aetiology, assessment and outcome. *Q. J. Med.* 2006; 99: 505–11.
10. Chua M., Hoyle G.E., Soiza R.L. Prognostic implications of hyponatraemia in elderly hospitalized patients. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2007; 45: 253–8.
11. Gill G., Huda B., Boyd A., Skagen K., Wile D., Watson I., et al. Characteristics and mortality of severe hyponatraemia – a hospital based study. *Clin. Endocrinol.* 2006; 65: 246–9.
12. Hoorn E.J., Zietse R. Diagnosis and Treatment of Hyponatremia: Compilation of the Guidelines. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017; 28: 1340-9.
13. Walkar S.S., Mount D.B., Curhan G.C. Mortality after hospitalization with mild, moderate and severe hyponatremia. *Am. J. Med.* 2009; 122: 679–86.
14. Fujisawa H., Sugimura Y., Takagi H., Mizoguchi H., Takeuchi H., Izumida H. et al. Chronic hyponatremia causes neurologic and psychologic impairments. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 27(3): 766–80.
15. Rondon-Berrios H., Berl T. Mild Chronic Hyponatremia in the Ambulatory Setting: Significance and Management. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 10(12): 2268–78.
16. Roy L., Soiza I., Kirsten C., Jennifer M., Karen M., Phyo K. Hyponatremia: Special Considerations in Older Patients. *J. Clin. Med.* 2014; 3: 944-58.
17. Gunathilake R., Oldmeadow C., McEvoy M., Kelly B., Inder K., Schofield P. Mild hyponatremia is associated with impaired cogni-



- tion and falls in community-dwelling older persons. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2013; 61: 1838–49.
18. Gosch M., Joosten-Gstrein B., Heppner H.J., Lechleitner M. Hyponatremia in geriatric in-hospital patients: Effects on results of a comprehensive geriatric assessment. *Gerontology*. 2012; 58: 430–40.
  19. Verbalis J.G. Brain volume regulation in response to changes in osmolality. *Neuroscience*. 2010; 168: 862–70.
  20. Renneboog B., Musch W., Vandemergel X. Mild chronic hyponatremia is associated with falls, unsteadiness, and attention deficits. *Am. J. Med.* 2006; 119: 71–88.
  21. Afshinnia F., Sundaram B., Ackermann R.J., Wong K.K. Hyponatremia and osteoporosis: reappraisal of a novel association. *Osteoporos Int.* 2015; 26(9): 2291–8.
  22. Verbalis J.G., Barsony J., Sugimura Y., Tian, Y., Adams D.J., Carter E.A. et al. Hyponatraemia-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 2010; 25: 554–63.
  23. Barsony J., Manigrasso M.B., Xu Q., Tam, H., Verbalis J.G. Chronic hyponatraemia exacerbates multiple manifestations of senescence in male rats. *Age*. 2013; 35: 271–88.
  24. Barsony J., Sugimura Y., Verbalis J.G. Osteoclast response to low extracellular sodium and the mechanism of hyponatremia-induced bone loss. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 10864–75.
  25. Bergstrom W.H. The participation of bone in total body sodium metabolism in the rat. *J. Clin. Invest.* 1955; 34: 97–104.
  26. Lara L.S., Sato R., Bourgeois C.R. The sodium-activated sodium 565 channel is expressed in the rat kidney thick ascending limb and collecting duct cells and is upregulated during high salt intake. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2012; 303: 105–9.
  27. Hoorn E.J., Liamis G., Zietse R., Zillikens M.C. Hyponatremia and bone: an emerging relationship. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011; 8: 33–9.
  28. Gankam Kengne F., Andres C., Satta L., Melot C., Decaux G. Mild hyponatremia and risk of fracture in the ambulatory elderly. *QJM* 2008; 101: 583–8.
  29. Sandhu H.S., Gilles E., DeVita M.V., Panagopoulos G., Michelis M.F. Hyponatremia associated with large-bone fracture in elderly patients. *Int. Urol. Nephrol.* 2009; 41: 733–7.
  30. Tolouian R., Alhamad T., Farazmand M., Mulla Z.D. The correlation of hip fracture and hyponatraemia in the elderly. *J. Nephrol.* 2012; 25: 789–93.
  31. Kinsella S., Moran S., Sullivan M.O., Molloy M.G.M., Eustace J.A. Hyponatraemia independent of osteoporosis is associated with fracture occurrence. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 5: 275–80.
  32. Hoorn E.J., Rivadeneira F., van Meurs J.B.J., Ziere G., Stricker B.H., Hofman A. et al. Mild hyponatraemia as a risk factor for fractures: The Rotterdam study. *J. Bone Miner. Res.* 2011; 26: 1822–8.

Поступила 01.06.20

Принята к печати 22.06.20

© КОПЫЛОВ В.Ю., 2020

Копылов В.Ю.

## ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ПРОКСИМАЛЬНЫХ ПОЧЕЧНЫХ КАНАЛЬЦЕВ У ПАЦИЕНТОВ С НАЧАЛЬНОЙ СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ СИМВАСТАТИНОМ

ФБГОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 460000, Оренбург, Россия

*Проведена оценка изменения функционального состояния эпителия проксимальных почечных канальцев у пациентов с дислипидемией на фоне ожирения, посредством определения концентрации в моче обследуемых уровня цистатина С и степени активности почечных органоспецифических ферментов нейтральной  $\alpha$ -глюкозидазы (НАГ) и L-аланинаминопептидазы (ЛААП) при терапии симвастатином в суточной дозе 20 мг в течение 6 месяцев. В исследовании приняли участие 88 человек, которые были разделены на три группы: контрольная, группа сравнения и основная. Контрольная группа – группа практически здоровых лиц: 30 человек, средний возраст  $20,67 \pm 0,18$  лет, индекс массы тела (ИМТ)  $21,36 \pm 0,4$  кг/м<sup>2</sup>. Группа сравнения (лица с ожирением): 27 человек, средний возраст  $22,38 \pm 0,76$  лет, ИМТ  $31,48 \pm 0,56$  кг/м<sup>2</sup>. Пациенты основной группы были разделены на 2 подгруппы. Первая основная подгруппа лица с хронической сердечной недостаточностью I стадии (ХСН I) без сахарного диабета 2 типа (СД 2) (n=15): средний возраст  $56,8 \pm 1,8$  лет, ИМТ  $30,28 \pm 1,11$  кг/м<sup>2</sup>. Вторая основная подгруппа (ХСН I с СД 2) (n=16): средний возраст  $48,25 \pm 2,45$  лет, ИМТ  $30,37 \pm 1,11$  кг/м<sup>2</sup>. В результате исследования было выяснено, что терапия симвастатином не влияет на скорость клубочковой фильтрации у пациентов с бессимптомной дисфункцией сердца. Обнаружен повышенный уровень цистатина С в моче обследуемых группы сравнения по сравнению с контрольной группой, концентрация цистатина С основных подгрупп статистически достоверно выше показателей контрольной группы. На фоне терапии симвастатином в течение 6 мес, уровень данного анализа статистически достоверно повышается. Активность ЛААП и НАГ на фоне терапии симвастатином в течение срока наблюдения в подгруппе ХСН I без СД2 достоверно снижается. В подгруппе ХСН I + СД2 выявлено снижение концентрации ЛААП и повышение активности НАГ, что может говорить о возникшей дистрофии эпителия цеточной каймы на фоне терапии симвастатином. Терапия симвастатином в течение 6 мес пациентов с начальной стадией сердечной недостаточности в суточной дозировке 20 мг не ухудшает функцию клубочков в виде снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ).*

*Уровень цистатина С выше у лиц с ожирением без сердечной недостаточности и достоверно выше у лиц с бессимптомной сердечной недостаточностью.*

*При терапии дислипидемии симвастатином в дозе 20 мг/сут наблюдается снижение активности НАГ и ЛААП у пациентов с ХСН I без СД2. В результате гиполипидемической терапии симвастатином в суточной дозировке 20 мг у пациентов с ХСН I+СД2 наблюдается рост активности НАГ при одновременном снижении концентрации ЛААП, что может быть обусловлено дистрофией эпителия проксимальных почечных канальцев, на фоне дополнительной нагрузки на него с учетом частично почечного пути метаболизма симвастатина.*

**Ключевые слова:** ожирение; дислипидемия, хроническая сердечная недостаточность сахарный диабет 2 тип; цистатин С; нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза; L-аланинаминопептидаза.

**Для цитирования:** Копылов В.Ю. Изменение функционального состояния эпителия проксимальных почечных канальцев у пациентов с начальной стадией хронической сердечной недостаточности на фоне терапии симвастатином. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10) : 602-606. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-602-606>

*Kopylov V.Yu.*

CHANGES IN THE FUNCTIONAL STATE OF THE EPITHELIUM OF THE PROXIMAL RENAL TUBULES IN PATIENTS WITH THE INITIAL STAGE OF CHRONIC HEART FAILURE DURING SIMVASTATIN THERAPY

Orenburg State Medical University (OrSMU)

*To assess the change in the functional state of the proximal renal tubule epithelium in patients with dyslipidemia on the background of obesity, by determining the concentration in the urine of the examined level of cystatin C and the degree of activity of the renal organ-specific enzymes neutral  $\alpha$ -glucosidase (NAG) and L-alaninaminopeptidase (laap) during simvastatin therapy at a daily dose of 20 mg for 6 months. The study involved 88 people who were divided into three groups: control, comparison and main. The control group is a group of practically healthy individuals: 30 people, average age  $20.67 \pm 0.18$  years, body mass index (BMI)  $21.36 \pm 0.4$  kg/m<sup>2</sup>. Comparison group (obese): 27 people, average age  $22.38 \pm 0.76$  years, BMI  $31.48 \pm 0.56$  kg / m<sup>2</sup>. Patients of the main group were divided into 2 subgroups. The first main subgroup of persons with chronic heart failure stage I (CHF I) without type 2 diabetes mellitus (DM 2) – 15 observed: average age  $56.8 \pm 1.8$  years, BMI  $30.28 \pm 1.11$  kg / m<sup>2</sup>. The second main subgroup (CHF I with DM 2) – 16 observed: average age  $48.25 \pm 2.45$  years, BMI  $30.37 \pm 1.11$  kg/m<sup>2</sup>. The study found that simvastatin therapy does not affect glomerular filtration rate in patients with asymptomatic heart dysfunction. There was an increased level of cystatin C in the urine of the comparison group compared to the control group, the concentration of cystatin C in the main subgroups was statistically significantly higher than the control group. On the background of simvastatin therapy for 6 months, the level of this analyte is statistically significantly increased. The activity of LAAP and NAG during simvastatin therapy during the follow-up period in the CHF I subgroup without DM2 significantly decreased. In the subgroup of CHF I + DM2, a decrease in the concentration of LAAP and an increase in the activity of NAG was revealed, which may indicate that the brush border epithelium dystrophy occurred during simvastatin therapy.*

**Для корреспонденции:** Копылов Владимир Юрьевич, канд. мед. наук, ассистент каф. факультетской терапии и эндокринологии; e-mail: [kopyvoren@mail.ru](mailto:kopyvoren@mail.ru)

*Simvastatin therapy for 6 months in patients with the initial stage of heart failure at a daily dosage of 20 mg does not impair glomerular function in the form of reduced glomerular filtration rate (GFR). Cystatin C levels are higher in obese individuals without heart failure and significantly higher in those with asymptomatic heart failure.*

*When treating dyslipidemia with simvastatin at a dose of 20 mg / day, there is a decrease in the activity of NAG and laap in patients with CHF I without DM2.*

*In the result of lipid-lowering therapy with simvastatin in a daily dosage of 20 mg in patients with CHF I+D2M there is increased activity of NAG while reducing the concentration of the LAAP, which may be due to degeneration of the proximal tubular epithelium, amid additional load on a partially renal route of metabolism of simvastatin.*

**Key words:** obesity; dyslipidemia; chronic heart failure; type 2 diabetes mellitus; cystatin C; neutral  $\alpha$ -glucosidase; L-alaninaminopeptidase.

**For citation:** Kopylov V. Yu. Changes in the functional state of the epithelium of the proximal renal tubules in patients with the initial stage of chronic heart failure during simvastatin therapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 602-606 (in Russ).. DOI: <http://dx.doi.org/10/18821/0869-2084-2020-65-10-602-606>

**Information about author:**

Kopylov V. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-9956-7055>

**For correspondence:** Kopylov V. Yu., candidate of medical sciences, assistant of the Department of faculty therapy and endocrinology; e-mail: [kopvyoren@mail.ru](mailto:kopvyoren@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The study was conducted with the financial support of the Orenburg State Medical University (OrSMU).

Received 13.02.2020  
Accepted 15.06.2020

**Введение.** В настоящее время ожирение стало одной из наиболее важных медико-социальных проблем в мире в связи с его высокой распространенностью и существенными затратами на преодоление его последствий. Распространенность избыточной массы тела и ожирения в Российской Федерации составляют 59,2 % и 24,1 % соответственно [19]. По данным 7 доклада ООН, в 2013 г. Российская Федерация занимала 19-е место среди всех стран мира по распространенности ожирения, отставая от возглавлявших список Мексики и США на 8 %. По данным многоцентрового (11 регионов РФ) наблюдательного исследования ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации) с участием 25 224 человек в возрасте 25–64 лет, распространенность ожирения в популяции составила 29,7 % [2].

За последние три десятилетия распространенность избыточной массы тела и ожирения в мире выросла почти на 30–50 % среди взрослых и детей соответственно.

Сегодня ожирение рассматривается не только как важнейший фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета 2-го типа (по данным Всемирной организации здравоохранения, избыточная масса тела и ожирение определяют развитие до 44–57 % всех случаев сахарного диабета 2-го типа, 17–23 % случаев ишемической болезни сердца, 17 % – артериальной гипертензии, 30 % — желчнокаменной болезни, 14 % – остеоартрита, 11 % – злокачественных новообразований [11,22]), но и нарушения репродуктивной функции и повышенного риска развития онкологических заболеваний [17,18]. В целом ожирение по экспертным оценкам приводит к увеличению риска сердечно-сосудистой смертности в 4 раза и смертности в результате онкологических заболеваний в 2 раза [12,13].

Целый ряд метаболических и гемодинамических нарушений, а также патология многих органов и систем часто ассоциированы с ожирением. К осложнениям и заболеваниям, ассоциированным с ожирением, относятся: нарушение толерантности к глюкозе, нарушенная гликемия натощак или их сочетание, сахарный диабет 2-го

типа, артериальная гипертензия, неалкогольная жировая болезнь печени, дислипидемия.

Эпидемиологические данные о распространенности дислипидемии у больных с ожирением ограничены и могут быть косвенно получены из наблюдательных и кросссекционных исследований (WHO MONICA и HARPPE), согласно которым абдоминальное ожирение имело место у 59 % мужчин и 79 % женщин с дислипидемией [16, 21].

Ожирение рассматривается как одна из значимых причин развития хронической болезни почек (ХБП) [6]. Патологический процесс, развивающийся в почках при ожирении, называется гломерулопатией, обусловленной ожирением (ГО) (obesity-related glomerulopathy) [3,4, 11,23]. Морфологический субстрат этой патологии хорошо изучен в различных географических регионах мира [5,14,20]. Для ГО характерно значимое (>1,34 раза) увеличение объема клубочка, развитие гломерулярного сегментарного склероза, увеличение мезангия, утончение гломерулярной мембраны с последующим снижением числа функционирующих клубочков и развитием интерстициального фиброза и атрофии канальцев [15].

Существуют различные способы определения состояния проксимальных канальцев почек: исследуются спектр свободных аминокислот плазмы крови в моче, а также их клиренс, состояние активного транспорта глюкозы, почечный клиренс фосфатов, реабсорбация воды и электролитов. Для выявления повреждения эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев широко используется энзимодиагностика.

Разработка новых диагностических критериев тубулярного повреждения является сегодня актуальной задачей. Гистоэнзимологические исследования показали, что эпителий канальцев почек очень богат энзимами. При его повреждении выход этих ферментов в мочу резко возрастает. Распределены энзимы по канальцевой системе неравномерно. Наибольшее их содержание характерно для проксимальных канальцев, в эпителии которых содержится N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза,  $\beta$ -глюкуронидаза,  $\beta$ -галактозидаза,

кислая и нейтральная,  $\alpha$ -глюкозидаза, щелочная фосфатаза и другие. Внутри клеток эти ферменты также имеют различную локализацию:  $\beta$ -гексозаминидаза (N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза),  $\beta$ -глюкуронидаза,  $\beta$ -галактозидаза и кислая  $\alpha$ -глюкозидаза располагаются в лизосомах, нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза частично в цитозоле, частично в мембранах щеточной каймы (мембраносвязанная форма). Другие ферменты локализируются в митохондриях (сукцинатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, частично малатдегидрогеназа). Согласно современным взглядам, в случае повреждения почечного канальцевого эпителия первыми в мочу выходят мембраносвязанные ферменты, затем энзимы лизосом и митохондрий.

Большинство энзимов не являются органоспецифичными, то есть кроме почек они содержатся в больших количествах и во многих других органах и тканях, поражение которых может способствовать усиленному выходу их в плазму крови и затем увеличению их экскреции с мочой. Это объясняет особый интерес нефрологов к исследованию ферментов, имеющих исключительно почечное происхождение, экскреция которых с мочой не зависит от состояния других органов и тканей.

Наибольший интерес заслуживает определение активности в моче ферментов, имеющих исключительно почечное происхождение, поскольку их концентрация меняется уже при незначительном, обратимом повреждении почечной ткани. Данными ферментами являются нейтральная  $\alpha$ -глюкозидаза и L-аланинаминопептидаза [1].

В настоящее время наиболее точным эндогенным маркером СКФ признан цистатин С [9]. Он является важным экстрацеллюлярным ингибитором цистеиновых протеиназ, принадлежащих ко второму типу суперсемейства цистатинов [7,8]. Структура гена цистатина С и его промотора определяет высокую стабильность биосинтеза этого ингибитора цистеиновых протеиназ. Постоянство продукции предохраняет организм от неконтролируемой активации протеолиза. В силу этих обстоятельств продукция цистатина С считается мало зависящей от воспаления, опухолевого роста, возраста, пола, мышечной массы и степени гидратации организма. При вовлечении в патологический процесс почек,

фильтрация цистатина С в почках ухудшается, что приводит к повышению его содержания в крови.

Если речь вести о цистатине С в моче, то он свободно экскретируется путем клубочковой фильтрации, а затем подвергается полной канальцевой реабсорбции и катаболизации (без секреции). И поэтому, как ранее предполагалось, цистатин С в значимых количествах в моче обнаруживаться не должен. Оказалось, что в действительности это не так, при нарушении канальцевой функции, концентрации цистатина С в моче могут возрастать в 200 раз, особенно, при остром повреждении почек.

**Материал и методы.** В исследовании приняли участие 88 человек, которые были разделены на три группы: контрольная, сравнения и основная. Контрольная группа – группа практически здоровых лиц ( $n=30$ ), средний возраст  $20,67 \pm 0,18$  лет, ИМТ  $21,36 \pm 0,4$  кг/м<sup>2</sup>. Группа сравнения (лица с ожирением) ( $n=27$ ), средний возраст  $22,38 \pm 0,76$  лет, ИМТ  $31,48 \pm 0,56$  кг/м<sup>2</sup>. Пациенты основной группы были разделены на 2 подгруппы. Первая основная подгруппа (ХСН I без СД 2) – ( $n=15$ ), средний возраст  $56,8 \pm 1,8$  лет, ИМТ  $30,28 \pm 1,11$  кг/м<sup>2</sup>. Вторая основная подгруппа (ХСН I + СД 2) ( $n=16$ ), средний возраст  $48,25 \pm 2,45$  лет, ИМТ  $30,37 \pm 1,11$  кг/м<sup>2</sup>.

В основную группу включались пациенты с уровнем общего холестерина сыворотки крови более 6,0 ммоль/л. Критериями исключения из исследования были снижение скорости клубочковой фильтрации, наличие декомпенсации функции других органов и систем организма, пациенты ранее принимавшие или на момент начала исследования принимающие статины. Всем пациентам основных подгрупп, помимо лечения основной патологии согласно национальным рекомендациям, был назначен симвастатин в суточной дозировке 20 мг в течение 6 месяцев. В ходе наблюдения за пациентами основных подгрупп, помимо основных биохимических показателей крови, оценивались СКФ, цистатин С нативной мочи и уровни НАГ и ЛААП диализованной мочи в начале исследования, через 3 и 6 мес приема симвастатина. Концентрация цистатина С в моче обследуемых вычислялась с учетом коэффициента пересчета. Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistika 10.0, методами непараметрической

Таблица 1

Уровень СКФ в исследуемых группах в мл/мин

Показатели	Группы			
	контрольная ( $n=30$ )	сравнения ( $n=27$ )	ХСН I без СД2 ( $n=15$ )	ХСН I + СД2 ( $n=16$ )
Начало исследования	$111,84 \pm 6,05$	$129,11 \pm 3,87$	$98,58 \pm 6,79$	$102,65 \pm 4,5$
Через 3 мес	-	-	$90,95 \pm 2,58$	$108,44 \pm 7,69$
Через 6 мес	-	-	$91,23 \pm 4,51$	$112,48 \pm 6,68$

Таблица 2

Уровень цистатина С в исследуемых группах в мг/л

Показатели	Группы			
	контрольная ( $n=30$ )	сравнения ( $n=27$ )	ХСН I без СД2 ( $n=15$ )	ХСН I + СД2 ( $n=16$ )
Начало исследования	$0,59 \pm 0,07$	$0,67 \pm 0,06$	$1,46^* \pm 0,07$	$1,41^* \pm 0,08$
Через 3 мес	-	-	$1,72^{***} \pm 0,05$	$1,69^{***} \pm 0,08$
Через 6 мес	-	-	$1,85^{***} \pm 0,06$	$1,79^{***} \pm 0,07$

Примечание. Здесь и в табл. 3-4: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой, \*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с началом исследования.



Уровень активности НАГ в нкат/1 ммоль креатинина мочи

НАГ	Группы			
	контрольная (n=30)	сравнения (n=27)	ХСН I без СД2 (n=15)	ХСН I + СД2 (n=16)
Начало исследования	1,34 ± 0,14	1,76* ± 0,17	22,75* ± 5,97	17,24* ± 2,47
Через 3 мес	-	-	12,36** ± 2,65	26,7* ± 6,03
Через 6 мес	-	-	14,1** ± 5,23	34,6** ± 9,73

Таблица 4

Уровень активности ЛААП в нкат/1 ммоль креатинина мочи

ЛААП	Группы			
	контрольная (n=30)	сравнения (n=27)	ХСН I без СД2 (n=15)	ХСН I + СД2 (n=16)
Начало исследования	0,72 ± 0,09	1,18* ± 0,21	18,01* ± 3,93	17,55* ± 3,83
Через 3 мес	-	-	9,41** ± 1,62	14,97 ± 3,72
Через 6 мес	-	-	11,24** ± 2,99	13,13** ± 3,94

статистики. Исследование проведено на базе ГБУЗ «ООКБ» г. Оренбурга.

**Результаты.** В результате исследования были получены следующие данные, представленные в табл. 1-4.

**Обсуждение.** В результате исследования было выяснено, что терапия симвастатином не влияет на скорость клубочковой фильтрации у пациентов с бессимптомной дисфункцией сердца. Повышенные цифры СКФ в подгруппе ХСН I + СД2 обусловлены имеющейся у таких пациентов гиперфильтрацией. Обнаружен повышенный уровень цистатина С в моче обследуемых группы сравнения по сравнению с контрольной группой, концентрация цистатина С основных подгрупп статистически достоверно выше показателей контрольной группы. На фоне терапии симвастатином в течение 6 месяцев, уровень данного анализа статистически достоверно повышается. Активность ЛААП и НАГ на фоне терапии симвастатином в течение срока наблюдения в подгруппе ХСН I без СД2 достоверно снижается. В подгруппе ХСН I + СД2 выявлено снижение концентрации ЛААП и повышение активности НАГ, что может говорить о возникшей дистрофии эпителия щеточной каймы на фоне терапии симвастатином.

#### Выводы.

1. Терапия симвастатином в течение 6 мес пациентов с начальной стадией сердечной недостаточности в суточной дозировке 20 мг не ухудшает функцию клубочков в виде снижения СКФ.

2. Уровень цистатина С выше у лиц с ожирением без сердечной недостаточности и достоверно выше у лиц с бессимптомной сердечной недостаточностью.

3. Прием симвастатина в дозе 20 мг/сут не влияет на концентрацию НАГ и ЛААП у пациентов с ХСН I без СД2.

4. В результате гиполипидемической терапии симвастатином в суточной дозировке 20 мг у пациентов с ХСН I+СД2 наблюдается рост активности НАГ при одновременном снижении концентрации ЛААП, что может быть обусловлено дистрофией эпителия проксимальных почечных канальцев, на фоне дополнительной нагрузки на него с учетом частично почечного пути метаболизма симвастатина.

**Финансирование.** Исследование проведено при финансовой поддержке ФБГОУ ВО Оренбургского ГМУ Минздрава России.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-23 см. REFERENCES)

1. Лавренова Т. П. Ферменты мочи и их значение для диагностики поражения почек: (обзор литературы.) *Лабораторное дело.* 1990; 7: 3-6.
2. Муромцева Г. А., Концевая А. В., Константинов В. В., Артамонова Г. В., Гагагонова Т. М., Дупляков Д. В. и др. Распространенность факторов риска неинфекционных заболеваний в российской популяции в 2012–2013 гг. Результаты исследования ЭССЕ-РФ // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2014; 13 (6): 4–11.

#### REFERENCES

1. Lavrenova T. P. The enzymes of the urine and their significance for the diagnosis of renal disease:(review of literature). *Laboratornoe delo.* 1990; 7: 3-6. (in Russian)
2. Muromtseva G. A., Kontsevaya A.V., Konstantinov V. V., Artamonov, V. G, Galaganova T. M., Duplyakov D. V. et al. Prevalence of risk factors for non-communicable diseases in the Russian population in 2012-2013. Results of the study ESSE-RF. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika.* 2014; 13 (6): 4-11. (in Russian)
3. Adelman R. D. Obesity and renal disease. *Current opinion in nephrology and hypertension.* 2002; 11 (3): 331–5.
4. Chagnac A., Weinstein T., Herman M., Hirsh J., Gafer U., Ori Y. The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; 14: 1480-6.
5. Chen H.M., Li S.J., Chen H.P., Wang Q.W., Li L.S., Liu Z.H. Obesity-related glomerulopathy in China: a case series of 90 patients. *American Journal of Kidney Diseases.* 2008; 52: 58–65.
6. Farag Y.M., Gaballa M.R. Diabesity: an overview of farising epidemic. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2011; 26: 28–35.
7. Gokkusu C.A., Ozden T.A., Gul H., Yildis A. Relationship between plasma cystatin C and creatinine in chronic renal diseases and Tx – transplant patients. *Clinical Biochemistry.* 2004; 37 (2): 94–7.
8. Grubb A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biological fluids *Clinical nephrology.* 1992; 38: 20–7.
9. Herget-Rosenthal S., Bokenkamp A., Hofmann W. How to estimate GRF – serum creatinine, serum cystatin C or equations? *Clinical Biochemistry.* 2007; 40 (4): 153–61.
10. Hernández E., Praga M., Herrero J.C., Morales E., Revilla Y., Díaz-González R., Rodicio J.L. Influence of Obesity on the appearance of Proteinuria and Renal Insufficiency after Unilateral Nephrectomy. *Kidney International.* 2000; 58: 2111- 2118.
11. James W.P.T., Jackson-Leach R., Mhurdu C.N., Kalamara E., Shayeghi M., Rigby N., Nishida C., Rodgers A. Overweight and Obesity. In

- Comparative Quantification of Health Risks: Global and Regional Burden of Disease Attributable to Selected Major Risk Factors: eds. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Murray CJL. WHO, Geneva, 2003.
12. Jiao L., Berrington de Gonzalez A., Hartge P., Pfeiffer R.M., Park Y., et al. Body mass index, effect modifiers, and risk of pancreatic cancer: a pooled study of seven prospective cohorts // *Cancer Causes & Control*. 2010; 21 (8): 1305–14.
  13. Jungheim E.S., Travieso J.L., Carson K.R., Moley K.H. Obesity and reproductive function. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 2012; 39 (4): 479–93.
  14. Kambham N., Markowitz G.S., Valeri A.M., Lin J., D'Agati V.D. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney International*. 2001; 59:1498–1509.
  15. Kambham N., Markowitz G.S., Valeri A.M., Lin J., D'Agati V.D. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney International*. 2001; 59: 1498–1509.
  16. Katayama Shigehiro, Yagi Shinji, Hitoshi Amamoto, Yamaguchi Masako, Izumida Taro, Noguchi Yuichi, Inaba Munemichi, Inukai Kouichi. Is renoprotection by angiotensin receptor blocker dependent on blood pressure?: the Saitama Medical School, Albuminuria Reduction in Diabetics with Valsartan (STAR) study. *Hypertension Research*. 2007; 30 (6): 529–33.
  17. Ligibel J.A., Alfano C.M., Courneya K.S. American Society of Clinical Oncology position statement on obesity and cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2014; 32(31): 3568–74.
  18. Mahmood T.A., Arulkumaran S. Obesity: A ticking time bomb for reproductive health. *Newnes*. 2012. ISBN-13: 978-0-124-16045-3.
  19. Ng Marie, Fleming Tom, Robinson Margaret M., Thomson Blake, Gakidou Emmanuel. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014; 384 (9945): 766–81.
  20. Praga M., Borstein B., Andres A. Clinical features and long-term outcome of obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2001. 16, 1790–8.
  21. Waters Jill, Ashford Janet, Jaeger Burkar, Cn Verboom, Wonnacott Sue. Use of moxonidine as initial therapy and in combination in the treatment of essential hypertension-results of the TOPIC (Trial Of Physiotens In Combination) Study. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*. 1999; 2 (2):219–24.
  22. World Health Organization Media Centre. Obesity and overweight. Fact sheet no Geneva: World Health Organization; 2013.
  23. Wu Yichao, Liu Zhihong, Xiang Zhaoying, Zeng Caihong, Chen Zhaohong, Ma Xiaojing, Li Leishi. Obesity-related glomerulopathy: insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. *Endocrinology*. 2006; 147: 44-50.

Поступила 13.02.20  
Принята к печати 15.06.20

## КОАГУЛОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Петрова О.В.<sup>1,2</sup>, Дымова О.В.<sup>3</sup>, Твердохлебова Д.К.<sup>1</sup>, Смельцова Е.В.<sup>1</sup>, Панова Е.В.<sup>1</sup>, Никулина Д.М.<sup>2</sup>

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СИСТЕМ ДЛЯ ВЗЯТИЯ КРОВИ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава РФ, 414011, Астрахань, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 414000, Астрахань, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» Министерства науки и высшего образования РФ, 119991, Москва, Россия

*Цель – провести сравнительный анализ влияния систем для взятия крови на результаты исследования показателей системы гемостаза. В исследовании принимали участие здоровые испытуемые старше 18 лет женского пола (n=30). Критерий включения: практически здоровые лица. Критерий исключения: прием нестероидных противовоспалительных препаратов, оральных контрацептивов.*

*Забор крови осуществляли в следующие системы: 1 система – пробирки вакуумные Vacuette Premium, 2 система – Improvacuter, 3 система – BD Vacutainer® Plus.*

*До и после центрифугирования была произведена визуальная оценка качества биологического материала (плазмы крови) на наличие сгустков, гемолиза, недостаточного наполнения пробирки. В каждом образце определили протромбиновое время (ПВ, сек), активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ, сек), фибриноген (Ф, г/л) клоттинговым методом на автоматическом коагулометре «Sta Compact» («Diagnostica Stago», Франция). Результаты лабораторных исследований обработали методом параметрической и непараметрической статистики с помощью программы Statistica 12.0. На преаналитическом лабораторном этапе не выявлено различий при использовании систем для взятия крови: в образцах не выявлено сгустков и гемолиза, уровень наполнения систем был достаточный.*

*При сравнительном анализе систем для взятия крови Vacuette Premium, Improvacuter, BD Vacutainer® Plus выявлены различия при определении ПВ у доноров между системами Vacuette Premium и Improvacuter, между Improvacuter и BD Vacutainer® Plus; при определении АЧТВ между системами Vacuette Premium и Improvacuter. Полученные нами результаты подтверждают данные, имеющиеся в литературе о влиянии систем для взятия крови на показатели гемостаза, что позволяет сделать нам правильный выбор при приобретении систем для взятия крови.*

**Ключевые слова:** преаналитический этап; системы для взятия крови; показатели; кровь; система гемостаза.

**Для цитирования:** Петрова О.В., Дымова О.В., Твердохлебова Д.К., Смельцова Е.В., Панова Е.В., Никулина Д.М. Сравнительный анализ влияния систем для взятия крови на результаты исследования показателей системы гемостаза.

Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 607-610. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-607-610>

Petrova O.V.<sup>1,2</sup>, Dymova O.V.<sup>3</sup>, Tverdokhlebova D.K.<sup>1</sup>, Smelsova E.V.<sup>1</sup>, Panova E.V.<sup>1</sup>, Nikulina D.M.<sup>2</sup>

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE IMPACT OF BLOOD COLLECTION SYSTEMS ON THE RESULTS OF THE STUDY OF INDICATORS HEMOSTASIS SYSTEM

<sup>1</sup>Federal state budgetary establishment «Federal center cardiovascular surgery» (Astrakhan) Russia, Russian, 414011, Astrakhan, Russia;

<sup>2</sup>Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414000, Russia;

<sup>3</sup>Federal state budgetary scientific institution «Petrovsky national research center of surgery», Moscow, 119991, Russia

*Comparative analysis of the impact of blood collection systems on the results of routine coagulation tests. The aim of this study was to conduct comparative analysis of the effects of blood collection systems on the results of routine coagulation tests. The study involved practically healthy women over 18 years of age female (n=30). Inclusion criteria: practically healthy individuals. Exclusion criteria: taking non-steroidal anti-inflammatory drugs, or oral contraceptives. Blood collection was carried out in the following systems: 1 system- Vacuette Premium, 2 system- Improvacuter, 3 system- BD Vacutainer® Plus.*

*Before and after centrifugation, visual assessment of tubes was performed. No signs for the presence of clots, hemolysis, or insufficient filling was observed. In each sample we measured prothrombin time (PV, sec), activated partial thromboplastin time (APTT, sec), and fibrinogen (F, g/l) by clotting method on the automatic coagulometer «Sta Compact» («Diagnostica Stago», France). The results of laboratory analyses were processed using parametric and non – parametric statistics using The Statistica 12.0 software. At the preanalytical laboratory stage, there were no differences when using systems for blood sampling: the clots and hemolysis were not detected in the samples, the level of filling of the systems was sufficient. Comparative analysis revealed small, though statistically significant, differences for: PT when comparing Improvacuter with Vacuette Premium or BD Vacutainer®; APPT when comparing Improvacuter with Vacuette Premium. No differences were observed for Fg levels. Our results support the data available in the literature on the effects of blood-taking systems on hemostasis, which should be taken into account when purchasing blood collection systems.*

**Key words:** pre-analytical stage; blood collection system; indicators; blood; hemostasis system, coagulation tests.

**For citation:** Petrova O.V., Dymova O.V., Tverdokhlebova D.K., Smeltsova E.V., Panova E.V., Nikulina D.M. Comparative analysis of the impact of blood collection systems on the results of the study of indicators hemostasis system. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 607-610 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-607-610>

**For correspondence:** Petrova O.V., Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory, e-mail: [students\\_asma@mail.ru](mailto:students_asma@mail.ru)

**Information about authors:**

Петрова О.В. – <http://orcid.org/0000-0003-3544-2266>;  
Дымова О.В. – <http://orcid.org/0000-0002-3624-4774>;  
Твердохлебова Д.К. – <http://orcid.org/0000-0001-6754-6348>;  
Смельцова Е.В. – <http://orcid.org/0000-0002-0359-8664>;  
Панова Е.В. – <http://orcid.org/0000-0001-5357-7311>.

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

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

Received 05.06.2020  
Accepted 08.06.2020

В настоящее время стандартизация преаналитического этапа (взятия биологического материала) обеспечена за счет внедрения в клиническую практику систем для взятия крови.

На отечественном рынке представлены отечественные и зарубежные системы для взятия крови, в разном ценовом диапазоне и с разными техническими характеристиками.

В литературе имеются единичные данные влияния систем для взятия крови на результаты показателей системы гемостаза [2,5].

Учитывая тот факт, что особые требования предъявляются к взятию крови для проведения исследований показателей системы гемостаза, мы перед собой поставили следующую цель.

Цель исследования – провести сравнительный анализ влияния систем для взятия крови на результаты исследования показателей системы гемостаза.

**Материал и методы.** Исследования проводили в рамках профилактического медицинского осмотра в ФГБУ «Федеральном центре сердечно-сосудистой хирургии (г. Астрахань)». Все участники исследования дали свое информированное согласие.

В исследовании принимали участие здоровые испытуемые старше 18 лет женского пола ( $n=30$ ).

Критерий включения: практически здоровые лица. Критерий исключения: прием нестероидных противовоспалительных препаратов, оральных контрацептивов.

Кровь для исследования собирали путем пункции кубитальной вены после наложения жгута (не более 1 мин) в положении пациента лежа с помощью систем для забора крови.

Забор крови осуществляли в следующие системы:

1) система – пробирки вакуумные Vacuette Premium, с двойной стенкой, (производитель Greiner Bio-One GmbH, Австрия), объемом 1,8 мл.

2) система – вакуумные пробирки Improvacuter для коагулологии, (производитель Guangzhou Improve Medical Instruments Co., Ltd, Китай), объемом 1,8 мл.

3) система – пробирки вакуумные BD Vacutainer® Plus для коагулологических исследований (Becton Dickinson and Company, США), объемом 1,8 мл.

Все системы для забора крови (пробирки) содержали цитрат натрия концентрацией 3,2%. После взятия крови системы перемешивали 3–4 раза.

Образцы крови доставляли в лабораторию в течение 15–20 мин после венепункции. В лаборатории прово-

дили пробоподготовку – центрифугирование пробирок с кровью в течение 15 мин при относительной центрифужной силе 2500 G.

После центрифугирования была произведена визуальная оценка качества биологического материала (плазмы крови) на наличия сгустков, гемолиза, недостаточного наполнения пробирки.

В каждом образце, клоттинговым методом, определяли протромбиновое время (ПВ, сек), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ, с), фибриноген (Ф, г/л) на автоматическом коагулометре «Sta Compact» («Diagnostica Stago», Франция) согласно инструкциям производителя.

При исследовании ПВ и Ф использовали прекалиброванные наборы реактивов «NeoplastinR» и «Fibrinogen», АЧТВ – «Cephascreen» фирмы «Diagnostica Stago» (Франция).

Внутрилабораторный контроль качества осуществляли с помощью аттестованного контрольного материала «Lyphochek Coagulation Control» (фирмы «Bio-Rad», США), коэффициент аналитической вариации корреляции ( $CV_a$ ) для ПВ составил от 3,09% и до 4,09%,  $CV_a$  для АЧТВ – от 2,02% до 2,62%,  $CV_a$  для Ф – от 3,00% и до 3,23%.

Результаты лабораторных исследований обработали методами параметрической и непараметрической статистики (в зависимости от результатов проверки распределений на соответствие нормальному) с помощью программы Statistica 12.0. Вычисляли среднеарифметические значения ( $M$ ), стандартные отклонения ( $s$ ), медианы, 25-й и 75-й квартили, минимальные и максимальные значения.

Для определения смещений (отклонений) средних значений рассчитали смещение (отклонение)  $V\%$ , по формуле:  $V = (X - U3)/U3 * 100\%$ ,

где:  $V$  – относительное смещение,  $X$  – среднее значение измерений контрольного образца,  $U3$  – установленное значение.

Достоверность отличий средних величин оценивали с помощью параметрического  $t$ -критерия Стьюдента для связанных совокупностей и непараметрического критерия Вилкоксона (в зависимости от результатов предшествующей проверки распределений на соответствие нормальному) при уровне вероятности более 95% ( $p < 0,05$ ) с учетом поправки на множественную проверку гипотез (поправки Бонферрони). Для уменьшения ложноположительных результатов были отклонены



те гипотезы, для которых  $p$ -value по критерию  $p_i$  были меньше, чем  $\alpha/m$  ( $p_i < 0,0167$ ).

**Результаты.** Сравнительный анализ систем для взятия крови состоял из 2 этапов.

На первом этапе проводили сравнительный анализ качества биологического материала до и после центрифугирования в исследуемых образцах, собранных в системы для взятия крови трех производителей. Критериями качества биологического материала являлись – наличие сгустка, наличие гемолиза, недостаточный объем пробы.

Сравнительный анализ качества биологического материала до и после центрифугирования (табл. 1) не выявил в образцах сгустков, гемолиза, и отклонений в наполнении пробирок при использовании трех коммерческих систем для взятия крови разных производителей.

На втором этапе анализа в образцах, собранных в разные системы для взятия крови определили ПВ, АЧТВ и Ф.

Результаты определения показателей системы гемостаза (ПВ, АЧТВ, Ф) у здоровых добровольцев были в

пределах референсных значений. Описательная статистика для исследованных показателей системы гемостаза представлены в табл. 2.

При множественном сравнительном анализе результатов ПВ, полученных из трех систем, получены статистически достоверные различия между системой № 1 и системой № 2 ( $p=0,000006$ ), а также между системой № 2 и системой № 3 ( $p=0,000016$ ), хотя клиническая значимость выявленных различий не очевидна (см. табл. 2). Значения ПВ в плазме из систем № 1 и № 3 достоверно не различались ( $p=0,101$ ).

Результаты определения ПВ традиционно выдаются в виде производных расчетных величин. При множественном сравнительном анализе результатов активности протромбина по Квику, полученных из трех систем, получены статистически достоверные различия только между системой № 2 и системой № 3 ( $p=0,00022$ ). Выявленные различия определения МНО также были статистически достоверны между системами № 1 и № 3 ( $p=0,000000$ ), а также между системами № 2 и № 3 ( $p=0,000447$ ).

При множественном сравнительном анализе результатов АЧТВ, полученных из трех систем, получены статистически достоверные различия только между системами № 1 и № 3 ( $p=0,005107$ ).

Концентрация фибриногена, измеренная в плазме из трех анализируемых систем, достоверно не различалась (см. табл. 2).

Также для определения значимых различий между исследуемыми показателями использовали значения В (смещения), значения В (%) (табл. 3).

Анализ смещения между изучаемыми показателями производили с помощью сравнения полученных значений В (%) с международными значениями смещения (В, %), представленными на сайте [www.westgard.com](http://www.westgard.com) [6].

Таблица 1

Сравнительный анализ качества биологического материала до и после центрифугирования

№	Критерий	Системы для забора крови					
		1 система (n=30)		2 система (n=30)		3 система (n=30)	
		n	%	n	%	n	%
1	Наличие сгустков	0	0	0	0	0	0
2	Наличие гемолиза	0	0	0	0	0	0
3	Недостаточное наполнение	0	0	0	0	0	0

Таблица 2

Измеряемые и расчетные показатели системы гемостаза

Лабораторный показатель, единица измерения	Системы для взятия крови			Референсный интервал
	1 система (n=30)	2 система (n=30)	3 система (n=30)	
ПВ, сек	M±s	14,10±0,71	14,38±0,78	14,18±0,74
	Медиана	13,95	14,25	14,10
	25-й – 75-й квартиль	13,63-14,48	13,85-14,88	13,70-14,50
	Минимум-максимум	12,70-16,10	12,8-16,4	12,6-16,2
Активность протромбина по Квику, %	M±s	90,30±8,35	88,57±7,45	90,41-6,73
	Медиана	92,00	89,50	91,00
	25-й – 75-й квартиль	85,50-96,75	83,25-94,25	87,00-96,00
	Минимум-максимум	65,00-100,00	71,00-100,00	73,00-100,00
МНО	M±s	1,05±0,04	1,07±0,05	1,06±0,05
	Медиана	1,04	1,06	1,05
	25-й – 75-й квартиль	1,01-1,08	1,03-1,10	1,02-1,08
	Минимум-максимум	1,00-1,18	1,00-1,20	1,00-1,19
АЧТВ, сек	M±s	30,09±2,18	29,40±2,63	29,91±1,98
	Медиана	29,50	28,80	29,70
	25-й – 75-й квартиль	28,70-31,38	27,63-31,55	28,30-31,60
	Минимум-максимум	26,40-35,10	25,60-34,10	27,00-34,50
Фибриноген, г/л	M±s	3,24±0,50	3,35±0,45	3,24±0,53
	Медиана	3,14	3,37	3,21
	25-й – 75-й квартиль	2,90-3,71	3,04-3,79	2,95-3,75
	Минимум-максимум	2,50-4,00	2,50-4,00	2,09-4,00

Значения смещения (В, %) показателей системы гемостаза при использовании разных систем для взятия крови

№	Показатели	CVa	В,% между 1 и 2 системами	В,% между 2 и 3 системами	В,% между 1 и 3 системами	Критерии качества ( <a href="http://www.westgard.com">http://www.westgard.com</a> )	
						CVg	В,%
1	ПВ, с	4,09	-1,95*	1,99*	0	6,8	2,0
2	АЧТВ, с	2,62	2,35*,**	-1,71	0,6	8,6	2,3
3	Ф, г/л	3,23	-3,28	3,39	0	15,8	4,8

Примечание. \* – достоверность различий ( $p < 0,001$ ), \*\* – значимые изменения по сравнению с международными значениями, [www.westgard.com](http://www.westgard.com) [6].

Достоверные различия выявлены (см. табл.3):

1. для ПВ: при сравнении 1-й системы со 2-й системой; 2-й системы с 3-й системой (несмотря на то, что значения смещения были меньше международных);

2. для АЧТВ при сравнении 1-й системы со 2-й системой.

Не выявлено достоверных различий при определении фибриногена при использовании разных систем для взятия крови.

**Обсуждение.** Показатели системы гемостаза имеют важное значение для диагностики нарушений в свёртывающей системе гемостаза, оценки эффективности и безопасности использования антитромботической терапии [1,3,4].

В настоящее время системам для взятия крови, как источникам ошибок на преаналитическом этапе, не уделяется должного внимания. Тем не менее, Б.Г. Городецкий и соавт. [2] при валидации трех систем для взятия крови (Vacuette Premium, Lind-Vac®, Univac®) выявил, что при использовании систем Lind-Vac® и Univac® отмечаются статистически значимые изменения в ПВ, АЧТВ.

G.Lima-Oliveira и соавт. [5] при валидации пяти систем для взятия крови обнаружил достоверные различия при определении ПВ и АЧТВ.

В связи с этим, мы провели сравнительный анализ систем для взятия крови при проведении исследований показателей гемостаза.

На преаналитическом, лабораторном этапе не выявлено различий при использовании систем для взятия крови трех производителей: до и после центрифугирования в образцах не выявлено сгустков и гемолиза, уровень наполнения систем был достаточным (см. табл. 1).

На аналитическом этапе были обнаружены достоверные различия при определении ПВ и АЧТВ (см. табл. 3):

1) при определении ПВ между 1-й и 2-й системами, между 2-й и 3-й системами;

2) при определении АЧТВ между 1-й и 2-й системами.

Полученные нами результаты сравнительного анализа подтверждают данные, имеющиеся в литературе [2,5,7] о влиянии систем для взятия крови на показатели системы гемостаза.

Таким образом, при сравнительном анализе систем для взятия крови Vacuette Premium, Improvacuter, BD Vacutainer® Plus выявлены различия при определении ПВ у доноров между системами Vacuette Premium и Improvacuter, между Improvacuter и BD Vacutainer® Plus; при определении АЧТВ между системами Vacuette Premium и Improvacuter. Проведенный нами сравнитель-

ный анализ систем для взятия крови на коагулологические исследования выявил влияние систем на показатели свертывающей системы, что позволило нам сделать правильный выбор систем для взятия крови и обеспечить качество лабораторных исследований.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 5–7 см. REFERENCES)

1. Вавилова Т.В. Гемостазиология в клинической практике (пособие для врачей) СПб.: СПбГМУ; 2005.
2. Городецкий Б.Г., Станкевич Л.И. Сравнительная оценка качества вакуумных систем для взятия крови при проведении коагулологических клинико-диагностических исследований. *Полликлиника*. 2018; 4-1: 24-6.
3. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М. – Тверь: ООО «Издательство» Триада»; 2005.
4. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. СПб.: Формат; 2006.

#### REFERENCES

1. Vavilova T.V. Hemostasiology in Clinical Practice (Physician Manual) [Gemostaziologiya v klinicheskoy praktike (posobie dlya vrachej)]. St. Petersburg: SPbGMU im. Akad. I.P. Pavlova; 2005. (in Russian)
2. Gorodetskiy B.G., Stankevich L.I. Comparative assessment of the quality of vacuum systems for blood collection during coagulological clinical diagnostic studies. *Poliklinika*. 2018; 4-1: 24-6. (in Russian)
3. Dolgov V.V., Svirin P.V. Laboratory diagnosis of hemostasis disorders. [Laboratornaya diagnostika narushenij gemostaza]. Moscow-Tver': Triada; 2005. (in Russian)
4. Momot A.P. Hemostasis pathology. Principles and algorithms clinic of laboratory diagnostics [Patologiya gemostaza. Printsipy i algoritmy kliniko-laboratornoy diagnostiki]. St.Petersburg: FormaT; 2006. (in Russian)
5. Lima-Oliveira G., Lippi G., Salvagno G.L., Montagnana M., Picheth G., Guidi G.C. Sodium citrate vacuum tubes validation: preventing preanalytical variability in routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24 (03): 252-5.
6. Westgard J. Biological Variation Database Specifications <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. (accessed 1 August 2012).
7. CLSI GP -34A: Validation and Verification of tubes for Venous and capillary blood Specimen collection; Approved Guideline. Vol. 30 (25). CLSI document GP-34A. Wayne, USA: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2010.

Поступила 05.06.20  
Принята к печати 08.06.20

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Андрюков Б.Г.<sup>1,2</sup>, Ляпун И.Н.<sup>1</sup>, Бынина М.П.<sup>1</sup>, Матосова Е.В.<sup>1</sup>

### УПРОЩЁННЫЕ ФОРМАТЫ СОВРЕМЕННЫХ БИОСЕНСОРОВ: 60 ЛЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова» Минобрнауки РФ, 690087, Владивосток, Россия;

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет Минобрнауки РФ, 690950, Владивосток, Россия

*Иммунохроматографические (ИХ) тест-системы, известные зарубежным специалистам лабораторной диагностики как иммуноанализы латерального потока (lateral flow immunoassay, LFIA), представляют собой упрощённые ленточные форматы современных биосенсоров. В течение 60 лет они широко используются для быстрого обнаружения молекул-мишеней (лигандов) в биосубстратах и диагностики многих заболеваний и состояний. Растущая популярность этих тест-систем для оказания медицинской помощи или проведения диагностики в развивающихся странах, медицинских учреждениях, при неотложных состояниях, для индивидуального домашнего использования пациентами при мониторинге здоровья являются основными факторами, способствующими постоянному развитию и совершенствованию этих методов, появлению форматов нового поколения. Привлекательность и популярность этих быстрых, простых в использовании, недорогих и портативных диагностических инструментов связана, в первую очередь, с их высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, лёгкостью интерпретации полученных результатов. Эти качества прошли проверку временем, тест-системы LFIA полностью соответствуют современной мировой концепции «point-of-care testing», находя широкое применение не только в медицине, но и в экологии, ветеринарии, сельском хозяйстве. В обзоре будут освещены современные принципы конструирования наиболее широко используемых форматов ИХ тест-систем для клинической лабораторной диагностики, обобщены основные преимущества и недостатки метода, современные достижения и перспективы технологии LFIA. Современные инновации, направленные на улучшение аналитических характеристик технологии LFIA, интересны, перспективны, могут принести дополнительные преимущества ИХ платформ, снижавших им популярность и привлекательность на протяжении шести десятилетий.*

**Ключевые слова:** иммунохроматографические (ИХ) тест-системы; иммуноанализы латерального потока (LFIA); клиническая лабораторная диагностика, концепция «point-of-care testing».

**Для цитирования:** Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Упрощённые форматы современных биосенсоров: 60 лет использования иммунохроматографических тест-систем в лабораторной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (10): 611-618. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-611-618>

*Andryukov B.G.<sup>1,2</sup>, Lyapun I.N.<sup>1</sup>, Bynina M.P.<sup>1</sup>, Matosova E.V.<sup>1</sup>*

SIMPLIFIED FORMATS OF MODERN BIOSENSORS: 60 YEARS OF USE OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS IN LABORATORY DIAGNOSTICS

<sup>1</sup>Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Education and Science, 690087, Vladivostok, Russia;

<sup>2</sup>Far Eastern Federal University of the Ministry of Education and Science of Russia, 690950, Vladivostok, Russia

*Immunochromatographic test systems known to foreign laboratory diagnostic experts as lateral flow immunoassay (LFIA) are simplified tape formats of modern biosensors. For 60 years, they have been widely used for the rapid detection of target molecules (ligands) in biosubstrates and the diagnosis of many diseases and conditions. The growing popularity of these test systems for providing medical care or diagnostics in developing countries, medical facilities, in emergency situations, as well as for individual home use by patients while monitoring their health are the main factors contributing to the continuous development and improvement of these methods, the emergence of a new generation of formats. The attractiveness and popularity of these fast, easy-to-use, inexpensive and portable diagnostic tools is associated primarily with their high analytical sensitivity and specificity, as well as the ease of interpretation of the results. These qualities have passed the test of time, and today LFIA test systems are fully consistent with the modern world concept of «point-of-care testing», finding wide application not only in medicine, but also in ecology, veterinary medicine, and agriculture. This review will highlight the modern principles of designing the most widely used formats of immunochromatographic test systems for clinical laboratory diagnostics, summarize the main advantages and disadvantages of the method, as well as current achievements and prospects of LFIA technology. Modern innovations aimed at improving the analytical characteristics of LFIA technology are interesting, promising and can bring additional benefits to immunochromatographic platforms that have gained popularity and attractiveness for six decades.*

**Key words:** immunochromatographic test systems; lateral flow immunoassays (LFIA); clinical laboratory diagnostics; «point-of-care testing» concept.

**For citation:** *Andryukov B.G., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Simplified formats of modern biosensors: 60 years of using immunochromatographic test systems in laboratory diagnostics. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (10): 611-618 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-611-618>*

**Для корреспонденции:** Андрюков Борис Георгиевич, д-р мед. наук, вед.науч.сотр. лаб. мол. микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, проф. департамента фундаментальных наук Дальневосточного федерального университета; e-mail: andryukov\_bg@mail.ru

**For correspondence:** *Andryukov Boris Georgievich*, MD, Lead Researcher of the laboratory of molecular microbiology «Somov Institute of Epidemiology and Microbiology», Professor of the department of fundamental sciences «Far Eastern Federal University»; e-mail: [andryukov\\_bg@mail.ru](mailto:andryukov_bg@mail.ru)

**Information about authors:**

Andryukov B.G., <http://orcid.org/0000-0003-4456-808X>;

Lyapun I.N., <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>;

Bynina M.P., <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>;

Matosova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>.

**Acknowledgment.** *This work was supported by the Comprehensive Program for Fundamental Research of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences "Far East", project No. 18-03-053.*

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

Received 04.01.20  
Accepted 06.02.20

**Введение.** Без иммунохроматографических (ИХ) тестов, которые в течение 60 лет используются в клинической лабораторной диагностике, сегодня трудно представить работу любой лаборатории мира. Зарубежным специалистам эти системы известны под названием «иммуноанализ латерального потока» (lateral flow immunoassay, LFIA) или просто «анализ латерального потока» (lateral flow assay, FLA). Они являются реальной и перспективной альтернативой существующим аналитическим приборным технологиям. Эти устройства рассматриваются как упрощённые форматы современных биосенсоров, на котором элемент распознавания располагается на поверхности пористой мембраны, а результат визуализируется через несколько минут [1-4].

В условиях ограниченности ресурсов и специально обученного персонала эти быстрые, недорогие, надежные и простые в использовании диагностические платформы показали свою высокую эффективность. ИХ тесты представляют наиболее перспективный и динамически развивающийся сегмент экспресс-диагностики *in vitro*, с ежегодным совокупным ростом мирового производства в 7,7% [1, 2, 4, 5].

Растущая популярность ИХ тест-систем для оказания медицинской помощи или проведения диагностики в развивающихся странах, медицинских учреждениях, при неотложных состояниях, для индивидуального домашнего использования пациентами при мониторинге здоровья являются основными факторами, способствующими постоянному развитию и совершенствованию этих методов, появлению форматов нового поколения [2, 6-8].

**Иммуноанализ латерального потока (LFIA).** Впервые принцип диагностики на основе иммуноанализа бокового потока (бумажной хроматографии) предложен в 1959 г. биофизиком Розалин Ялоу (R.S. Yalow) и врачом-эндокринологом Соломоном Берсоном (S.A. Verson) (рис. 1).

Первой сконструированной системой на парафиновой бумаге был экспресс-тест для определения инсулина в плазме крови человека [9]. Новый принцип, вскоре получивший название IFLA, стал прорывной технологией не только для диагностики сахарного диабета. Форматы новых тестов быстро прогрессировали, бумагу заменила нитроцеллюлоза, и вскоре арсенал клинической лабораторной диагностики пополнился многочисленными тест-системами для определения других минорных анализатов крови (гормонов, ферментов, витаминов, маркеров инфекционного процесса). По мере развития технологии, её применение включает инфекционные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания [10, 11],

биомаркеры рака [12], пищевые патогены [13], ветеринарную диагностику [14].

В последующие 60 лет предложены несколько конструктивных вариантов IFLA, упростивших метод и одновременно сделавших тест-системы более чувствительными и селективными, доступными и простыми в использовании. Это позволило использовать их не только сотрудникам лабораторий, но и другими медицинскими специалистами, самими пациентами для самоконтроля [7, 15-17].

Появление платформ LFIA опосредовано развитием пациент-ориентированных технологий, изменением парадигмы культуры ухода за больными и увеличением потребности медицины неотложных состояний к оперативному получению лабораторной информации для принятия срочных решений, появление глобальной концепции «point-of-care testing» (тестирование в месте оказания медицинской помощи) [18-20].

При необходимости точной идентификации молекулярных маркеров используются классические микробиологические и иммуносерологические методы, современные диагностические платформы, такие как иммуноферментный (ИФА) и хемилюминесцентный анализы, полимеразная цепная реакция (ПЦР), проточная цитометрия и масс-спектрометрия (MALDI). Эти диагностические инструменты, требующие дорогостоящего оборудования, длительного времени тестирования и квалифицированного персонала, не всегда доступны для небольших районных стационаров, особенно в условиях ограниченных экономических ресурсов и децентрализованной инфраструктуры медицинских учреждений [3, 11, 20, 21].

**Иммунохроматографические тест-системы: типы и форматы.** Потенциалом этих появившихся в последние десятилетия эффективных технологий является постоянное развитие и усовершенствование имеющихся многочисленных LFIA-платформ, появление мультиплексных форматов, усложнение диагностических задач (например, скрининг на онкологические заболевания). Отсутствие необходимости в специальных температурных режимах хранения расширяет ареал их использования в развивающихся странах, малонаселённых и отдалённых регионах [15, 16, 21, 22].

За десятилетия использования ИХ тест-системы прошли проверку временем и подтвердили свою широкую доступность, высокую скорость, простоту в эксплуатации и интерпретации результатов эффективной и достоверной диагностикой заболеваний [21, 23-25]. Экономическая целесообразность и удобство использования



этих портативных диагностических систем полностью соответствуют современной мировой концепции «point-of-care testing» (лабораторное тестирование по месту лечения), благодаря чему тесты LFIA не потеряли своего значения и в наши дни [23-25].

В зависимости от используемых элементов распознавания ИХ тесты разделяются на различные типы. Среди конструктивных форматов этой диагностической стратегии можно назвать качественные, полуколичественные, количественные тест-системы для определения специфических антигенов [26, 27], антител [28, 29], фрагментов нуклеиновых кислот (ампликонов), которые могут образовываться в ходе полимеразной цепной реакции [12, 30].

Принцип действия LFIA простой. Типичная ИХ тест-система состоит из пластикового основания (подложки) с нанесёнными перекрывающимися слоями пористых

мембран, которые содержат молекулы распознавания для взаимодействия с молекулой-мишенью (рис. 2).

Пористые мембраны являются одним из наиболее важных элементов тест-системы и чаще всего изготавливаются из нитроцеллюлозы. Ключевыми параметрами, характеризующими свойства нитроцеллюлозы, являются капиллярные силы, лёгкость связывания и последующая иммобилизация белков, участвующих в дальнейших реакциях. Размер пор мембран составляет от 0,05 до 12 мкм, что обеспечивает необходимые скорость, время, равномерность капиллярного потока – важнейшие характеристики, определяющие качество работы тест-систем [3, 31-34].

Анализируемая жидкая проба (биосубстрат) помещается на прокладку для нанесения образцов, пропитанную буферным раствором, белками и повер-



Rosalyn Sussman Yalow

Solomon Aaron Berson

Рис. 1. Авторы принципа метода и первого сконструированного иммунохроматографического экспресс-теста для определения инсулина в плазме крови человека (1959 г.) Р. Ялоу и С. Берсон.



Рис. 2. Схематическое представление механизма иммунохроматографического тестирования (иммуноанализа латерального потока). Образец (проба), содержащий исследуемый антиген (аналит) наносится на прокладку для нанесения образца и мигрирует к конъюгату. Конъюгированные антитела связывают целевой анализ и мигрируют к тестовой линии, где целевой анализ связывается с антителами (рисунок авторов).

ностно-активными веществами (см. рис. 2). Эта часть тест-системы выполняет несколько важных функций: равномерное распределение пробы и направление её движения к конъюгату с определённой скоростью. Прокладка выполняет роль фильтра, задерживая нежелательные элементы биосубстратов, например, эритроциты [10, 35-37].

Далее проба перемещается при помощи капиллярных сил вдоль полоски на прокладку для высвобождения конъюгата, которая содержит специфические антитела. Качество используемых в системах специфических антител и их очистка является важнейшим условием оптимальной работы тестов. Как правило, в LFIA используются полученные из гибридной клеточной линии мышей моноклональные антитела, которые связаны с окрашенными или флуоресцентными частицами (метками) [2, 32, 38-40].

Основными требованиями к используемым в тест-системах меткам (чаще всего, это наночастицы коллоидного золота или окрашенный латекс) являются высокая стабильность, низкая цена. Перечисленные метки в полной мере соответствуют указанным требованиям, латекс может быть изготовлен в разных цветовых вариантах и в таком виде применяться в мультиплексных системах [3, 13, 41-43].

Далее конъюгированные антитела связываются с целевым анализом и мигрируют в зону распознавания. Эта часть полоски содержит биологические компоненты, которые вступают в реакцию с образовавшимся комплексом анализ-антитело, что проявляется в виде появившейся цветной линии в тестовой зоне, в то время как линия в контрольной зоне, указывает на правильный поток субстрата [32, 34, 36]. Интенсивность цвета тестовой линии, которая пропорциональна содержанию анализа в образце, оценивается визуально или при помощи специального оборудования (считывателя) [44].

Для поддержания капиллярного эффекта на дистальном конце тест-полоски расположена целлюлозная впитывающая (абсорбирующая) прокладка, роль которой заключается в отведении избытка реагентов и предотвращении обратного тока жидкости. Наличие этой прокладки позволяет использовать большие объёмы образца, что приводит к повышению чувствительности теста [35, 38, 40].

Среди других факторов, влияющих на чувствительность, специфичность теста, следует отметить присутствующие в биосубстратах химические вещества, которые могут связываться с компонентами системы и опосредовать ложноположительные результаты. Чувствительность тест-системы ограничена константой диссоциации конъюгата антитело-антиген и колориметрической детекцией [36, 39]. Применяемые производителями современные стратегии преодоления этих ограничений связаны с улучшением характеристик используемых меток (флуоресцентные, парамагнитные), которые не могут быть обнаружены визуально, а требуют специальных приборов-считывателей для количественного анализа [21, 29, 36]. Автоматизация детекции снижает временные затраты и улучшает интерпретацию результатов [18, 40].

Современные мультиплексные форматы LFIA способны детектировать содержание в одной пробе нескольких анализов (например, тест-системы для обнаружения наркотических средств в моче). В этом случае система имеет одну прокладку для нанесения образца, несколько (по числу исследуемых веществ) прокладок

для высвобождения конъюгата, содержащих специфические антитела для каждого целевого анализа, и столько же тестовых зон для считывания результата [21, 29, 26, 43].

Эти простые в использовании экспресс-тесты широко применяются для подтверждения наличия или отсутствия в биологических субстратах (моче, сыворотке или плазме, цельной крови) целевых анализов (например, антигенов, антител, биохимических маркеров, ампликонов) в медицине, экологических исследованиях, сельском хозяйстве, ветеринарии [2-4, 12-14, 18-22]. В этих отраслях ИХ тесты используют для верификации патогенов, специфических белков, ферментов, обнаружения химических веществ, наркотиков, токсинов, поллютантов и других веществ [10, 14, 23-26].

ИХ исследования выполняются в клинических лабораториях, местах оказания медицинской помощи или на дому, медицинским персоналом или пациентами. Использование визуальной метки в виде наночастиц золота, углерода, цветного латекса позволяет визуально за несколько минут провести качественное тестирование или количественное при наличии специального оборудования [28, 32, 44, 45].

В основе ИХ анализа лежит реакция антиген-антитело, при этом в роли антитела (элемента распознавания) могут использоваться аптамеры, нуклеиновые кислоты, белки или антилиганды, специфически нацеленные на связывание целевых анализов, позволяя при этом обнаруживать даже незначительные концентрации в присутствии структурно связанных молекул [33, 45, 46].

Технологическая гибкость ИХ платформы привела к созданию множества типов тест-систем на основе двух ключевых подходов, завоевавших наибольшую популярность у специалистов за последние десятилетия:

– неконкурентный (прямой) анализ (сэндвич-формат) – используется для выявления анализов с большой молекулярной массой с несколькими антигенными детерминантами (например, антигена р24 – капсомера ВИЧ). В этой конструкции положительный результат выдается при наличии в тестовой зоне цветной линии, которая будет отсутствовать при отрицательном результате [19, 26, 29]. Наиболее широко известными примерами сэндвич-формата являются тест-системы на беременность, определяющие повышенный уровень хорионического гонадотропина (в зависимости от чувствительности тестов, от 10 до 25 мМЕ/мл) у женщин в моче на ранней стадии беременности [47].

– конкурентный анализ (формат ингибирования) – предназначен для анализов с небольшой молекулярной массой с одним антигенным сайтом. В этом формате теста целевой анализ блокирует сайты связывания антител, расположенных на тестовой линии, предотвращая их взаимодействие с конъюгатом. Положительное заключение в этой конструкции выдается при отсутствии цветной линии, отрицательное – при появлении в тестовой зоне цветной линии любой интенсивности окрашивания [48]. Типичными примерами этого формата являются тест-системы на наркотики и токсины.

Каждый из этих форматов имеет свои преимущества и недостатки в зависимости от тестируемых анализов, диапазонов их критических концентраций, используемой конструкции тест-системы. Сэндвич-формат обладает более высокой аналитической чувствительностью (пикограммы анализа в 1 мл) по сравнению с конкурентными тест-системами (нанogramмы в 1 мл) [26].

Современные мультиплексные форматы иммунохроматографических тест-систем для диагностики инфекционных заболеваний

Инфекционный агент	Маркёр инфекционного процесса	Формат тест-систем	Ссылки
Вирус Денге Вирус Чикунгунья	IgG/IgM IgG/IgM	Мульти-плексный	[42]
Вирус Денге Вирус желтой лихорадки Вирус Эбола	Белок NS <sub>1</sub> Белок NS <sub>1</sub> Гликопротеин GP	Мульти-плексный	[43]
Вирус иммунодефицита человека Вирусный гепатит С (ВГС)	Anti-HIV IgG Anti-HCV IgG, Anti-HAV IgG и IgM	Мульти-плексный	[41]
<i>E. coli</i> O <sub>157</sub> : H <sub>7</sub> , <i>S. paratyphi</i> A, <i>S. paratyphi</i> B, <i>S. paratyphi</i> C, <i>S. typhi</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>V. cholerae</i> O <sub>p</sub> , <i>V. cholerae</i> O <sub>139</sub> , <i>V. parahaemolyticus</i>	UCP-антитела	Мульти-плексный TC-UPT-LF	[13, 24]

При высоких концентрациях анализируемого вещества сэндвич-системы могут показать ложноотрицательный результат, связанный с «эффектом высокой дозы». Этого недостатка лишены тест-системы на основе конкурентного формата [47, 48].

С 60-х годов XX века тест-системы IFLA заняли прочное место среди медицинских диагностических методов, как наиболее быстрые, простые, экономически привлекательные инструменты. Их эффективность значительно увеличилась с развитием считывающих технологий и появлением устройств, позволяющих трансформировать интенсивность цвета индикаторных линий в полуколичественный и количественный результат. В первом случае результат отображается как низкий, средний или высокий, во втором – выдаются числовые значения концентрации аналита, основанные на плотности тестовой линии [32, 35, 36-39].

Примером количественного формата IFLA является тест-система Seralite-FLC для обнаружения свободных каппа- (κ) и лямбда- (λ) цепей в сыворотке крови, позволяющая получать через 10 мин числовой результат содержания аналитов в мг/л, соотношение κ/λ [37, 49]. Эта тест-система сконструирована на основе высоко-специфичных моноклональных антител против κ и λ, не проявляющих перекрестной реактивности с другими специфическими белками крови [49].

**Иммунохроматографические тесты для диагностики инфекций.** Выявление инфекционных заболеваний и борьба с ними является серьёзной проблемой здравоохранения. Их тестирование может быть с большим успехом использовано для диагностики инфекционных заболеваний [6, 16-18, 22, 32].

Одним из ключевых направлений развития универсальной технологии IFLA является конструирование тест-систем в мультиплексном (многоцелевом) формате, который позволяет обнаруживать одновременно несколько бактериальных или вирусных мишеней в одном тесте. Эта технология является новым диагностическим подходом и открывает широкие перспективы для верификации возбудителя [6, 8, 17, 32, 50] (табл. 1).

Первая коммерческая комбинированная тест-систему IFLA успешно продемонстрирована в 2015 г. [25]. Она позволяла эффективно обнаруживать в моче антигены *Streptococcus pneumoniae* и *Legionella pneumophila*. Это увеличило популярность универсальной технологии LFIA, в равной степени эффективной в формате сэндвич-анализа как для высокомолекулярных антигенов микроорганизмов и антител к ним в биосубстратах, так и для низкомолекулярных аналитов [8, 16, 23, 24].

**Преимущества и недостатки иммунохроматографических тест-систем.** Большую часть мирового сегмента лабораторной экспресс-диагностики занимают тест-системы, основанные на технологии LFIA в стандартном и мультиплексном формате [18, 23, 24, 32]. Многие из них с успехом используются по программе «point-of-care testing» [3, 8, 11, 15].

При обнаружении методом LFIA молекулярных маркёров инфекционного процесса, требуется подтверждение независимым методом. Их методы подходят, прежде всего, для первичного скрининга [6, 8, 17]. При очевидной привлекательности форматов ИХ анализа существенные недостатки иммуноанализа сдерживают расширение практического использования этих диагностических платформ для клинической лабораторной диагностики (табл. 2).

Ведутся исследования, направленные на устранение ряда недостатков ИХ тест-систем, особенно в отношении получения количественных результатов и их документирования. Они могут быть оцифрованы с использованием сканеров или камер со специальным программным обеспечением, которое позволит фиксировать результаты и передавать их на расстоянии. Технологические усовершенствования потребуют более сложной аппаратуры и повысят стоимость и продолжительность времени анализа.

**Новые стратегии в иммунохроматографическом анализе.** Некоторые из новаций обсуждались выше и связаны с вариациями природы используемых меток, техническим совершенствованием количественного формата заключения. Некоторые из новых стратегий связаны с использованием комбинации наночастиц коллоидного золота с ферментом (например, пероксидазой хрена), что ведёт к каталитической амплификации сигнала [50, 51]. Другие методы усиления сигнала (в 1000 и более раз) и повышения чувствительности тест-систем связаны с использованием лазерного детектирования (плазмонный резонанс, рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния), хемиллюминесцентной или флуоресцентной метки [12, 30, 45, 52].

Предложен интересный формат IFLA для выявления увеличения концентрации миоглобина, основанный на формировании сэндвич-комплекса [43]. В предложенной системе иммобилизованные антитела конъюгируют со стрептавидином и выявляют специфическим красителем (сульфородамино В), инкапсулируемым в липосомы, что облегчает генерацию сигнала [43].

Успешно протестирован ряд перспективных новаций в мультиплексировании технологии IFLA [21, 44, 47]. Описаны тест-системы, состоящие из наночастиц кол-



Преимущества и недостатки иммунохроматографических тест-систем

Преимущества	Недостатки	Источник
Дешевые, быстрые, недорогие и простые в исполнении тесты Малый объём анализируемой пробы	Подходят только для первичного скрининга и требуют подтверждения положительных результатов независимыми методами	[3, 27, 29, 40]
Одноэтапный анализ, не требующий дополнительных реактивов Длительные сроки годности тест-систем	Для получения количественных результатов необходимо специальное оборудование (сканеры, рефлектометры, CCD-камера) и программное обеспечение Технологическое усовершенствование метода увеличивает стоимость и продолжительность анализа	[23, 28, 32] [29, 31, 37]
Позволяют использоваться в количественном и полуквантитативном форматах	В конкурентном формате ответ отрицательно коррелирует с концентрацией Возможные технические ошибки при нанесении образца могут повлиять на точность и воспроизводимость результата	[10, 12, 31]
Позволяют обнаруживать белки, гаптены, нуклеиновые кислоты, ампликоны	Повышение чувствительности тестов связано с использованием наночастиц золота, серебра, фермента, что ограничивает срок годности, увеличивает стоимость анализа, нарушает одностадийность	[3, 13, 18]
Тест-системы не требуют специальных температурных условий хранения	Исследуемый образец должен быть в виде раствора; предварительное разведение сухих образцов обязательно	[4, 10, 13, 28]
Не требуют дополнительного специального оборудования при использовании качественного формата Не нуждаются в квалифицированных специалистах	При низком содержании аналита в растворе требуется концентрирование образца Неточный объём пробы снижает точность результата	[13, 24, 26, 33]
Могут использоваться врачами общей практики или пациентами на дому	Время анализа зависит от вязкости исследуемой пробы	[25, 33, 35]
Визуальный результат ясен и легко различим	Возможна закупорка пор компонентами исследуемой пробы	[23, 28, 37]
Тесты продаются в виде наборов с комплектом всех предметов, необходимых для выполнения теста Возможно увеличение чувствительности тест-систем за счёт использования плазмонного резонанса, рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния (SERS), хемилюминесцентной или флуоресцентной метки Возможность мультиплексирования		[4, 24, 25, 12, 23, 29] [13, 28, 38]

лоидного золота и олигонуклеотидов, позволяющие одновременно обнаруживать антигены и антитела [21, 44], двух конъюгатных площадок для выявления двух белков [44]. Комбинация IFLA с электронными вычислительными элементами позволяет получать ответ в формате логического восприятия «и/или» [47].

**Заключение.** За 60-летнюю историю применения ИХ диагностические технологии стали незаменимыми инструментами в медицине, ветеринарии, экологии, прочно занимая место наиболее востребованных и популярных экспресс-тестов и полностью соответствуя современной мировой концепции «point-of-care testing» [15, 16, 27]. За прошедшие десятилетия принцип метода иммуноанализа латерального потока, предложенный Р. Ялоу и С. Берсоном, остался неизменным, несмотря на многочисленные современные форматы LFIA, направленные на улучшение чувствительности и специфичности. ИХ платформы получают всё большее распространение в мировой практике здравоохранения. Речь не идёт о замене центральных лабораторий технологиями «point-of-care testing» – платформы LFIA занимают определённую нишу в диагностике неотложных состояний и мониторинга здоровья пациентов.

Основные достоинства метода – простота и доступность в сочетании с его высокой эффективностью – всегда оставались определяющими при выборе инструмента для диагностического скрининга в условиях ограниченных ресурсов и труднодоступности оснащённых лабораторий или

медицинских учреждений. Простота платформ LFIA противоречит сложной задаче оптимизации метода, направленной на то, чтобы сделать его более чувствительным, мультиплексным, количественным. Стратегии разработчиков метода связаны с эмпирической подборкой материалов для мембран, чистоты реагентов (антител, буферных систем, блокирующих реагентов) и дизайна тест-систем [50].

Инновации, направленные на улучшение аналитических характеристик технологии LFIA, интересны, перспективны, могут принести дополнительные преимущества ИХ платформам (например, интеграция в конструкцию «лаборатория на кристалле») [53]. Большинство из них увеличивает стоимость этих тест-систем, их сложность, и тем самым, снижает доступность этих замечательных технологий – свойств, снижавших им популярность и привлекательность на протяжении шести десятилетий.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток», проект № 18-03-053.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Havelaar A.H., Kirk M.D., Torgerson P.R., Gibb H.J., Hald T., Lake R.J. et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in



2010. *PLOS Medicine*. 2010; 12: e1001923. Doi: 10.1371/journal.pmed.1001923.
2. Byzova N.A., Vinogradova S.V., Porotikova E.V., Terekhova U.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus. *Biosensors (Basel)*. 2018; 8(4): E111. Doi: 10.3390/bios8040111.
  3. Anfossi L., Di Nardo F., Cavalera S., Giovannoli C., Baggiani C. Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors (Basel)*. 2018; 9(1): E2. Doi: 10.3390/bios9010002.
  4. Zhao S., Wang S., Zhanga S., Liua J., Dong Y. State of the art: Lateral flow assay (LFA) biosensor for on-site rapid detection. *Chin. Chem. Lett.* 2018; 29(11): 1567-77. Doi: 10.1016/j.ccl.2017.12.008.
  5. World Health Organization (WHO) Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med*. 2010; 12 (12): e1001923.
  6. Sin M.L.Y., Mach K.E., Wong P.K., Liao J.C. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014; 14(2): 225-44. Doi: 10.1586/14737159.2014.888313.
  7. Peltomaa R., Glahn-Martinez B., Benito-Peña E., Moreno-Bondi M.C. Optical Biosensors for Label-Free Detection of Small Molecules. *Sensors*. 2018;18: 4126.
  8. Zarei M. Infectious pathogens meet point-of-care diagnostics. *Biosens Bioelectron*. 2018; 106:193-03. Doi: 10.1016/j.bios.2018.02.007.
  9. Yalow R.S., Berson S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 1960; 39:1157-75.
  10. Mak W.C., Beni V., Turner A.P.F. Lateral-flow technology: From visual to instrumental. *Trends Analyt. Chem.* 2016; 79: 297-05. Doi: 10.1016/j.trac.2015.10.017.
  11. McPartlin D.A., O'Kennedy R.J. Point-of-care diagnostics, a major opportunity for change in traditional diagnostic approaches: Potential and limitations. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014; 14: 979-98. Doi: 10.1586/14737159.2014.960516.
  12. Fu X., Wen J., Li J., Lin H., Liu Y., Zhuang X., Tian C., Chen L. Highly sensitive detection of prostate cancer specific PCA3 mimic DNA using SERS-based competitive lateral flow assay. *Nanoscale*. 2019; 11(33): 15530-36. Doi: 10.1039/c9nr04864b.
  13. Zhao Y., Wang H.R., Zhang P.P., Sun C.Y., Wang X.C., Wang X.R. et al. Rapid multiplex detection of 10 foodborne pathogens with an up-converting phosphor technology-based 10-channel lateral flow assay. *Sci. Rep.* 2016; 6: 21342.
  14. Sastre P., Gallardo C., Monedero A., Ruiz T., Arias M., Sanz A., Rueda P. Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 206. Doi: 10.1186/s12917-016-0831-4.
  15. Jones C.H.D., Glogowska M., Locock L., Lasserson D.S. Embedding new technologies in practice – a normalization process theory study of point of care testing. *BMC Health. Services Research*. 2016; 16: 591. Doi: 10.1186/s12913-016-1834-3.
  16. Kozel T.R., Burnham-Marusch A.R. Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: Past, Present, and Future. *J. Clin. Microb.* 2017; 55(8): 2313-20. Doi: 10.1128/JCM.00476-17.
  17. WHO Infectious Disease Newsletter. Internet resource: access code. [https://www.who.int/topics/infectious\\_diseases/factsheets/ru/\(lato of the application 12.09.19\)](https://www.who.int/topics/infectious_diseases/factsheets/ru/(lato%20of%20the%20application%2012.09.19)).
  18. Kim H., Chung D.R., Kang M. A new point-of-care test for the diagnosis of infectious diseases based on multiplex lateral flow immunoassays. *Analyst*. 2019; 144(8): 2460-66. Doi: 10.1039/c8an02295j.
  19. Gitonga L.K., Boru W.G., Kwena A., Maritim M., Wamicwe J., Ransom J. Point of care testing evaluation of lateral flow immunoassay for diagnosis of cryptococcus meningitis in HIV-positive patients at an urban hospital in Nairobi, Kenya, 2017. *BMC Res Notes*. 2019; 12(1): 797. Doi: 10.1186/s13104-019-4829-4.
  20. Kumar S., Bhushan P., Krishna V., Bhattacharya S. Tapered lateral flow immunoassay based point-of-care diagnostic device for ultra-sensitive colorimetric detection of dengue NS1. *Biomicrofluidics*. 2018; 12(3): 034104. Doi: 10.1063/1.5035113.
  21. Anfossi L., Di Nardo F., Cavalera S., Giovannoli C., Baggiani C. Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors (Basel)*. 2018; 9(1): E2. Doi: 10.3390/bios9010002.
  22. Banerjee R., Jaiswal A. Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. *Analyst*. 2018; 143(9): 1970-96. Doi: 10.1039/c8an00307f.
  23. Safenkova I.V., Panferov V.G., Panferova N.A., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Alarm lateral flow immunoassay for detection of the total infection caused by the five viruses. *Talanta*. 2019; 195: 739-44. Doi: 10.1016/j.talanta.2018.12.004. 9.
  24. Zhao Y., Zhang Q., Meng Q., Wu F., Zhang L., Tang Y., Guan Y., An L. Quantum dots-based lateral flow immunoassay combined with image analysis for semiquantitative detection of IgE antibody to mite. *Int. J. Nanomedicine*. 2017; 12: 4805-12. Doi: 10.2147/IJN.S134539.
  25. Jørgensen C.S., Uldum S.A., Sørensen J.F., Skovsted I.C., Otte S., Elverdal P.L. Evaluation of a new lateral flow test for detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* urinary antigen. *J. Microbiol. Methods*. 2015; 116: 33-36. Doi: 10.1016/j.mimet.2015.06.014.
  26. Rohrman B.A., Leautaud V., Molyneux E., Richards-Kortum R.R. A lateral flow assay for quantitative detection of amplified HIV-1 RNA. *PLoS One*. 2012; 7: e45611. Doi: 10.1371/journal.pone.0045611.
  27. Boisen M.L., Ottamasathien D., Jones A.B., Millett M.M., Nelson D.S., Bornholdt Z.A. et al. Development of prototype filovirus recombinant antigen immunoassays. *J. Infect. Dis.* 2015; 212(2): 359-67. Doi: 10.1093/infdis/jiv353.
  28. Nielsen K., Yu W.L., Kelly L., Bermudez R., Renteria T., Dajer A. et al. Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale*. *J. Immunoassay Immunochem*. 2008; 29: 10–8. Doi: 10.1080/15321810701734693.
  29. Kamphée H., Chaiprasert A., Prammananan T., Wiriyachaiyorn N., Kanchanatavee A., Dharakul T. Rapid molecular detection of multidrug-resistant tuberculosis by PCR-nucleic acid lateral flow immunoassay. *PLoS One*. 2015; 10: e0137791. Doi: 10.1371/journal.pone.0137791.
  30. Helfmann J., Netz U.J. Sensors in diagnostics and monitoring. *Photonics & Lasers in Medicine*. 2015; 4(2): 36-42. Doi: 10.1515/plm-2015-0012.
  31. Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008; 393(2): 569–82. Doi: 10.1007/s00216-008-2287-2.
  32. Pilavaki E., Demosthenous A. Optimized Lateral Flow Immunoassay Reader for the Detection of Infectious Diseases in Developing Countries. *Sensors (Basel)*. 2017; 17(11): E2673. Doi: 10.3390/s17112673.
  33. Kim C., Yoo Y.K., Han S.I., Lee J., Lee D., Lee K. et al. Battery operated preconcentration-assisted lateral flow assay. *Lab Chip*. 2017; 17(14): 2451-58. Doi: 10.1039/c7lc00036g.
  34. Naidoo N., Ghai M., Moodley K., Mkize L., Martin L., McFarlane S., Rutherford S. Modified RS-LAMP assay and use of lateral flow devices for rapid detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Lett Appl Microbiol*. 2017; 65(6): 496-03. Doi: 10.1111/lam.12799.
  35. Hu S., Niu L., Zhao F., Yan L., Nong J., Wang C. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* and its carbapenem-resistant gene blaOXA-23-like by multiple cross displacement amplification combined with lateral flow biosensor. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 17888. Doi: 10.1038/s41598-019-54465-8.
  36. Nelis J.L.D., Bura L., Zhao Y., Burkin K.M., Rafferty K., Elliott C.T., Campbell K. The Efficiency of Color Space Channels to Quantify Color and Color Intensity Change in Liquids, pH Strips, and Lateral Flow Assays with Smartphones. *Sensors (Basel)*. 2019; 19(23): E5104. Doi: 10.3390/s19235104.
  37. Schwenke K.U., Spiehl D., Krauß M., Riedler L., Ruppenthal A., Villforth K. et al. Analysis of free chlorine in aqueous solution at very low concentration with lateral flow tests. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 17212. Doi: 10.1038/s41598-019-53687-0.
  38. Borges M.A.S.B., Araújo Filho J.A., Soares R.B.A., Vidal J.E., Turchi M.D. False-negative result of serum cryptococcal antigen lateral flow assay in an HIV-infected patient with culture-proven cryptococcaemia. *Med. Mycol. Case. Rep.* 2019; 26: 64-6. Doi: 10.1016/j.mmcr.2019.10.009.

39. Foysal K.H., Seo S.E., Kim M.J., Kwon O.S., Chong J.W. Analyte Quantity Detection from Lateral Flow Assay Using a Smartphone. *Sensors (Basel)*. 2019; 19(21): E4812. Doi: 10.3390/s19214812.
40. Romeo A., Leunga T.S., Sánchez S. Smart biosensors for multiplexed and fully integrated point-of-care diagnostics. *Lab. Chip*. 2016; 16: 1957-61. Doi: 10.1039/C6LC90046A.
41. Lee S., Mehta S., Erickson D. Two-Color Lateral Flow Assay for Multiplex Detection of Causative Agents Behind Acute Febrile Illnesses. *Anal. Chem.* 2016; 88(17): 8359-63. Doi: 10.1021/acs.analchem.6b01828.
42. Yen C.W., de Puig H., Tam J.O., Gómez-Márquez J., Bosch I., Hamad-Schifferli K., Gehrke L. Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses. *Lab. Chip*. 2015; 15(7): 1638-41. Doi: 10.1039/C5LC00055F.
43. Edwards K.A., Korff R., Bäumner A.J. Liposome-Enhanced Lateral-Flow Assays for Clinical Analyses. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1571: 407-34. Doi: 10.1007/978-1-4939-6848-0\_25.
44. Koczula K.M., Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016; 60(1): 111-20. Doi: 10.1042/EBC20150012.
45. Guo C., Zhong L.L., Yi H.L., Chen M. Clinical value of fluorescence lateral flow immunoassay in diagnosis of influenza A in children. *Zhongguo dang dai er ke za zhi*. 2016; 18(12): 1272-6.
46. Berger P., Sturgeon C. Pregnancy testing with hCG—future prospects. *Trends Endocrinol. Metab.* 2014; 25(12): 637-48. Doi: 10.1016/j.tem.2014.08.004.
47. Chen J., Fang Z., Lie P., Zeng L. Computational lateral flow biosensor for proteins and small molecules: a new class of strip logic gates. *Anal. Chem.* 2012; 84: 6321-5. Doi: 10.1021/ac301508b.
48. Campbell J.P., Heaney J.L., Shemar M., Baldwin D., Griffin A.E., Oldridge E. et al. Development of a rapid and quantitative lateral flow assay for the simultaneous measurement of serum  $\kappa$  and  $\lambda$  immunoglobulin free light chains (FLC): inception of a new near-patient FLC screening tool. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2017; 55(3): 424-34. Doi: 10.1515/cclm-2016-0194.
49. Pilavaki E., Demosthenous A. Optimized Lateral Flow Immunoassay Reader for the Detection of Infectious Diseases in Developing Countries. *Sensors (Basel)*. 2017; 17(11): E2673. Doi: 10.3390/s17112673.
50. Hsieh H.V., Dantzler J.L., Weigl B.H. Analytical Tools to Improve Optimization Procedures for Lateral Flow Assays. *Diagnostics (Basel)*. 2017; 7(2): E29. Doi: 10.3390/diagnostics7020029.
51. Wang J., Katani R., Li L., Hegde N., Roberts E.L., Kapur V., DebbRoy C. Rapid detection of *Escherichia coli* O<sub>157</sub> and shiga toxins by lateral flow immunoassays. *Toxins*. 2016; 8: 92. Doi: 10.3390/toxins8040092.
52. Morioka K., Fukai K., Yosihda K., Kitano R., Yamazoe R., Yamada M. et al. Development and evaluation of a rapid antigen detection and serotyping lateral flow antigen detection system for foot-and-mouth disease virus. *PLoS ONE*. 2015; 10: e0134931. Doi: 10.1371/journal.pone.0134931.
53. Fuchiwaki Y., Goya K., Tanaka M. Practical High-Performance Lateral Flow Assay Based on Autonomous Microfluidic Replacement on a Film. *Anal. Sci.* 2018; 34(1): 57-63. Doi: 10.2116/analsci.34.57.

щ Поступила 04.01.20  
Принята к печати 06.02.20

## ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Козлова В. А., Покровская М. С., Мешков А. Н., Драпкина О. М.

### СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ТРАНСПОРТИРОВКЕ БИООБРАЗЦОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава РФ, 101990, Москва, Россия

*Для получения биологических образцов высокого качества в процессе биобанкирования для дальнейшего использования в научно-исследовательской работе, в лабораторных исследованиях необходимо учитывать влияние способа транспортировки на их сохранность. Рассмотрено влияние жидкого азота, сухого льда, аккумуляторов холода на биологические показатели, даны рекомендации для уменьшения влияния способов замораживания и хранения на качество биобразцов. Жидкий азот обеспечивает наилучшую сохранность образцов, однако, при их транспортировке сухой лёд используется гораздо чаще. При транспортировке некоторых типов клеток при помощи сухого льда необходимо использовать криопротекторы CryoStor CSI, Cell Banker 1. Сухой лёд может оказывать влияние как на pH жидких биобразцов, так и на коагулологические показатели плазмы крови. Проникновение CO<sub>2</sub> в образец ведёт к изменению показателей ПТВ и АЧТВ, к снижению уровня протеина С и фибриногена при определённых условиях. Во избежание изменения коагулологических параметров образцы сыворотки и плазмы крови, подвергнутые воздействию сухого льда более 16 часов, должны быть разморожены открытыми при комнатной температуре, либо находиться при температуре –80°С в течение 24 ч. Применение аккумуляторов холода недопустимо для длительной транспортировки сыворотки и плазмы крови, содержащих нестабильные биомаркёры, из-за недостаточно низкой температуры (повышение с течением времени до –25°С и выше). В качестве аккумуляторов холода низких температур (до –80°С) могут использоваться металлические гранулы, но они не являются настолько же эффективными, как сухой лёд, т. к. он способен удерживать требуемую температуру гораздо дольше.*

**Ключевые слова:** контроль качества; транспортировка биобразцов; биобанкирование; жидкий азот; сухой лёд; преаналитические переменные; криоконсервация; биологические образцы.

**Для цитирования** Козлова В. А., Покровская М. С., Мешков А. Н., Драпкина О. М. Современные подходы к транспортировке биобразцов при низких температурах. Клиническая лабораторная диагностика. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 619-625. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-619-625>

*Kozlova V.A., Pokrovskaya M.S., Meshkov A.N., Drapkina O.M.*

#### ACTUAL APPROACHES TO THE TRANSPORTATION OF BIOLOGICAL SAMPLES AT LOW TEMPERATURES

FSI National Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 101990, Moscow, Russia

*Taking into account the impact of shipment method of biosamples is necessary for obtaining high-quality biological samples in biobanking and laboratory research. The impact of liquid nitrogen, dry ice and cold accumulators on the quality of biological markers was considered, as well as recommendations to reduce the impact of these methods of shipment. The liquid nitrogen provides the best preservation of samples, however, dry ice is used much more often during their transportation. When transporting certain types of cells using dry ice, there is the way to use CryoStor CSI and Cell Banker 1 cryoprotectors. The dry ice has a significant effect on both the pH of liquid biological samples and the coagulological parameters of plasma samples. The penetration of CO<sub>2</sub> into the sample leads to changes in the parameters of PTT and APPT, as well as to decrease the protein C and fibrinogen level under certain conditions. Serum and plasma samples exposed to dry ice for more than 16 hours should be thawed open at room temperature, or instead of it should be kept at –80 °C for 24 hours to avoid changes in coagulation parameters. The use of cold accumulators is unacceptable for long-term shipment of serum and plasma containing unstable biomarkers because of insufficiently low temperature (increase over time to –25 °C and above). Besides, metal pellets can be used as cold storage batteries at low temperatures (up to –80 °C), but they are not as effective as dry ice, since it is able to hold the required temperature for much longer.*

**Key words:** quality control; transportation of biological samples; biobanking; liquid nitrogen; dry ice; preanalytical variables; cryopreservation; biological samples.

**For citation:** Kozlova V.A., Pokrovskaya M.S., Meshkov A.N., Drapkina O.M. Actual approaches to the transportation of biological samples at low temperatures. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics); 2020; 65 (10): 619-625 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-619-625>

**For correspondence:** Kozlova V.A., research assistance of Biobank; e-mail: [vkozlova2905@gmail.com](mailto:vkozlova2905@gmail.com)

**Information about authors:**

Kozlova V.A. <https://orcid.org/0000-0002-3843-6980>  
Pokrovskaya M.S. <https://orcid.org/0000-0001-6985-7131>  
Meshkov A.N. <https://orcid.org/0000-0001-5989-6233>  
Drapkina O.M. <https://orcid.org/0000-0002-4453-8430>

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 20.05.2020  
Accepted 25.05.2020

**Введение.** Для получения достоверных результатов любого лабораторного исследования, необходимо учитывать ряд преаналитических факторов, влияющих на качество биоматериала. Все процедуры в биобанке выполняются строго по принятым стандартам, в противном случае может снизиться качество биообразцов [1]. Для выработки и дальнейшего применения стандартов в биобанкировании важным является исследование влияния преаналитических переменных на биологические образцы.

Среди наиболее значимых преаналитических факторов существенную роль играет транспортировка биологических образцов, которая требует мониторинга таких параметров, как тип образца, температура транспортировки, материал и прочность упаковки [2], время года и день транспортировки [3].

Наиболее устойчивые условия для сохранения биологических жидкостей, жизнеспособности и функциональности клеток обеспечиваются с помощью хранения и транспортировки их в жидком азоте [3]. Температура жидкого азота составляет  $-196^{\circ}\text{C}$ , что значительно ниже температуры стеклования воды, все биохимические и фотодинамические реакции останавливаются, что обуславливает высокую эффективность использования жидкого азота. Несмотря на ряд исследований, подтверждающих высокую эффективность жидкого азота для длительного хранения и транспортировки биологических образцов, в частности, таких нестабильных, как сыворотка и плазма крови, шире всего в качестве хладообразующего элемента при перевозке используют сухой лёд (твёрдый диоксид углерода,  $\text{CO}_2$ ). Сухой лёд ( $-79^{\circ}\text{C}$ ) имеет ряд преимуществ по сравнению с жидким азотом в широком использовании: он не считается опасным или токсичным для курьеров, не нуждается в специальных ёмкостях для хранения, может использоваться в обычном пенопластовом контейнере. Сухой лёд дешевле жидкого азота. Так как морозильные камеры с температурой  $-80^{\circ}\text{C}$  часто используются для хранения биоматериала, образцы, транспортируемые на сухом льду, могут быть помещены в морозильную камеру по прибытии без скачков температур, возникающих при их транспортировке из одного хранилища в другое. Большое число транспортных компаний используют контейнеры с сухим льдом, но только немногие занимаются перевозками с жидким азотом [4].

В качестве хладоэлементов могут применяться и различные смеси фазоизменяемых материалов, в состав которых входят как гидрогели, так и солевые растворы. Подобные материалы способны удерживать нужную температуру в течение нескольких часов, однако, данным способом нельзя транспортировать нестабильные биологические субстанции, такие как плазма и сыворотка крови, т. к. подобные холодовые элементы дают недостаточно низкие температуры ( $+8...-25^{\circ}\text{C}$ ) [5].

В обзоре представлены результаты анализа литературы на предмет влияния различных хладообразующих элементов, используемых для поддержания температурного режима во время транспортировки биоматериала, на параметры биологических образцов и на результаты лабораторных исследований, проводимых на биообразцах, достоинства и недостатки каждого из методов транспортировки биоматериала при заданной температуре.

**Замораживание биообразцов.** Большинство биологических жидкостей представляют собой сложные смеси, в состав которых входят растворы солей и белков в воде в разных концентрациях, благодаря чему существует большой диапазон температур замерзания различных биоматериалов. Во время замораживания вода преобразуется в форму льда, отделяя от себя растворённые вещества, белки и даже клетки. Образец полностью не затвердевает до тех пор, пока в оставшейся незамерзшей фракции жидкости не образуется эвтектика или стеклование. Наличие внеклеточного матрикса влияет на затвердевание воды. Хранение образцов на температурах, при которых в образцах присутствует жидкая вода (по сравнению с замороженной или остекленевшей водой), ведёт к снижению стабильности биомаркёров.

**Хранение и транспортировка в жидком азоте.** Жидкий азот – азот в жидкой форме, его молекулы состоят из двух атомов, связанных друг с другом ковалентными химическими связями. Жидкий азот имеет низкую температуру, его точка кипения составляет  $-195,79^{\circ}\text{C}$  [6]. Хранится жидкий азот в специальных контейнерах, в которых контролируется внутреннее давление. Контейнеры, рассчитанные на малый объём жидкого азота от 2 до 50 литров, называются сосуды Дьюара. В практике крупных криохранилищ используются криогенные сосуды ёмкостью от 28 до 2000 литров. Жидкий азот используют в качестве резервного источника холода в автоматизированных системах хранения.

Для хранения и транспортировки образцов в жидком азоте используются специальные криопробирки. Во время замораживания в пробирке может снижаться давление воздуха. Степень разрежения воздуха зависит напрямую от разницы между объёмом пробирки и объёмом биообразца. При хранении пробирок в жидком азоте он может проникать в пробирку в объёме равном объёму разрежения. При оттаивании пробирок, азот из жидкой фазы переходит в газообразную и вызывает повышение давления внутри пробирки. В результате пробирка может разорваться. Загрязнённый азот, проникающий в пробирку, может повредить клеточный материал образца. При хранении и транспортировке образцов в жидком азоте используются специальные криопробирки, заполнять которые необходимо строго до отметки. Криопробирки, предназначенные для хранения клеток, образцов тканей, растворов (различного жидкого биоматериала), выпускаются с двумя типами крышек – с



внешней и внутренней резьбой. Криопробирка с внутренней резьбой имеет силиконовое кольцо. Использование пробирок с внутренней резьбой и силиконовым кольцом снижает риск их повреждения.

Биологические образцы рекомендуется хранить не в самом жидком азоте, а в его парах [7]. Это необходимо в том числе для того, чтобы исключить процесс перекрестной контаминации – загрязнения образцов биологического материала. Наиболее безопасным является способ хранения биоматериала в криопробирках с силиконовым кольцом в газообразном азоте.

**Криоконсервация клеток.** Замораживание при сверхнизких температурах, или криоконсервация осуществляется при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ , при помещении капсулы с биологическими объектами в жидкий азот. Реже используются более высокими температурами (от  $-180$  до  $-130^{\circ}\text{C}$ ), которые создают электрифицированные морозильные камеры, но данный температурный режим менее надёжен и подходит не для всех объектов. Использование низких температур обеспечивает остановку биохимических процессов в клетках, в том числе останавливается обмен веществ и энергией с внешней средой, благодаря чему живые объекты могут сохраняться долгое время [8, 9]. Использование низких температур может привести к гибели живых объектов, если не осуществлять специальные защитные меры. Основными повреждающими факторами при замораживании являются образование внутриклеточного льда, характерное для большой скорости охлаждения (более 10 К/мин), обезвоживание клетки, характерное для небольшой скорости охлаждения (менее 10 К/мин). В криобиологии повреждение, получаемое клеткой при замораживании, называют «криоповреждением».

При низких температурах происходит кристаллизация воды. Эти кристаллы при размораживании разрушают большое число клеток. Качество и количество клеток, полученных после оттаивания, остается неудовлетворительным, несмотря на наличие различных методов замораживания клеток, использования криопротекторов (ДМСО, CryoStor CS10, трегалоза, этиленгликоль и т. д.) и разработку различных защитных эмульсий [3, 10].

Для сохранения жизнеспособности клеток необходимо замораживать их медленно, после смешивания клеток с криопротектором. Для этого используют специальную камеру, обеспечивающую их постепенное замораживание на  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение 1-2 дней, затем переставляют в жидкий азот. Размораживание клеток с наименьшими потерями происходит на водяной бане при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  [11].

Широкое распространение криоконсервация получила в ЭКО-технологии [12] и [13] и в ветеринарии для сохранения жизнеспособных половых клеток и получения здорового потомства [14, 15]. Репродуктивные клетки перевозят с помощью небольшого, специально разработанного контейнера с парами жидкого азота. Контейнер автономно может поддерживать температуру  $-196^{\circ}\text{C}$  до трёх недель.

В парах жидкого азота долговременно хранятся не только разнообразные клетки и ткани человека и животных, но и образцы семян редких и исчезающих растений [16]. Жидкий азот применяется в банкировании клеток и тканей от пациентов с редкими заболеваниями для длительного хранения и последующего проведения крупномасштабных исследований. Распространено банкирование пуповинной крови в качестве потенциального

источника гемопоэтических стволовых клеток и самих стволовых клеток [17].

**Влияние жидкого азота, сухого льда и температуры хранения на лабораторные показатели биообразцов.** Данные о влиянии жидкого азота и сухого льда на жизнеспособность клеток и лабораторные показатели противоречивы. В биобанке Люксембурга сравнивали влияние сухого льда и жидкого азота на жизнеспособность и качество клеток РМВС и Jukart [3]. Жизнеспособность и тех и других клеток, находившихся в жидком азоте, на порядок выше, чем таких же клеток, подверженных влиянию сухого льда. Авторы утверждают, что оптимальным и экономичным способом транспортировки мононуклеарных клеток, хранящихся в жидком азоте, является транспортировка с помощью сухого льда и криопротектора CryoStor.

Сравнивали влияние температурного режима хранения клеток. Показано, что пролиферация клеток печени, хранящихся без криопротектора в жидком азоте, сильно снижалась при помещении их в морозильную камеру при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  на сутки [18]. Жизнеспособность клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека и нормальных эндотелиальных клеток сонной артерии крупного рогатого скота, хранящихся в течение 8 лет с криопротектором Cell Banker 1 при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ , остаётся такой же, как при хранении в жидком азоте (90%) [19].

Изучено, как использование жидкого азота и хранение в морозильных камерах  $-20^{\circ}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$  может оказывать влияние на коагулогические показатели [20]. Сравнили показатели протромбинового времени (ПТВ), активированного частичного тромбoplastинного времени (АЧТВ), фибриногена в плазме крови от 16 здоровых пациентов при следующих режимах:

- Режим 1. Хранение на  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
- Режим 2. Хранение на  $-20^{\circ}\text{C}$ , предварительная быстрая заморозка в жидком азоте;
- Режим 3. Хранение на  $-70^{\circ}\text{C}$ ;
- Режим 4. Хранение на  $-70^{\circ}\text{C}$ , предварительная заморозка жидким азотом.

Все образцы хранились от 1 до 4 месяцев. При режиме 2 наблюдались наименьшие расхождения с незамороженными свежими образцами в значениях ПТВ и АЧТВ. На показатели ПТВ и АЧТВ сильно влиял способ заморозки. Эти значения увеличены больше всего в образцах, не обработанных жидким азотом и хранящихся при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Наименьшие изменения по сравнению с контролем происходили в образцах с мгновенной заморозкой в жидком азоте перед хранением на температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  (режим 4).

Что касается фибриногена, метод замораживания и хранения, по-видимому, оказывает лишь минимальное влияние на результаты анализа. Различия между свежими и замороженными образцами плазмы крови незначительны, статистически значимые изменения наблюдаются после двух и более месяцев хранения. Различия ниже двух процентов во всех случаях.

Помещение образцов плазмы крови на короткое время в жидкий азот перед хранением на  $-70^{\circ}\text{C}$  или транспортировкой обеспечивает дополнительную стабилизацию некоторых коагулогических параметров.

**Транспортировка с применением сухого льда.** Сухой лёд – твёрдая двуокись углерода ( $\text{CO}_2$ ). В отличие от обычного льда, образующегося при  $0^{\circ}\text{C}$  и ниже, сухой лёд имеет очень низкую температуру ( $-79^{\circ}\text{C}$ ). Су-

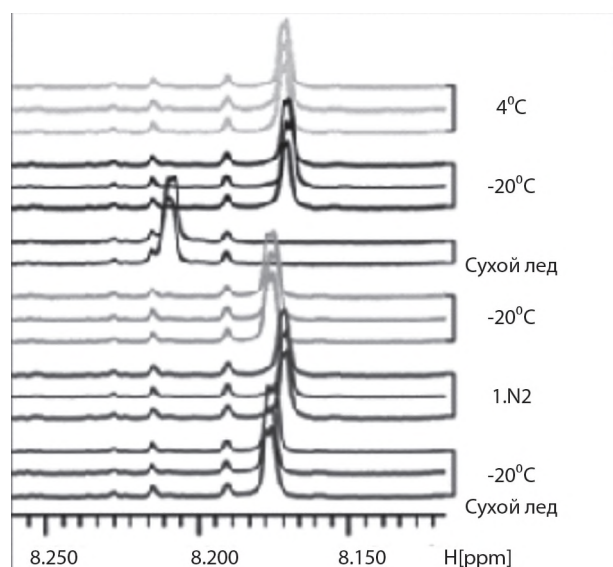


Рис. 1. Зависимость ЯМР спектров от способа хранения [24].

хой лёд не тает, а сублимируется (переходит из твёрдого состояния в газообразное) с выделением  $\text{CO}_2$ . При растворении в воде он понижает pH раствора, образуя углекислоту. Самая распространённая форма использования сухого льда – pellets (цилиндрические стержни диаметрами от 3 до 16 мм) [21].

Работа с сухим льдом должна проводиться с соблюдением всех мер техники безопасности, т. к. сухой лёд – криогенный материал, способный вызывать обморожение, а  $\text{CO}_2$  может замещать воздух в помещении, вызывая удушье.

При сублимации сухого льда с образованием углекислого газа возникает микроокружение с усиленной конвекцией, т. е. направленным движением молекул газа. Этот эффект усиливает теплопередачу к любому веществу, помещенному в такую среду. Результатом является ускоренный прогрев криогенных образцов до температуры сухого льда ( $-78^\circ\text{C}$ ). Это увеличение температур является существенным, если перед транспортировкой образцы хранили в жидком азоте, так как сухой лёд примерно на  $90^\circ\text{C}$  теплее, чем среда хранения паров жидкого азота. Непосредственный контакт стенок криогенных пробирок с сухим льдом вызывает усиленную теплопередачу через прямое столкновение молекул со стенками криопробирки.

**Влияние сухого льда на pH биообразцов.** Сухой лёд меняет pH, понижая его, и делая среду более кислой в образцах плазмы и мочи [22-24]. Предположительно, данное явление вызвано диффузией  $\text{CO}_2$  в образец через плохо закрытые крышки, через полипропилен [22], что ведёт к последующему образованию углекислоты. При температуре ниже  $-40^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  [22] не проникает в образцы; следовательно, диффузия  $\text{CO}_2$  в образцы происходит при их оттаивании после нахождения на сухом льду.

При исследовании влияния воздействия сухого льда на pH получены следующие результаты. Образцы цитратной плазмы от 30 здоровых добровольцев, выдержанные на сухом льду в течение 24 ч непосредственно перед экспериментом, показывали статистически значимо более низкий средний pH (6.13) по сравнению со свежемороженой плазмой (7.16) и образцами, хранящимися на

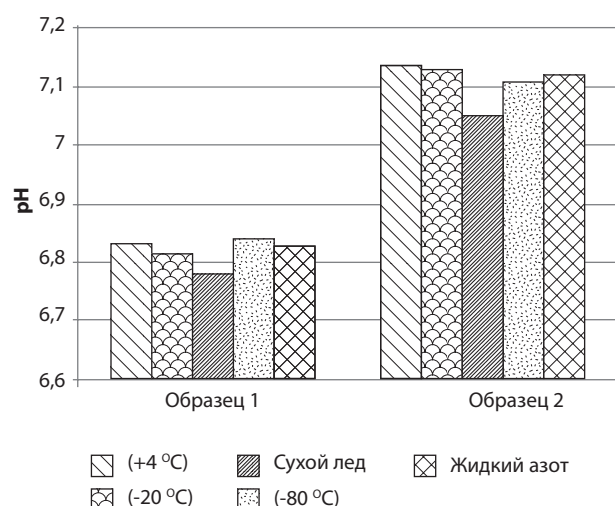


Рис. 2. Зависимость показателя pH от способа хранения [24].

$-20^\circ\text{C}$  (7.42) в течение того же времени. При помещении образцов после сухого льда в морозильную камеру на  $-80^\circ\text{C}$  на 24 ч pH практически восстанавливается до первоначального значения (7.36), нивелируя последствия воздействия сухого льда на образцы плазмы [25].

В раннее опубликованной работе представлены похожие результаты, доказывающие влияние сухого льда на понижение pH плазмы крови [23]. Рассматривались 3 режима хранения цитратной плазмы от 8 здоровых добровольцев.

- Режим 1. хранение на  $-20^\circ\text{C}$  в течение 8 дней перед анализом.
- Режим 2. хранение на  $-20^\circ\text{C}$  в течение 3 дней с последующим хранением в течение суток в пластиковом контейнере с сухим льдом и дальнейшим помещением образцов на  $-20^\circ\text{C}$  на 4 дня.
- Режим 3. хранение в течение 3 сут на  $-20^\circ\text{C}$ , 24 час на сухом льду, 4 дня на  $-80^\circ\text{C}$ .

Нахождение цитратной плазмы в течение суток на сухом льду снижало pH на 1.2 (режим 2 – среднее значение pH – 6,12) по сравнению с  $-20^\circ\text{C}$  (режим 1 среднее значение pH – 7,32). При последующем хранении на  $-80^\circ\text{C}$ , pH возрастало (режим 3 среднее значение pH – 7,42).

Исследовано влияние сухого льда на образцы мочи при помощи метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) [24]. Сравнили спектры ЯМР образцов мочи, подвергнутых воздействию сухого льда, и спектры образцов, замороженных в жидком азоте, при температурах  $-80^\circ\text{C}$ ,  $-20^\circ\text{C}$ ,  $+4^\circ\text{C}$  (контроль) в течение 24 час (рис. 1, 2.) [24]. В спектрах замечены изменения в зависимости от процедуры замораживания, образцы, замороженные на сухом льду, демонстрируют наибольшие сдвиги пиков по сравнению образцами контроля (рис. 1) [24].

Наблюдаемые различия в положении пиков в спектрах ЯМР в большей степени объясняются изменениями кислотности, показатель pH наименьший в образцах, подвергнутых воздействию сухого льда (рис. 2). Подобные результаты связаны с проникновением углекислого газа в образцы и образованием углекислоты, и понижением pH.

Проверено, связано ли проникновение углекислого газа в образцы мочи с использованием полипропиленовых пробирок, которые пропускают многие газообраз-

**Коагулологические параметры в зависимости от режима хранения плазмы крови**

Параметр	Свежая плазма	Плазма, хранящаяся при $-20^{\circ}\text{C}$	Плазма, хранящаяся при $-20^{\circ}\text{C}$ , затем помещённая в сухой лёд на 24 ч	Плазма хранящаяся на $-20^{\circ}\text{C}$ , затем помещённая на сухой лёд на 24 ч, и перед изучением помещённая на $-80^{\circ}\text{C}$ на 24 ч
ПТВ, с	0.96 (0.86-1.14)	0.97 (0.85-1.11)	1.03 (0.88-1.20)	0.98 (0.86-1.11)
АЧТВ, с	31.70 (26.30-37.90)	31.20 (26.90-38.00)	44.85 (30.30-65.60)	31.60 (26.70-38.90)
Фибриноген, г/л	2.76 (1.84-4.51)	2.80 (1.94-4.81)	2.44 (1.60-3.90)	2.74 (1.84-4.66)
С-протеин, %	111.00 (84.00-150.00)	109.50 (87.00-148.00)	100.00 (77.00-137.00)	108.50 (86.00-146.00)
S-протеин, %	104.65 (53.10-133.10)	108.90 (55.90-136.40)	103.80 (55.10-131.10)	106.70 (53.60-132.10)
Антитромбин, %	114 (95-130)	114 (94-131)	112 (97-131)	108 (98-129)

ные вещества. Данную гипотезу проверили, сравнив образцы мочи, алиquotированные в различные полипропиленовые криопробирки, стеклянные флаконы с завинчивающейся крышкой, герметично запечатаны стеклянные трубки.

Образцы хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$  и на сухом льду в течение от 16 ч до 2,5 дней. Спектры ЯМР в образцах, замороженных в полипропиленовых криопробирках на сухом льду демонстрировали существенные отклонения от контрольных ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) и хранящихся в морозильных камерах ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ ), в то время как в образцах, замороженных в стеклянных пробирках с завинчивающимися крышками замечены лишь незначительные изменения, в образцах, замороженных в герметичных стеклянных пробирках практически полностью отсутствовали сдвиги пиков.

Различия в значениях pH между образцами, хранящимися в разных условиях, слабее в стеклянных флаконах с завинчивающимися крышками и отсутствуют в герметичных стеклянных пробирках.

Рекомендовано, чтобы образцы, подвергнутые воздействию сухого льда, оттаивали без крышки на комнатной температуре [23, 25, 26]. Данное действие чревато ошибками при использовании большого количества проб. Вместо этого можно поместить образцы после хранения на сухом льду на температуру  $-80^{\circ}\text{C}$  на 24 ч для предотвращения подкисления и изменения показателей в последующих анализах [25].

**Влияние сухого льда на показатели коагулометрии.** При определённых условиях сухой лёд может менять не только pH, но и некоторые коагулологические показатели биологических образцов.

Показано существенное увеличение протромбинового времени (ПТВ), активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ), уменьшения концентраций фибриногена и протеина С при нахождении образцов плазмы в течение 24 час на сухом льду [25] (табл. 1, [25]).

Если в отношении увеличения ПТВ есть подтверждение в других работах [23], [27] данные в отношении АЧТВ, фибриногена, протеина С существенно расходятся с результатами других авторов, которые не описывают каких-либо существенных изменений в данных показателях при воздействии сухого льда [26]. Не описаны и изменения pH. Существенное значение имеет то, что одни исследователи [25] держали образцы на сухом льду в течение 24 час, в то время как другие [26] только в течение 16 час. Возможно, 16 часов недостаточно для того, чтобы вызвать подкисление образца и статистиче-

ски значимые изменения в коагулологических параметрах. Очевидно время, в течение которого плазма крови подвержена воздействию сухого льда, влияет на pH и коагулологические параметры.

Неизвестно, существует ли связь непосредственно между pH и показателями коагулометрии, но продемонстрировано, что понижение pH с 7.6 до 5 совпадает с увеличением ПТВ и АЧТВ. Активность фибриногена остаётся стабильной при pH в интервале от 7.6 до 6, но начинает падать при pH ниже 6 [27].

Можно рекомендовать транспортировать образцы, предназначенные для проведения коагулологических исследований, при помощи жидкого азота или на сухом льду не более 16 часов. При транспортировке с сухим льдом более 16 ч необходимо обеспечить размораживание биообразцов при комнатной температуре без крышки не менее 10 мин, либо поместить их перед размораживанием на  $-80^{\circ}\text{C}$  на сутки.

**Другие подходы к транспортировке биообразцов.** Одним из широко используемых средств для перевозки биоматериалов являются медицинские термоконтейнеры, в объёме которых поддерживается определенная температура. Линейка термоконтейнеров широкая – от простейших до высокотехнологичных, включая термоконтейнеры, заправляемые жидким азотом и поддерживающие температуру не выше  $-150^{\circ}\text{C}$ , электрические термоконтейнеры, не требующие использования хладоэлементов. Их существенным недостатком является высокая стоимость (табл. 2).

Широко применяются термоконтейнеры с использованием хладоэлементов, которые предварительно помещают в холодильную или морозильную камеру перед укладкой в сумку-холодильник [28].

Задача хладоэлемента – термостатирование изотермической системы, т. е. поглощение или выделение энергии, компенсирующей внешнее воздействие. Накопление термической энергии идёт за счёт фазового перехода вещества (формирование или разрушение кристаллической решетки). Самым распространённым наполнителем для хладоэлементов является вода или гели на основе воды (температура плавления  $0^{\circ}\text{C}$ ). Низкая стоимость и высокая теплота плавления делают хладоэлементы на водной основе крайне эффективными. Укладка замороженных водных хладоэлементов со всех сторон термоконтейнера ведёт к падению внутренней температуры до  $0^{\circ}\text{C}$ .

Хладоэлементы на основе воды неэффективны для создания отрицательных температур. Хладоэлементы с наполнителями, отличными от воды или водных гелей,



Рекомендации по транспортировке биообразцов

Показатель	Жидкий азот (-196 °С)	Сухой лёд (-50...-70 °С)	Высокотехнологичные термоконтейнеры (-150...-25° С)	Сумки-холодильники с хладоэлементами (-25...+8° С)
Достоинства	Обеспечивает наибольшую сохранность биологических образцов	Широко используется при транспортировке при низких температурах. Низкая стоимость. Не требует специальной утилизации. Не обязательна обратная отправка контейнера	Долго сохраняет нужную температуру. Не токсично. Не требует специальной техники безопасности. Многоразовое использование	Не токсично. Не требует специальной техники безопасности. Многоразовое использование. Низкая стоимость
Недостатки	Опасен при использовании. Требует сложного обслуживания и больших финансовых затрат	Класс повышенной опасности из-за обильного выделения CO <sub>2</sub> и низкой температуры. Необходимы меры предосторожности. Может влиять на pH жидких биообразцов (сыворотка/плазма крови, моча) и исказить коагулологические параметры	Высокая стоимость. Подходит только для генетических исследований. Необходимо возвращать контейнер отправителю	Транспортировка при заданной температуре непродолжительное время
Тип биообразца	Клеточные культуры, клетки (соматические, половые), ткани, ранние эмбрионы	Свежезамороженная плазма, сыворотка крови, донорская кровь, некоторые лекарственные препараты	Цельная кровь, форменные элементы крови. ДНК, биологические материалы для генетических исследований, некоторые лекарственные препараты	

содержат вещества с температурой фазового перехода, соответствующей нужному температурному диапазону. Теплота плавления таких наполнителей не выше -30° С [5]. Они могут поддерживать подобный температурный режим более 96 час. Подобные условия транспортировки подходят, когда не требуется более низкий диапазон температур: для образцов цельной крови, лейкоцитарной плёнки, выделенной ДНК, биоматериала для генетических экспериментов, в случаях транспортировки сыворотки для анализа нестабильных биомаркёров, необходимо обеспечить более низкие температуры с помощью сухого льда или жидкого азота.

**Замороженные камни.** В качестве искусственной альтернативы сухому льду могут быть использованы два типа материалов: металлически гранулы камня, широко используемых в банях и саунах (А) и металлические шары, используемых в аквариумах (В). Они могут находиться в морозильной камере при температуре -80° С и сохранять её некоторое время. В эксперименте в качестве испытуемой охлаждаемой жидкости использовалась смесь 50% этанола с водой [30]. Материалы А и В показывали похожие результаты и позволяли охлаждаться раствору несколько быстрее, чем это наблюдалось с сухим льдом. Температура 0° С в растворе достигалась при использовании исследуемых материалов немногим больше 100 сек, при охлаждении сухим льдом – лишь после 150 сек. Более медленное охлаждение с сухим льдом происходит из-за слоя сублимированного CO<sub>2</sub>, который окружает каждую гранулу сухого льда. Поскольку сухой лёд при нагревании претерпевает фазовый переход и дольше удерживает температуру -80° С, он более пригоден для транспортировки, чем подобные криоматериалы [30].

**Выводы.** Наилучшее качество биообразцов обеспечивается с помощью хранения и транспортировки в парах жидкого азота. Это объясняется сверхнизкими температурами замораживания (-196°С) и полным замедлением биохимических процессов в клетках. Перевозка биологических образцов с помощью жидкого азота связана с рядом технологических трудностей и его высокой стоимостью.

Среди рассмотренных способов транспортировки биологических образцов сухой лёд является наиболее

востребованным благодаря дешевизне, возможности удерживать достаточно низкие температуры длительное время. Необходимо учитывать следующие особенности сухого льда. Он влияет на pH жидких биообразцов, в частности, мочи и плазмы крови. Проникновение CO<sub>2</sub> в образец происходит через стенки полипропиленовых пробирок, и при его оттаивании при температуре выше -40° С. Это ведёт к закислению среды биообразцов вследствие образования углекислоты. Изменяется ряд коагулологических показателей (увеличение ПТВ и АЧТВ, снижение уровней протеина С и фибриногена) после нахождения образцов на сухом льду более 16 час в полипропиленовых пробирках. Для восстановления pH биообразцов после длительного контакта с сухим льдом (более 16 ч) необходимо, чтобы образцы размораживались без крышки при комнатной температуре, либо находились при температуре -80°С в течение 24 ч. В случае использования стеклянных пробирок при хранении на сухом льду проникновение CO<sub>2</sub> в биообразцы минимально.

Стабилизирующее влияние на коагулологические показатели оказывает предварительная быстрая 5-минутная заморозка образцов плазмы крови в жидком азоте перед длительной транспортировкой на сухом льду.

Сухой лёд не может обеспечить того качества клеток, которое обеспечивает жидкий азот. Транспортировка некоторых типов клеток при помощи сухого льда в присутствии определённых криопротекторов обеспечивает жизнеспособность клеток, близкую к таковой при хранении в жидком азоте [3, 19].

В ситуациях, когда биологические образцы транспортируются для исследования стабильных биомаркёров, для хранения которых не требуются более низкие температуры, допускается применение аккумуляторов холода (хладоэлементов). Хладоэлементы не являются токсичными, могут быть использованы несколько раз, обладают невысокой стоимостью. В качестве аккумуляторов холода низких температур, близких к температурам сухого льда, могут использоваться замороженные металлические гранулы. Их нельзя использовать при длительных транспортировках, так как они быстро теряют заданную температуру.



**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (2-4, 8-11, 13-15, 18-20, 22-27, 30 см. REFERENCES)

1. Сивакова О.В., Покровская М.С., Ефимова И.А., Мешков А.Н., Метельская В.А., Драпкина О.М. Контроль качества образцов сыворотки и плазмы крови для научных исследований. *Профилактическая медицина*. 2019; 22(5): 91-7.
5. Сайт: Компания ВебПак – URL: <https://webpack.ru/> (дата обращения 27.04.2020).
6. Сайт: Википедия/Жидкий азот – URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Жидкий\\_азот](https://ru.wikipedia.org/wiki/Жидкий_азот) (дата обращения 20.04.2020).
7. Сайт: Институт регенеративной медицины МГУ – URL: <http://irm.msu.ru/subdivisions/cryobank/> (дата обращения 1.05.2020).
12. Сайт: Центр Репродукции и Генетики – URL: <https://www.fertimed.ru/> (дата обращения 15.04.2020).
16. Нестерова С.В., Яшина С.Г. Криоконсервация семян некоторых редких и декоративных растений флоры Дальнего Востока. Биофизика живой клетки. *Криоконсервация генетических ресурсов в проблеме сохранения биоразнообразия*. 1994; 6: 91-3.
17. Сайт: Гемабанк – URL: <https://gemabank.ru/> (дата обращения 10.05.2020).
21. Сайт: Компания Elme Messer – URL: <http://www.elmemesser.ru/> (дата обращения 15.05.2020).
28. Сайт: Термоконтeiner.ру – URL: <https://www.termokonteiner.ru/> (дата обращения 10.05.2020).
29. Сайт: Термологика – URL: <https://termologika.ru/> (дата обращения 10.05.2020).

## REFERENCES

1. Sivakova O. V., Pokrovskaya M. S., Efimova I. A., Meshkov A. N., Metelskaya V. A., Drapkina O. M. Quality control of serum and plasma samples for scientific research. *Profilakticheskaya medicina*. 2019; 22(5): 91-7. (in Russian)
2. Hmel P. J., Kennedy A., Quiles J. G., Gorogias M., Seelbaugh J. P., Morrisette C. R et al. Physical and Thermal Properties of Blood Storage Bags: Implications for Shipping Frozen Components on Dry. *Transfusion*. 2002; 42(7): 836-46.
3. Kofanova O., Davis K., Glazer B., De Souza Y., Kessler J., Betsou F. Viable Mononuclear Cell Stability Study for Implementation in a Proficiency Testing Program: Impact of Shipment Conditions. *Biopreservation and Biobanking*. 2014; 12(3): 206-16.
4. Raspa M., Guan M., Paoletti R., Montoliu L., Ayadi A., Marschall A. Dry ice is a reliable substrate for the distribution of frozen mouse spermatozoa: A multi-centric study. *Theriogenology*. 2017; 96: 49-57.
5. WEB: WebPack Company – URL: <https://webpack.ru/> (last accessed 27.04.2020). (in Russian)
6. WEB: Liquid nitrogen – URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Жидкий\\_азот](https://ru.wikipedia.org/wiki/Жидкий_азот) (last accessed 20.04.2020). (in Russian)
7. WEB: Institute for Regenerative medicine – URL: <http://irm.msu.ru/subdivisions/cryobank/> (last accessed 1.05.2020). (in Russian)
8. Stacey G. N., Day J. G. Putting cells to sleep for future science. *Nature biotechnology*. 2014; 32(4): 320-2.
9. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970; 168: 939-949.
10. Dluska E., Metera A., Markowska-Radomska A., Tudek A. Effective Cryopreservation and Recovery of Living Cells Encapsulated

- in Multiple Emulsions. *Biopreservation and Biobanking*. 2019; 17(5): 468-76.
11. Klebe R. J., Mancuso M. G. Identification of New Cryoprotective Agents for Cultured Mammalian Cells. *In Vitro*. 1983; 19: 167-70.
12. WEB: IVF&Reproductive Genetics Center – URL: <https://www.fertimed.ru/> (last accessed 15.04.2020). (in Russian)
13. Amesse L., Srivastava G., Uddin D., Pfaff-Amesse T. Comparison of Cryopreserved Sperm in Vaporous and Liquid Nitrogen. *The Journal of reproductive medicine*. 2003; 48(5): 319 – 24.
14. Amstislavsky S. Y., Trukshin I. S. Cryobanking mammalian embryos: priorities and the optimal choice of reproductive technologies. *Russian journal of developmental biology*. 2010; 41(1): 13-23.
15. Riggs R., Mayer J., Dowling-Lacey D., Chi T.-F., Jones, E., Oehninger, S. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertility and Sterility*. 2010; 93(1): 109-15.
16. Nesterova S. V., Yashina S. G. Cryopreservation of seeds of some rare plants of the flora of the Far East. *Biophysics of living cell. Cryopreservation of genetic resources in the problem of biodiversity conservation*. 1994; 6: 91-3. (in Russian)
17. WEB: Гемабанк – URL: <https://gemabank.ru/> (last accessed 10.05.2020). (in Russian)
18. Kilbride P., Gonzalez-Molina J., Maurmann N., Mendonça da Silva J., Gibbons S., Selden C., et al. Impact of Storage at -80 °C on Encapsulated Liver Spheroids After Liquid Nitrogen Storage. *Bio-Research Open Access*. 2016; 5(1): 146-54.
19. Miyamoto Y., Ikeuchi M., Noguchi H., Hayashi S. Long-term Cryopreservation of Human and other Mammalian Cells at -80 °C for 8 Years. *Cell Medicine*. 2018; 10: 1-7.
20. Alesci S., Borggreffe M., Dempfle C.-E. Effect of freezing method and storage at -20 °C and -70 °C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels. *Thrombosis Research*. 2009; 124(1): 121-6.
21. WEB: Elme Messer Company – URL: <http://www.elmemesser.ru/> (last accessed 15.05.2020). (in Russian)
22. Murphy B.M., Swarts S., Mueller B.M., Geer P., Manning M.C., Fitchmun M.I. Protein instability following transport or storage on dry ice. *Nature Methods*. 2013; 10(4): 278-9.
23. Odsæter I. H., Lian I. A., Bratberg K., Mikkelsen G. Dry Ice Exposure of Plasma Samples Influences pH and Lupus Anticoagulant Analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2015; 53(5): 809 – 13.
24. Rist M. J. Influence of freezing and storage procedure on human urine samples in NMR-based metabolomics. *Metabolites*. 2013; 3(2): 243-58.
25. Trondsetås L. M., Lian G., Alsos I. The effects of dry ice exposure on plasma pH and coagulation analyses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017; 57(1): 59-64.
26. Gosselin R. C., Honeychurch K., Kang H. J., Dwyre, D. M. (2015). Effects of storage and thawing conditions on coagulation testing. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2015; 37(4): 551-9.
27. Chaimoff C., Creter D., Djaldetti M. The effect of pH on platelet and coagulation factor activities. *American Journal of Surgery*. 1978; 136(2): 257-9.
28. WEB: Термоконтeiner.ru – URL: <https://www.termokonteiner.ru/> (last accessed 10.05.2020). (in Russian)
29. WEB: Термологика – URL: <https://termologika.ru/> (last accessed 10.05.2020). (in Russian)
30. Ismalaj T., Sackett, D. L. An inexpensive replacement for dry ice in the laboratory. *Analytical Biochemistry*. 2015; 474(1): 38-9.

Поступила 20.05.2020

Принята к печати 25.05.2020

## МИКРОБИОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Наумкина Е.В.<sup>1,2</sup>, Куклина Л.В.<sup>1</sup>, Кравченко Е. Н.<sup>1</sup>

### МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВНУТРИУТРОБНЫХ ИНФЕКЦИЙ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», 644099, г. Омск, Россия;

<sup>2</sup>БУЗ Омской области «Городской клинический перинатальный центр», 644007, г. Омск, Россия

*Внутриутробные инфекции (ВУИ) – инфекционные заболевания, при которых инфицирование плода произошло в ante- или интранатальный период, сопровождающиеся клиническими проявлениями. Цель исследования – изучение информативности и диагностической значимости микробиологического метода исследования для этиологической диагностики ВУИ бактериальной этиологии. Проведён ретроспективный (2011-2014 гг.) и проспективный (2015-2019 гг.) анализ результатов микробиологических исследований биоматериалов от родильниц и их новорожденных в 63 случаях ранней неонатальной смертности при установленных диагнозах ВУИ. При исследовании отделяемого цервикального канала, образцов плаценты и околоплодных вод наиболее часто отмечался высеивание коагулазонегативных стафилококков, среди которых доминировал Staphylococcus epidermidis, встречались Staphylococcus hominis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus warneri. Выявлено частое выделение стрептококков группы В из плаценты и околоплодных вод в сравнении с материалом из цервикального канала. Информативность микробиологического исследования материалов от родильницы и новорожденного в плане подтверждения возбудителя и факта его передачи от матери плоду/новорожденному не превышает 30%. Даже при высокой обсеменённости половых путей родильницы, плаценты, околоплодных вод исследование материалов от новорожденного непосредственно после рождения зачастую не позволяет выявить возбудитель, вероятно, в силу низкой степени обсеменения на начальном этапе развития инфекционного процесса. Повышению диагностической ценности микробиологического исследования может способствовать увеличение кратности обследований, количества забираемых образцов; применение приёмов, способствующих повышению чувствительности культурального исследования на этапе выполнения анализа; использование молекулярно-генетических методов, в особенности при исследовании материалов от новорожденных.*

**Ключевые слова:** внутриутробные инфекции; новорожденные; ранняя неонатальная смертность; бактериологическое исследование.

**Для цитирования:** Наумкина Е.В., Куклина Л.В., Кравченко Е.Н. Микробиологическая диагностика внутриутробных инфекций. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 626-631. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-626-631>

Naumkina E.V.<sup>1,2</sup>, Kuklina L.V.<sup>1</sup>, Kravchenko E.N.<sup>1</sup>

### MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF INNERIOTROBIC INFECTIONS

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Omsk State Medical University», 644099, Omsk, Russia;

<sup>2</sup>Budgetary Healthcare Institution of the Omsk Region «City Clinical Perinatal Center», 644007, Omsk, Russia

*Intrauterine infections – infectious diseases in which infection of the fetus occurred in the ante- or intrapartum period, accompanied by clinical manifestations. The purpose of this study was to study the information content and diagnostic significance of the microbiological research method for the etiological diagnosis of intrauterine infections of a bacterial nature. A retrospective (2011-2014) and prospective (2015-2019) analysis of the results of microbiological studies of biomaterials from puerperas and their newborns was carried out in 63 cases of early neonatal mortality with established diagnoses of intrauterine infections. In the study of the separated cervical canal, placenta samples, and amniotic fluid, seeding of coagulase-negative staphylococci was most frequently observed, among which the species Staphylococcus epidermidis dominated, Staphylococcus hominis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus warneri also met. Frequent isolation of group B streptococci from the placenta and amniotic fluid was revealed in comparison with the material from the cervical canal. The information content of the microbiological study of materials from the puerpera and the newborn in terms of confirmation of the pathogen and the fact of its transmission from mother to fetus/newborn does not exceed 30%. Even with high contamination of the genital tract of the puerpera, placenta or amniotic fluid, examination of the materials from the newborn immediately after birth often does not allow to identify the causative agent, probably due to the low degree of contamination at the initial stage of development of the infectious process. An increase in the diagnostic value of microbiological research can be facilitated by an increase in the frequency of examinations, the number of samples taken; the use of techniques to increase the sensitivity of cultural research at the stage of analysis; the use of molecular genetic methods, especially in the study of materials from newborns.*

**Key words:** intrauterine infections; newborns; early neonatal mortality; bacteriological examination.

**For citation:** Naumkina E.V., Kuklina L.V., Kravchenko E.N. Microbiological diagnostics of inneriotrobic infections. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (10): 626-631 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-626-631>

**For correspondence:** Naumkina Elena Vitalevna, Doctor of Medical Sciences, Professor of The Department of Microbiology, Virology and Immunology; Head of Bacteriological Laboratory; e-mail: [evn04@mail.ru](mailto:evn04@mail.ru)

**Information about authors:**

Naumkina E.V., <https://orcid.org/0000-0002-5806-7158>;  
Kuklina L.V., <http://orcid.org/0000-0002-1496-6450>;  
Kravchenko E.N., <http://orcid.org/0000-0001-9481-8812>.

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

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

Received 17.06.2020  
Accepted 20.06.2020

**Введение.** Внутриутробные инфекции (ВУИ) – инфекционные заболевания, при которых инфицирование плода произошло в ante- или интранатальный период. ВУИ сопровождаются клиническими проявлениями, это динамический процесс, развивающийся в организме в результате внедрения в него микроорганизма [1-3].

ВУИ играют ведущую роль в значимой антенатальной патологии, приводящей к увеличению перинатальной смертности и заболеваемости новорожденных [4]: мертворождения, фетоплацентарная недостаточность, невынашивание, инфекционные заболевания, задержка и аномалии развития плода.

ВУИ являются основной причиной перинатальной смертности у доношенных плодов, составляя 19,9% общего числа причин (врожденная пневмония: P23 – 8,2%; инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода: P35-39 – 11,7%) [5].

В 2016 г. по данным Минздрава Российской Федерации ведущей причиной ранней неонатальной смерти явились врожденные пороки развития и хромосомные аномалии (составили 40,19 на 100 тыс. родившихся живыми); на 2-м и 3-м месте – дыхательные расстройства новорожденного (34,79), геморрагические (гематологические) нарушения у новорожденных (33,09); инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода и врожденная пневмония составили 30,18 и 19,06 соответственно [6].

Большие трудности возникают при дифференциальной диагностике ВУИ и гнойно-септических инфекций (ГСИ) у новорожденных. При проведении анализа заболеваемости в информационном бюллетене инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП) за 2017 г. в Уральском и Сибирском Федеральных округах, число случаев ВУИ в 4,7 раза превысило число случаев ГСИ: в УФО соотношение ВУИ/ГСИ составило 3,4, в СФО – 6,4. Наибольшие значения соотношения числа случаев ВУИ/ГСИ регистрировались в Красноярском крае (49,5), ХМАО (36,5), Новосибирской (31,4) и Кемеровской (22,1) областях, в Алтайском крае (15,8), наименьшие – в Томской (0,3), Курганской (0,4), Омской (0,6), Свердловской (1,6) областях [7]. Учитывая такие неоднозначные показатели частоты ВУИ и ГСИ можно предположить в одних случаях гипердиагностику ВУИ, в других случаях гипердиагностику ГСИ и недостаточную диагностику ВУИ.

Значимость проблемы ВУИ обусловлена широким спектром патогенов и высокой частотой инфицирования населения, возможностью длительной персистенции возбудителей в организме [8].

По данным литературы, преобладающими возбудителями антенатальных ВУИ считаются микоплазмы и вирусы (цитомегаловирус, простого герпеса, краснухи, энтеровирусы, гриппа, вирус Эпштейн-Барра и др.),

интранатальных – бактерии (хламидии, стрептококки группы В (*Streptococcus agalactiae*), *Eshcherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp. и др.). Ведущими причинами ВУИ являются вирусно-бактериальные, вирусные, бактериальные, бактериально-грибковые и др. ассоциации [9,10].

Анализ данных литературы о соответствии полученных результатов лабораторных исследований диагнозу внутриутробные инфекции показывает, что среди выделенных возбудителей лишь 32,1% можно отнести к TORCH-агентам. В структуре возбудителей 11,5% составляют вирусы (простого герпеса, ЦМВ), 13,6% – токсоплазма, уреоплазма, микоплазма, бледная трепонема, гонококк, 3,6% – грибы рода *Candida*. У 7% новорожденных выделяется стрептококк группы В (*Streptococcus agalactiae*) [11-13].

Сложности диагностики ВУИ, их клинко-этиологическое разнообразие, особенности эпидемического процесса, особые подходы к выбору методов диагностики инфекций, вызванных вирусами и бактериями, эпидемиологическому надзору требуют углубленного рассмотрения этой проблемы.

Цель исследования – изучение информативности и диагностической значимости микробиологического метода исследования для этиологической диагностики ВУИ бактериальной этиологии.

**Материал и методы.** Проведён ретроспективный (2011-2014 гг.) и проспективный (2015-2019 гг.) анализ результатов микробиологических исследований биоматериалов от родильниц и новорожденных в 63 случаях ранней неонатальной смертности при установленных диагнозах ВУИ за период 2011-2019 гг. по материалам бактериологической лаборатории БУЗОО ГКПЦ.

Проанализированы результаты микробиологических исследований различного биоматериала (цервикального канала, околоплодных вод, плаценты, мочи беременной и новорожденного, трахеобронхиального смыва и крови новорожденного), поступившего в лабораторию клинической микробиологии в течение беременности, родов, в послеродовом периоде от женщин и новорожденных.

Исследование проводилось в соответствии со стандартными операционными процедурами, действующими в лаборатории, разработанными на основе существующей нормативно-методической документации. Посев биоматериала проводили на набор питательных сред, соответствующих предполагаемому спектру возбудителей, инкубировали аэробно, в капнофильной атмосфере, при необходимости анаэробно (GazPac). Идентификацию проводили с использованием оптимального в каждом случае набора доступных методов (классические биохимические тесты, хромогенные среды, иммуносерологические методы, автоматизированная идентификация с использованием Phoenix-100, масс-спектрометрия Vitec-MS MAL-



DI-ToF). Антибиотикорезистентность клинических изолятов определяли диско-диффузионным методом с оценкой результатов в соответствии с критериями EUCAST 2019 (Adagio). В ряде случаев определяли минимальные ингибирующие концентрации с помощью E-тестов или автоматизированным методом (Phoenix-100).

Окончательный диагноз ВУИ выставлялся на основании результатов патологоанатомических вскрытий с последующим гистологическим исследованием тканей трупа, гистологическим исследованием последа, проводилась верификация инфекции посредством бактериологических исследований и ПЦР диагностики.

**Результаты.** Всего проанализировано 63 случая ранней неонатальной смертности, основной причиной которой являлись инфекционные болезни, специфичные для перинатального периода (P35-P39). Средний возраст матерей составил  $28,9 \pm 5,4$  лет. Осложнённый акушерско-гинекологический анамнез выявлен у 52 (82,5%) пациенток, из них аборт – у 19 (30,1%), невынашивание беременности и преждевременные роды в анамнезе – у 27 (42,8%), хронические воспалительные заболевания гениталий – у 14 (22,2%), гинекологические невоспалительные заболевания – у 10 (15,9%). Из осложнений беременности наиболее часто встречалась угроза прерывания беременности – у 28 (44,4%) пациенток, истмико-цервикальная недостаточность диагностирована у 16 (25,4%) наблюдаемых, ОРЗ во время беременности перенесли 14 (22,2%) женщин. Признаки ВУИ по УЗИ обнаружены у 34 (54%) беременных исследуемой группы, чаще всего наблюдалось многоводие – у 22 (34,9%),

утолщение плаценты и маловодие – по 6 (9,5%) случаев, гиперэхогенный кишечник, гепатомегалия и водянка плода по 2 (3,2%) наблюдений. Чаще всего признаки ВУИ по УЗИ выявлялись с 20-й по 28-ю нед – в 29 (85,3%) случаях, с 29 по 36 нед – у 5 (14,7%) пациенток. В 12 (19%) случаях при УЗИ регистрировалось нарушение плодово-плацентарного и маточно-плацентарного кровотока. Роды в срок произошли у 11 (17,5%) пациенток, сверхранные преждевременные роды – у 28 (44,4%) беременных, преждевременные роды при беременности в 28-36 нед регистрировались у 24 (38,1%) женщин. Часто у новорожденных с инфекционными болезнями, специфичными для перинатального периода встречались врождённые пороки развития плода в 9 (23,8%) случаях: пороки сердечно-сосудистой системы выявлены в 5 (7,9%) случаях, лёгких – у 2 (3,2%), ЦНС и мочевыводящей системы – по 1 (1,6%) случаю, неиммунная водянка выявлена у 4 (6,3%) новорожденных.

Всего во время наблюдения в стационаре перинатального центра проведено 372 исследования различных видов биоматериала в 97% проанализированных случаев РНС. Параллельное обследование родильницы и новорожденного проведено лишь в 66% случаев; в 17% случаев обследована только женщина; в 14% – только новорожденный.

Основной биоматериал при обследовании родильниц – отделяемое цервикального канала (62 случая), плацента (35 случаев), околоплодные воды (8), моча (12). Результаты микробиологических исследований представлены на рис. 1, а-в.

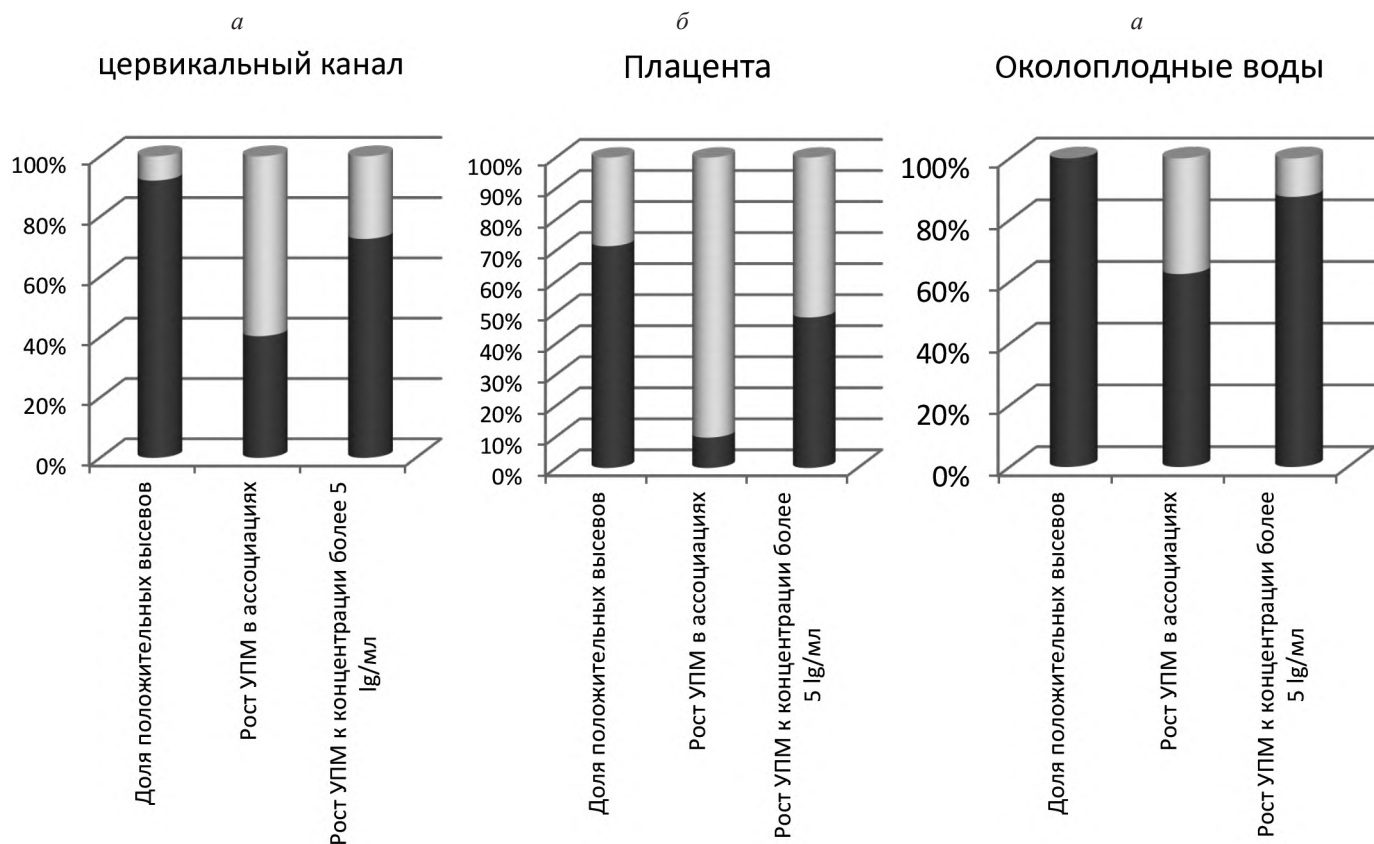


Рис. 1. Микрофлора половых путей.



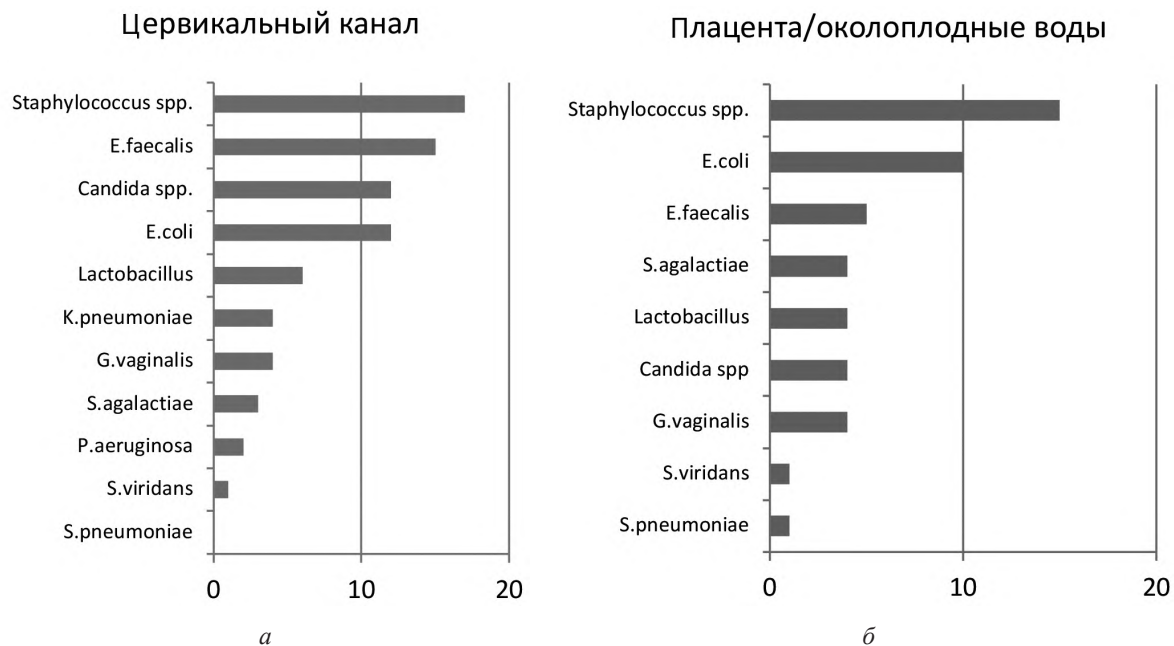


Рис. 2. Спектр микроорганизмов, выделенных из половых путей.

Доля положительных высевов при исследовании отделяемого цервикального канала составила 92%, при этом в 73% отмечался высев условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в клинически значимых концентрациях более  $10^5$  КОЕ/мл. В значительном числе случаев УПМ высевались в ассоциациях из 2 и более видов (40% случаев).

Высокая степень обсеменённости характерна для околоплодных вод – 100% положительных результатов, причём в 86% случаев УПМ в клинически значимых концентрациях и в 63% случаев – в составе ассоциаций.

При исследовании плаценты доля положительных результатов составила 71%, чаще всего УПМ выделялись в монокультуре в невысоких концентрациях.

Спектр выделенных микроорганизмов из образцов биоматериала от родильниц представлен на рис 2, а, б.

При исследовании отделяемого цервикального канала и образцов плаценты/околоплодных вод наиболее часто отмечался высев коагулазонегативных стафилококков (КОС), среди которых доминировал *Staphylococcus epidermidis*, встречались *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*. Далее по частоте встречаемости следуют *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* (доминирует *E. faecalis*), *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*), *Streptococcus agalactiae*. В ряде случаев отмечался высев представителей нормальной микрофлоры (*Lactobacillus spp.*, *Streptococcus viridians group*), *Gardnerella vaginalis*, других УПМ (*Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*)

Спектр микроорганизмов, выделенных из различных биоматериалов, сходен. Обращает на себя внимание более частое выделение стрептококков группы В из плаценты и околоплодных вод в сравнении с материалом из цервикального канала.

Несмотря на сходство спектра выделенных возбудителей в целом, полное или частичное совпадение видового состава возбудителей при параллельном исследовании образцов из цервикального канала и плаценты/околоплодных вод отмечалось лишь в 29% случаев.

При анализе результатов микробиологического исследования образцов с кожи подмышечной впадины новорожденных, взятых непосредственно после родов, доля положительных высевов составила 57%, в большинстве случаев отмечался рост УПМ в незначительных концентрациях –  $10^1$ - $10^2$  КОЕ/мл в монокультуре (рис. 3, а, б).

Исследование образцов трахеобронхиальных смывов оказалось информативным менее чем в половине случаев, при этом подавляющее большинство положительных образцов содержали возбудитель в минимальной концентрации (рис 4, а).

Спектр микроорганизмов, выделенных из биоматериала от новорожденных, представлен на рис. 3, б, 4, б.

Наиболее часто из всех изученных биоматериалов выделялись КОС: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*. Часто высевались *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*), *S. agalactiae*. В единичных случаях отмечался высев *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*.

Оказалась относительно высокой высеваемость при исследовании образцов крови – в 38% случаев отмечался рост микроорганизмов. Превалировали также коагулазонегативные стафилококки, *A. baumannii*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *Candida spp.*

Несмотря на явное сходство видового состава возбудителей, выделенных из различных биологических локусов родильниц и новорожденных, анализ случаев совпадения результатов обследования матери и новорожденного выявил полное или частичное совпадение видового состава возбудителей лишь в 26% случаев для пары цервикальный канал – материал от новорожденного и 29% для пары плацента/околоплодные воды – материал от новорожденного. Отрицательные результаты посевов материала от новорожденных отмечались даже в тех случаях, когда обсеменённость родовых путей матери была высокой.

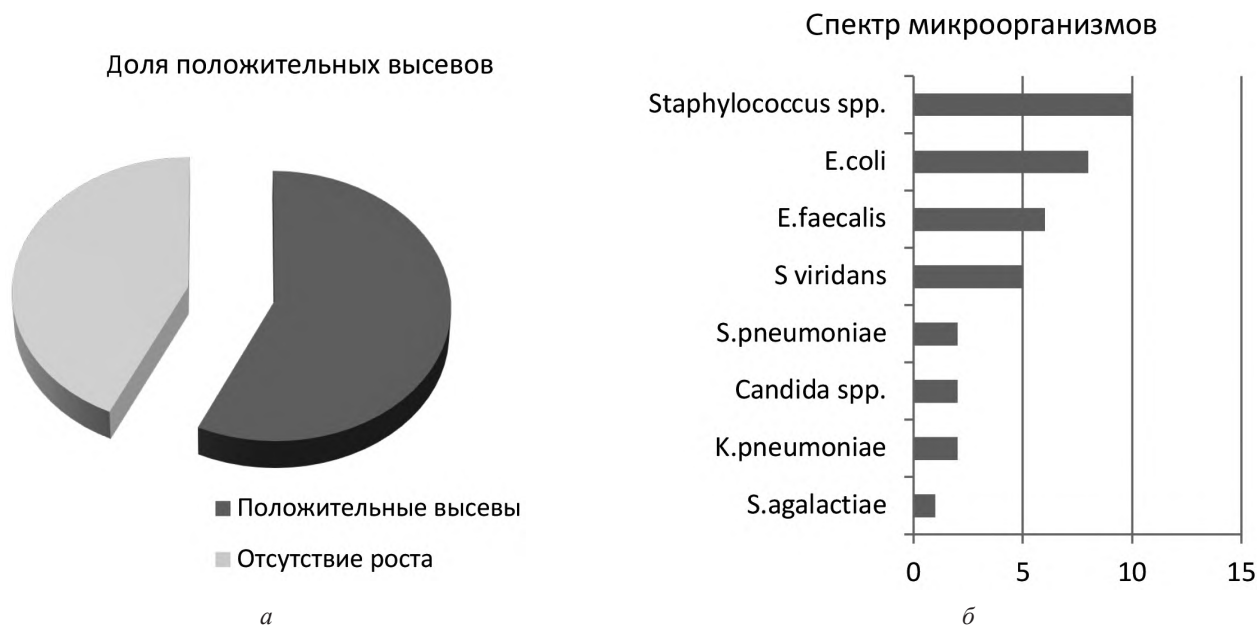


Рис. 3. Микрофлора кожи подмышечной впадины новорожденных.

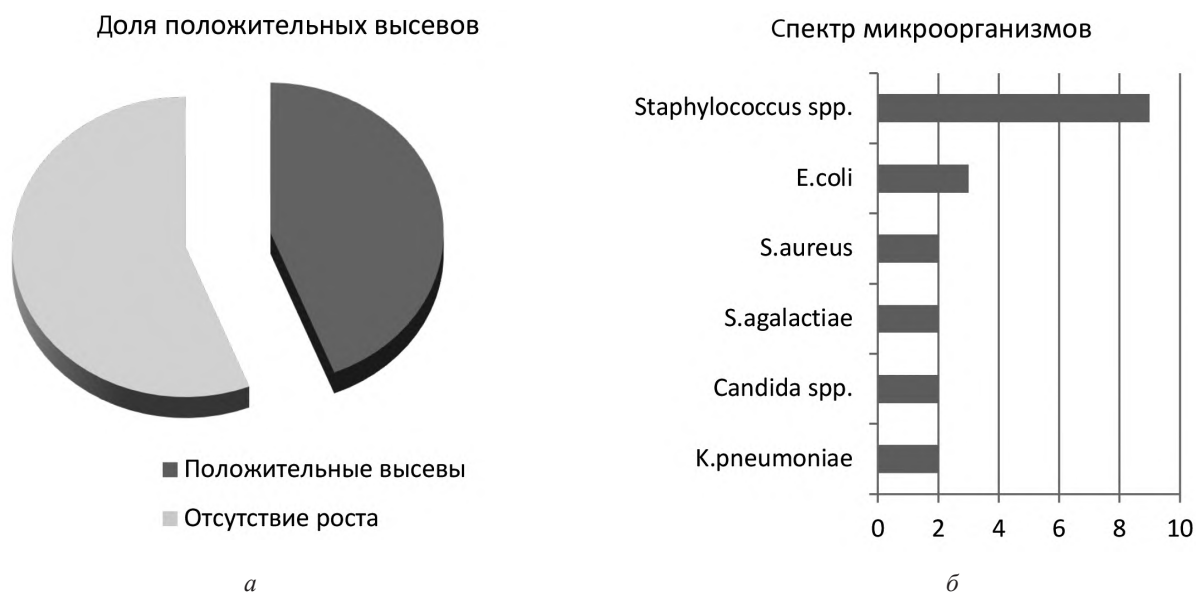


Рис. 4. Микрофлора трахеобронхиальных смывов новорожденных.

**Заключение.** Микробиологическое исследование материалов от родильницы и новорожденного является одним из инструментов этиологической диагностики ВУИ бактериальной этиологии, однако информативность его в плане подтверждения возбудителя и факта его передачи от матери плоду/новорожденному не превышает 30%.

Выявление УППМ, в особенности в ассоциациях и в высокой концентрации из половых путей родильниц даже при отрицательных результатах обследования новорожденных, является косвенным подтверждением наличия бактериальной ВУИ при наличии факторов риска/клинических признаков у новорожденного.

Спектр выявляемых при рутинном обследовании бактериальных патогенов ВУИ включает КОС, *E. coli*,

других представителей семейства энтеробактерий, стрептококки группы В, реже – других групп, грибы рода *Candida* в монокультуре и ассоциациях.

Даже при высокой обсеменённости половых путей родильницы, плаценты, околоплодных вод, обследование материалов от новорожденного непосредственно после рождения зачастую не позволяет выявить возбудитель, вероятно, в силу низкой степени обсеменения на начальном этапе развития инфекционного процесса.

Повышению диагностической ценности микробиологического исследования может способствовать увеличение кратности обследований, количества забираемых образцов; применение приёмов, способствующих повышению чувствительности культурального исследования

на этапе выполнения анализа; использование молекулярно-генетических методов, в особенности при исследовании материалов от новорожденных.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Володин Н.Н., ред. Протоколы диагностики, лечения и профилактики внутриутробных инфекций у новорожденных детей. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2002.
2. Воробьев А.А., ред. Микробиология и иммунология. М.: Медицина; 2005.
3. Воробьев А.А., ред. Учение об инфекции. М.: Издательский дом «Русский врач», 2000.
4. Кузьмин В.Н., Адамян Л.В. Проблема внутриутробной инфекции в современном акушерстве. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2017; 3(20): 32-6.
5. Куклина Л.В., Кравченко Е.Н. Роль внутриутробной инфекции в перинатальной смертности. *Здравоохранение Российской Федерации.* 2019; 63(5): 245-50. DOI: 10.18821/0044-197X-2019-63-5-245-250.
6. Медико-демографические показатели Российской Федерации в 2016 году. Статистический справочник. М.: Минздрав России, 2017.
7. Марченко А.Н., Кузнецова О.М. Эпидемиология внутриутробных инфекций у новорожденных (обзорная статья). *Медицинская наука и образование Урала.* 2019; 20(4): 197-9.
8. Перепелица С.А. Этиологические и патогенетические перинатальные факторы развития внутриутробных инфекций у новорожденных (обзор). *Общая реаниматология.* 2018; 14(3): 54-67. DOI: 10.15360/1813-9779-2018-3-54-67.
9. Буданов П.В. Патогенетические, иммунологические и клинические цели лечения урогенитальных инфекций во время беременности. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* 2018; 17(4): 77-87. DOI: 10.20953/1726-1678-2018-4-77-87.
10. Наумкина Е.В., Матушенко Е.В., Пахалкова Е.В. Бактериально-вирусные ассоциации при дисбиозах вагинального биотопа. *Бактериология.* 2019; 4(3): 49-53. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-3-49-52.
11. Косенчук В.В., Рыбалкина Т.Н., Бошьян Р.Е., Каражас Н.В., Корниенко М.Н., Веселовский П.А., и др. Роль возбудителей оппортунистических инфекций как этиологических агентов внутриутробных инфекций. *Детские инфекции.* 2019; 18(3): 17-24. DOI: 10.22627/2072-8107-2019-18-3-17-24.
12. Смирнова С.С., Голубкова А.А., Алимов А.В., Акимкин В.Г. Внутриутробные инфекции новорожденных как маркер эпидемиологического неблагополучия в учреждениях родовспоможения. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2019; 18 (5): 42-9. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-42-49.
13. Наумкина Е.В., Абросимова О.А., Пахалкова Е.В., Рогатых Н.А., Миронов А.Ю. Инфекции, вызванные стрептококком серогруппы В у беременных, родильниц и новорожденных. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 2: 107-10. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-2-107-110.

#### REFERENCES

1. Volodin N.N., ed. Protocols for the diagnosis, treatment and prevention of intrauterine infections in newborns [Protokoly diagnostiki, lecheniya i profilaktiki vnutriutrobnnyh infektsiy u novorozhdennyh detej]. Moscow: GOU VUNMCz MZ RF; 2002. (in Russian)
2. Vorob'yov A.A., ed. Microbiology and immunology [Mikrobiologiya i immunologiya]. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
3. Vorob'ev A.A., ed. The doctrine of infection [Ucheniye ob infektsii]. Moscow: Izdatel'skiy dom «Russkiy vrach», 2000. (in Russian)
4. Kuz'min V.N., Adamyan L.V. The problem of intrauterine infection in modern obstetrics. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2017; 3(20): 32-6. (in Russian)
5. Kuklina L.V., Kravchenko E.N. The role of intrauterine infection in perinatal mortality. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii.* 2019; 63(5): 245-50. (in Russian)
6. Medical and demographic indicators of the Russian Federation in 2016. [Mediko-demograficheskie pokazateli Rossiyskoy Federatsii v 2016 godu. Statisticheskiy spravochnik]. Moscow: Minzdrav Rossii; 2017. (in Russian)
7. Marchenko A.N., Kuznetsova O.M. Epidemiology of intrauterine infections in newborns (review article). *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala.* 2019; 20(4): 197-9. (in Russian)
8. Perepelitsa S.A. Etiological and pathogenetic perinatal factors of intrauterine infections in newborns (review). *Obshchaya reanimatologiya.* 2018; 14(3): 54-67. (in Russian)
9. Budanov P.V. Pathogenetic, immunological and clinical goals of treatment of urogenital infections during pregnancy. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii.* 2018; 17(4): 77-87. (in Russian)
10. Naumkina E.V., Matushchenko E.V., Pahalkova E.V. Bacterial-viral associations in dysbiosis of the vaginal biotope. *Bakteriologiya.* 2019; 4(3): 49-53. (in Russian)
11. Kosenchuk V.V., Rybalkina T.N., Bosh'yan R.E., Karazhas N.V., Kornienko M.N., Veselovskiy P.A. et al. The Role of pathogens of opportunistic infections as etiological agents of intrauterine infections. *Detские infektsii.* 2019; 18(3): 17-24. (in Russian)
12. Smirnova S. S., Golubkova A. A., Alimov A. V., Akimkin V. G. Intrauterine infections of newborns as a marker of epidemic distress in maternity institutions. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika.* 2019; 18 (5): 42-9. [https://doi: 10.31631/2073-3046-2019-18-5-42-49](https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-5-42-49). (in Russian)
13. Naumkina E. V., Abrosimova O. A., Pakhalkova E. V., Rogatykh N. A., Mironov A. Yu. Infections caused by Streptococcus serogroup B in pregnant women, maternity hospitals and newborns. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 2: 107-10. (in Russian)

Поступила 17.06.20

Принята к печати 20.06.20

Давидович Н.В., Галиева А.С., Давыдова Н.Г., Малыгина О.Г., Кукалевская Н.Н., Симонова Г.В., Бажукова Т.А.

## СПЕКТР И ДЕТЕРМИНАНТЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ОРАЛЬНЫХ СТРЕПТОКОККОВ

ФГБОУ ВО Северный государственный медицинский университет Минздрава РФ, 163000, г. Архангельск, Россия

*Профили чувствительности оральных стрептококков к антибактериальным препаратам могут отражать информацию о наличии у макроорганизма множества детерминант резистентности. Целью работы являлось выделение спектра оральных стрептококков из микробиоты ротовой полости пациентов и оценка их чувствительности к широкому перечню антибиотиков. Всего 342 микробных стрептококковых изолята были выделены из образцов слюны и отделяемого зубодесневого кармана и протестированы на антибиотикочувствительность. Видовая идентификация стрептококков проводилась с использованием биохимических тест-систем API. Оценка антибиотикорезистентности выполнялась с помощью E-тестов. Для выявления носительства генов устойчивости к тетрациклинам и макролидам применялся метод ПЦР в режиме реального времени. В ходе исследования было идентифицировано шесть видов оральных стрептококков: *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. anginosus* и *S. mutans*. Все стрептококки были чувствительны к линезолиду и меропенему. Доля пенициллин-резистентных стрептококков в подгруппе *S. oralis/mitis/mutans* составила 47,8% против 23,5% в подгруппе *S. salivarius/sanguinis/anginosus* ( $p=0,020$ ). Выявлялись значимые уровни резистентности к макролидам (эритромицин) – 47,9%, тетрациклинам (тетрациклин) – 44,4% и хинолонам (офлоксацин) – 41%. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) была выявлена у 31,9% изолятов оральных стрептококков, доминировало сочетание устойчивости к эритромицину, тетрациклину и офлоксацину у 79 изолятов (23,1%). Наиболее распространенными генотипами устойчивости оральных стрептококков к макролидам и тетрациклину у 127 стрептококковых изолятов, проявляющих сочетанную устойчивость, были *ermB-mefE+* и *tetM+tetQ-* соответственно. Таким образом, в структуре антибиотикорезистентных оральных стрептококков преобладали стрептококки группы *S. oralis/mitis/mutans*, проявляя в том числе МЛУ. Так, находясь в одном из самых густонаселенных биотопов макроорганизма, оральные стрептококки могут являться посредниками для переноса детерминант резистентности более патогенным и клинически-значимым микроорганизмам, в связи с чем необходим тщательный мониторинг за уровнем их восприимчивости к антимикробным препаратам.*

**Ключевые слова:** микробиота полости рта, оральные стрептококки, профили чувствительности, детерминанты антибиотикорезистентности.

**Для цитирования:** Давидович Н.В., Галиева А.С., Давыдова Н.Г., Малыгина О.Г., Кукалевская Н.Н., Симонова Г.В., Бажукова Т.А. Спектр и детерминанты резистентности клинических изолятов оральных стрептококков. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 632-637. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-632-637>

*Davidovich N.V., Galieva A.S., Davydova N.G., Malygina O.G., Kukalevskaya N.N., Simonova G.V., Bazhukova T.A.*

SPECTRUM AND RESISTANCE DETERMINANTS OF ORAL STREPTOCOCCI CLINICAL ISOLATES

FSBEI HE Northern State Medical University (Arkhangelsk) of the Ministry of Health of the Russian Federation, 163000, Arkhangelsk, Russia

*The profiles of oral streptococci sensitivity to antibacterial drugs may reflect information about the presence of macroorganism resistance determinants. The aim of the work was to isolate the spectrum of oral streptococci from the microbiota of the oral cavity of patients and to determine their sensitivity to a wide range of antibiotics. A total of 342 microbial streptococcal isolates were isolated from saliva samples and a periodontal pocket and tested for antibiotic sensitivity. Species identification of streptococci was carried out using biochemical API test systems. Evaluation of antibiotic resistance was performed using E-tests. Real-time PCR was used to identify the presence of tetracycline and macrolide resistance genes. The study identified six types of oral streptococci: *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. anginosus* and *S. mutans*. All streptococci were sensitive to linezolid and meropenem. The proportion of penicillin-resistant streptococci in the subgroup *S. oralis / mitis / mutans* was 47,8% versus 23,5% in the subgroup *S. salivarius / sanguinis / anginosus* ( $p = 0.020$ ). Significant levels of resistance were revealed to macrolides (erythromycin) – 47,9%, tetracyclines (tetracycline) – 44,4% and quinolones (ofloxacin) – 41%. Multiple drug resistance (MDR) was detected in 31,9% of oral streptococcal isolates, a combination of erythromycin, tetracycline and ofloxacin resistance was prevalent in 79 isolates (23,1%). The most common genotypes of macrolides and tetracycline resistant oral streptococci (in 127 streptococcal isolates with combined resistance) were *ermB-mefE+* and *tetM+tetQ-*, respectively.*

*Thus, *S. oralis / mitis / mutans* group streptococci predominated in the structure of antibiotic-resistant oral streptococci, including MDR. So, being in one of the most densely populated biotopes of a macroorganism, oral streptococci can mediate the transfer of resistance determinants to more pathogenic and clinically significant microorganisms, which requires careful monitoring of their level of susceptibility to antimicrobial agents.*

**Key words:** oral microbiota, oral streptococci, sensitivity profiles, determinants of antibiotic resistance.

**For citation:** Davidovich N.V., Galieva A.S., Davydova N.G., Malygina O.G., Kukalevskaya N.N., Simonova G.V., Bazhukova T.A. Spectrum and resistance determinants of oral streptococci clinical isolates. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (10): 632-637 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-632-637>

**For correspondence:** Davidovich Nataliia Valerievna, candidate of medical sciences, associate professor of the Department of Clinical Biochemistry, Microbiology and Laboratory Diagnostics; e-mail: [nvdavidovich@gmail.com](mailto:nvdavidovich@gmail.com)



**Information about authors:**

Davidovich N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6414-9870>;  
Galieva A.S., <http://orcid.org/0000-0002-7037-7730>;  
Davydova N.G., <http://orcid.org/0000-0002-0700-4261>;  
Malygina O.G., <http://orcid.org/0000-0002-3822-796X>;  
Kukalevskaya N.N., <https://orcid.org/0000-0003-3371-1485>;  
Simonova G.V., <http://orcid.org/0000-0003-4041-7217>;  
Bazhukova T.A., <https://orcid.org/0000-0002-7890-2341>.

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

**Acknowledgment.** *The study is supported by the project «Norwegian-Russian network in antimicrobial stewardship in dental practice in the Circumpolar Region» (project leader – associate professor of Department of Clinical Dentistry, Arctic University in Tromsø, PhD, FHEA Mohammed A. Haroni).*

Received 13.03.2020  
Accepted 15.05.2020

**Введение.** Представители рода *Streptococcus* «viridans» (оральные стрептококки) являются одними из основных комменсальных микроорганизмов, колонизирующих верхние дыхательные пути, превалируя в микробиоте ротовой полости [1]. Оральные стрептококки, в среднем, составляют 28% микроорганизмов, выделенных из зубного налета, 29% из десневой борозды, 45% с корня языка и 46% из слюны [2]. Видовое распределение стрептококков по биотопам полости рта представлено следующим образом: *S. salivarius* на корне языка, *S. mitis* на слизистой оболочке щек, *S. oralis* в слюне, *S. mutans* и *S. sanguinis* на поверхности зубов [3, 4].

Факторы агрессии оральных стрептококков – внеклеточные полисахариды, особенно декстран, играют важную роль в адгезии и инвазии, приводя к развитию тяжелых инфекций, в том числе инфекционного эндокардита, пневмонии, инфекционно-токсического шока (преимущественно у иммунокомпрометированных лиц) [5]. Кроме того, некоторые виды стрептококков группы «viridans», такие как *S. mutans*, имеют высокую ассоциированность с развитием кариеса. Данный микроорганизм в раннем возрасте передается от матери к ребенку вертикальным или горизонтальным путем. Лабораторные эксперименты демонстрируют, что кариес у животных развивается только после заселения безмикробной полости *S. mutans* и только в присутствии сахарозы. Кариогенные свойства *S. mutans* связаны с его способностью к адгезии и выработке кислоты из пищевых сахаров [6].

В последнее время внимание исследователей сосредоточено на изучении важнейших предпосылок появления и распространения антибиотикорезистентности в том числе среди микроорганизмов полости рта [7]. Хотя оральные стрептококки изначально считались чувствительными к пенициллину, уже с 1962 г. появились первые сообщения о штаммах, проявляющих к нему резистентность при исследовании десневой микрофлоры пациентов, получавших профилактику пенициллином при ревматической лихорадке [8]. В последние годы регистрировались высокие уровни резистентности оральных стрептококков к пенициллину и другим бета-лактамам антибиотикам, а также к макролидам, тетрациклинам и аминогликозидам, в то время как к устойчивым к хлорамфениколу и ванкомицину были отнесены лишь редкие изоляты [9].

Важнейшим триггером к распространению генов резистентности является способность оральных стрептококков обмениваться генетическим материалом с другими бактериями, колонизирующими те же или иные

биотопы организма [10]. В свою очередь, профили резистентности стрептококков группы «viridans» могут являться маркерами чувствительности близкородственных бактерий к различным классам антибактериальных препаратов. Поэтому, целью нашего исследования стало выявление оральных стрептококков из микробиоты ротовой полости пациентов и оценка их чувствительности к широкому спектру антибиотиков.

**Материал и методы.** Всего 342 микробных стрептококковых изолята были выделены и протестированы на антибиотикочувствительность в ходе исследования образцов слюны и отделяемого зубодесневого кармана 91 пациента в возрасте от 29 до 52 лет (из которых 29% мужчин и 71% женщин), в последние три месяца не осуществлявших прием антибактериальных препаратов. Взятие биологического материала проводилось при первичном посещении стоматолога. От каждого пациента было получено добровольное информированное согласие.

Образцы слюны в объеме 1,0 мл были забраны у всех обследованных после предварительного полоскания рта физиологическим раствором в пробирки типа «Эппендорф» объемом 2,0 мл. Взятие материала из зубодесневого кармана осуществлялось с помощью бумажного эндодонтического штифта, который помещали в зубодесневую борозду или карман на 30 секунд для сорбции жидкой части, а затем переносили в пробирку типа «Эппендорф» с транспортной средой Стюарта (Pronadisa, Conda, Испания) в объеме 0,5 мл. Доставка материала в лабораторию осуществлялась в термоконтейнере в течение 1-2 часов.

Микробиологические методы включали идентификацию оральных стрептококков в соответствии со стандартными методиками [11, 12], включающими определение культуральных и морфологических свойств колоний, выросших на колумбийском кровяном агаре с добавлением селективной стрептококковой добавки (HiMedia Laboratories, Индия). Видовая биохимическая дифференцировка стрептококков группы viridans была проведена с помощью набора для идентификации Streptococcaceae и родственных микроорганизмов API 20 Strep (BioMérieux, Франция).

Чувствительность выделенных стрептококков определяли к широкому спектру антибактериальных препаратов: пенициллин (P), цефотаксим (CTX), цефтриаксон (CRO), меропенем (MEP), эритромицин (E), тетрациклин (TE), клиндамицин (CD), офлоксацин (OFX), триметоприм-сульфаметоксазол (SXT), линезолид (LNZ), с помощью E-тестов (The Liofilchem MIC Test Strips, Ита-

**Видовое разнообразие стрептококков, выделенных из двух биотопов полости рта**

Вид орального стрептококка	Количество выделенных изолятов по биотопам (доля от общего числа выделенных стрептококков)		Всего выделено изолятов (доля от общего числа выделенных стрептококков) (n=342)
	Слюна (n=217)	Отделяемое ЗДК (n=125)	
<i>S. oralis</i>	62 (18,13%)	14 (4,09%)	76 (22,22%)
<i>S. salivarius</i>	56 (16,37%)	18 (5,26%)	74 (21,63%)
<i>S. mitis</i>	51 (14,91%)	21 (6,14%)	72 (21,05%)
<i>S. sanguinis</i>	25 (7,31%)	23 (6,73%)	48 (14,04%)
<i>S. anginosus</i>	12 (3,51%)	28 (8,19%)	40 (11,7%)
<i>S. mutans</i>	11 (3,22%)	21 (6,14%)	32 (9,36%)

Примечание. ЗДК – зубодесневой карман.

лия) согласно инструкциям к наборам. Категоризацию минимальной подавляющей концентрации антибиотика проводили согласно критериям Глобальных лабораторных стандартов CLSI, 2019 [13,14].

Для выявления носительства генов устойчивости к тетрациклину и макролидам применялся метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) в соответствии с инструкциями к наборам производителя (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистическая обработка полученных результатов, оценка распределения показателей, сравнительный анализ выборок проведен с помощью пакета программ для статистической обработки данных STATA 2.0 (Stata Corp, TX, USA). Для сравнения долей использовали z-критерий. Различие между сравниваемыми величинами признавалось достоверным при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В ходе микробиологического обследования было выделено 342 микробных изолята стрептококков группы *viridans*, из которых 217 из слюны, 125 – из отделяемого зубодесневого кармана. Среди них было идентифицировано 6 видов оральных стрептококков: *S. oralis* (76 изолятов), *S. salivarius* (74 изолята), *S. mitis* (72 изолята), *S. sanguinis* (48 изолятов), *S. anginosus* (40 изолятов) и *S. mutans* (32 изолята). Видовое разнообразие оральных стрептококков и их распределение по биотопам полости рта представлено в табл. 1.

При исследовании чувствительности выделенных изолятов к группам антибактериальных препаратов стрептококки были разделены на две подгруппы, имеющие схожие профили чувствительности. Так, группа *S. oralis*, *S. mitis* и *S. mutans* (n=180) отличалась большей устойчивостью к антибиотикам, чем группа *S. salivarius*, *S. sanguinis* и *S. anginosus* (n=162).

Спектр чувствительности оральных стрептококков к десяти антимикробным препаратам различных групп представлен в табл. 2. Все исследованные стрептококки были чувствительны к линезолиду и меропенему, также все изоляты, за исключением двух (0,6%), обладали чувствительностью к цефотаксиму. Более 88% изолятов были чувствительны к клиндамицину, доля цефтриаксон-чувствительных изолятов составила 80,1%. Чувствительность к пенициллину наблюдалась только у 181 изолята стрептококков (52,9%), при этом доля пенициллин-резистентных стрептококков в подгруппе *S. oralis/mitis/mutans* составила 47,8% против 23,5% в подгруппе *S. salivarius/sanguinis/anginosus* ( $p=0,020$ ). У выделенных стрептококков выявлялись значимые уровни резистентности к макролидам (эритромицин) – 47,9%, тетрациклину (тетрациклин) – 44,4% и хинолонам

(офлоксацин) – 39,5%. При этом доли E-, TE- и OFX-резистентных изолятов в подгруппе *S. oralis/mitis/mutans* были соответственно в 1,4; 2,5 и 1,9 раз выше, чем в подгруппе *S. salivarius/sanguinis/anginosus* ( $p=0,036$ ;  $p=0,011$ ;  $p=0,018$  соответственно). Уровень резистентности к триметоприму-сульфаметоксазолу также был выше у подгруппы *S. oralis/mitis/mutans* – 26,7% против 6,8% ( $p=0,032$ ).

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ – снижение чувствительности или резистентность к трем и более группам антибиотиков) была выявлена у 31,9% изолятов оральных стрептококков. При этом доминировало сочетание устойчивости к эритромицину, тетрациклину и офлоксацину у 79 изолятов (23,1 %) в сочетании с устойчивостью к пенициллину (выявлена у 56 изолятов) или без нее. Два изолята (*S. oralis* и *S. mitis*) проявляли устойчивость сразу к семи антибактериальным препаратам, включая пенициллин, цефалоспорины (цефтриаксон и цефотаксим), эритромицин, тетрациклин, клиндамицин и офлоксацин. При этом для изолята *S. mitis* минимальные подавляющие концентрации пяти антибактериальных препаратов находились за верхними референтными границами определения (СТХ>32, E>256, TE>256, CD>256, OFX>32 мкг/мл). Доля МЛУ-изолятов подгруппы *S. oralis/mitis/mutans* была на 47% выше по сравнению с подгруппой *S. salivarius/sanguinis/anginosus* (41,1% и 21,6% соответственно,  $p=0,048$ ) (табл. 2).

При определении молекулярно-генетических маркеров устойчивости к макролидам и тетрациклину было исследовано носительство генов *ermB*, *mefE*, *tetM* и *tetQ* у 127 стрептококковых изолятов, проявляющих сочетанную устойчивость к эритромицину и тетрациклину. В отношении устойчивости к макролидам, наиболее распространенными комбинациями генов были *ermB-mefE+* и *ermB+mefE+* у 68 (53,5%) и 32 изолятов (25,2%) *S. oralis/mitis/mutans* соответственно. Комбинация *ermB+mefE-* была обнаружена только у 2 изолятов (1,6%), тогда как 15 (11,8%) эритромицин-устойчивых изолятов оральных стрептококков были *ermB-* и *mefE-* негативными (табл. 3).

За устойчивость к тетрациклину отвечала комбинация *tetM+tetQ-* (88,19%). Комбинация *tetM-tetQ+* была выявлена у 8 изолятов (6,3%), тогда как *tetM-* и *tetQ-* негативными были 7 (5,51%) изолятов (табл. 3).

**Обсуждение.** Бактерии, принадлежащие к роду *Streptococcus* являются первыми колонизаторами полости рта, играя важную роль в формировании микробной экосистемы. Оральные стрептококки продуцируют ряд

Чувствительность оральных стрептококков к спектру антибактериальных препаратов

АБ	Категория МПК, мкг/мл	<i>S. oralis/mitis/ mutans</i> (n=180)	<i>S. salivarius/ sanguinis/ anginosus</i> (n=162)	Всего (n=342)
P	S (≤0,12)	76 (42,2%)	105 (64,8%)	181 (52,9%)
	I (0,25-2)	18 (10%)	19 (11,7%)	37 (10,8%)
	R (>4)	<b>86 (47,8%)<sup>1</sup></b>	38 (23,5%)	<b>124 (36,3%)</b>
CTX	S (≤1)	178 (98,9%)	162 (100%)	340 (99,4%)
	R (>4)	2 (1,1%)	-	2 (0,6%)
CRO	S (≤1)	131 (72,8%)	143 (88,3%)	274 (80,1%)
	I (2)	11 (6,1%)	15 (9,2%)	26 (7,6%)
	R (≥4)	<b>38 (21,1%)<sup>2</sup></b>	4 (2,5%)	42 (12,3%)
MEP	S (≤2)	180 (100%)	162 (100%)	342 (100%)
E	S (≤0,25)	27 (15%)	57 (35,2%)	84 (24,6%)
	I (0,5)	52 (28,9%)	42 (25,9%)	94 (27,5%)
	R (>1)	<b>101 (56,1%)<sup>3</sup></b>	<b>63 (38,9%)</b>	<b>164 (47,9%)</b>
TE	S (≤2)	19 (10,6%)	91 (56,2%)	110 (32,2%)
	I (4)	49 (27,2%)	30 (18,5%)	79 (23,1%)
	R (>8)	<b>112 (62,2%)<sup>4</sup></b>	41 (25,3%)	<b>153 (44,4%)</b>
CD	S (≤0,25)	157 (87,2%)	147 (90,7%)	304 (88,9%)
	R (>1)	23 (12,8%)	15 (9,3%)	38 (11,1%)
OFX	S (≤2)	43 (23,89%)	77 (47,53%)	120 (35,09%)
	I (4)	46 (25,55%)	41 (25,3%)	87 (25,44%)
	R (>8)	<b>91 (50,56%)<sup>5</sup></b>	<b>44 (27,17%)</b>	<b>135 (39,47%)</b>
SXT	S (≤1)	92 (51,1%)	102 (63%)	194 (56,7%)
	I (2)	40 (22,2%)	49 (30,2%)	89 (26%)
	R (≥2)	48 (26,7%) <sup>6</sup>	11 (6,8%)	59 (17,3%)
LNZ	S (≤2)	180 (100%)	162 (100%)	342 (100%)
MJU		<b>74 (41,1%)<sup>7</sup></b>	<b>35 (21,6%)</b>	<b>109 (31,9%)</b>

Примечание. Жирным цветом выделены значимые уровни резистентности. АБ – антибактериальный препарат; МПК – минимальная подавляющая концентрация; S – чувствительный; I – со сниженной чувствительностью; R – резистентный; MJU – множественная лекарственная устойчивость. <sup>1</sup>p=0,020; <sup>2</sup>p=0,015; <sup>3</sup>p=0,036; <sup>4</sup>p=0,011; <sup>5</sup>p=0,018; <sup>6</sup>p=0,032; <sup>7</sup>p=0,048 в сравнении с *S. salivarius/sanguinis/anginosus*.

Таблица 3

Генотипы устойчивости оральных стрептококков к макролидам и тетрациклину.

Генотипы устойчивости оральных стрептококков	Вид оральных стрептококков		Всего: (n=127)
	<i>S. oralis/mitis/mutans</i>	<i>S. salivarius/ sanguinis/ anginosus</i>	
К макролидам:			
ermB+mefE+	32 (25,2%)	4 (3,2%)	36 (28,4%)
ermB+mefE-	2 (1,6%)	0	2 (1,6%)
ermB-mefE+	68 (53,5%)	6 (4,72%)	74 (58,2%)
ermB-mefE-	12 (9,4%)	3 (2,4%)	15 (11,8%)
К тетрациклину:			
tetM+tetQ-	98 (77,17%)	14 (11,02%)	112 (88,19%)
tetM-tetQ+	7 (5,51%)	1 (0,79%)	8 (6,3%)
tetM-tetQ-	2 (1,57%)	5 (3,94%)	7 (5,51%)

адгезивных молекул, позволяющих им заселять различные биотопы ротовой полости [1]. В нашем исследовании было идентифицировано шесть видов оральных стрептококков: *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. anginosus* и *S. mutans*, большая часть которых (63,5%) выделена из слюны. Выделение *Streptococcus mutans*, обладающего способностью метаболизировать углеводы путем ферментации, в результате чего образуются кислоты в качестве побочных продуктов, напрямую

связано с риском развития кариеса. С другой стороны, выделенный *Streptococcus salivarius* производит большое количество щелочного вещества, которое играет важную роль в кислотно-щелочной физиологии полости рта, поддерживая микробиоту в состоянии динамического равновесия. Таким образом, выделенные оральные стрептококки вносят определенный вклад в формирование и стабилизацию микробиоты полости рта, участвуя, в том числе, в формировании колонизационной резистентности слизистых оболочек.

Принимая во внимание данные исследований последних десятилетий, свидетельствующих о неуклонном росте числа устойчивых к антибиотикам штаммов стрептококков [15], нами была исследована чувствительность оральных стрептококковых изолятов к ряду антибактериальных препаратов. Так, в структуре антибиотикоустойчивых доминировали стрептококки групп *oralis*, *mitis* и *mutans*, 47,8% изолятов которых были устойчивы к пенициллину, 56,1% к эритромицину, 50,6% к офлоксацину, и 62,2% к тетрациклину, что коррелирует с данными исследований других авторов [16,17], в то время как стрептококки групп *salivarius*, *sanguinis* и *anginosus* обладали большей восприимчивостью к антимикробным препаратам. Все исследованные стрептококки были чувствительны к линезолиду и меропенему, вероятно, в связи с тем, что данные антибиотики обладают более высоким потенциалом формирования резистентности и не так широко применяются в клинической практике. Наибольшую опасность, на наш взгляд, вызывает вы-



деление множественно-лекарственно-устойчивых изолятов оральных стрептококков: 41,1% в подгруппе *S. oralis/mitis/mutans*. В настоящее время выявление МЛУ-изолятов наблюдается исследователями при изучении различных видов стрептококков: оральных стрептококков [9] стрептококков группы А [18-21], стрептококков групп С и G [22].

Данная устойчивость, вероятно, выявляется в связи с тем, что полость рта является ведущим резервуаром переносимых генов устойчивости к антибиотикам [23-26], включая гены, кодирующие устойчивость к макролидам [27], бета-лактамам и тетрациклинам [28]. Высокие уровни невосприимчивости оральных стрептококков к макролидам (47,9% устойчивых изолятов) и тетрациклину (44,4% устойчивых изолятов), выявленные в нашем исследовании, могут быть объяснены адаптацией бактерий к селективному действию антибактериальных препаратов за счет определенных механизмов резистентности. Основными механизмами устойчивости к макролидным антибиотикам являются модификация мишени и активный эффлюкс. В первом случае экспрессия рибосомальной метилазы, кодируемой геном *ermB* (метилаза устойчивости к эритромицину), приводит к изменению сайтов-мишеней субъединицы 23S рРНК. Мутации этого типа, называемые «тип MLSB» (тип макролид-линкозамид-стрептограмин В), ответственны за высокий уровень устойчивости к макролидам. Носительство гена *ermB* в нашем исследовании было выявлено у 38 изолятов (30%). Тогда как второй механизм устойчивости – активный АТФ-зависимый эффлюкс антибиотика из бактериальной клетки кодируется геном *mefE*, выявленном у 89 изолятов (70%). Преобладающим генотипом устойчивости к эритромицину у оральных стрептококков был *ermB-meFE+*, выявленный у 74 изолятов (58,2%).

Одним из наиболее распространенных генов устойчивости к тетрациклину в оральных изолятах и метагеномах является *tetM* [29]. Этот ген кодирует белок, противостоящий ингибированию синтеза рибосомального белка антибиотиком. Широкое распространение *tetM* часто связывают с его ассоциацией с мобильными генетическими элементами из семейства конъюгативных транспозонов Tn916-Tn1545 / интегративных конъюгативных элементов [30–32]. Большая часть исследованных нами тетрациклин-устойчивых изолятов (88,19%) обладала генотипом *tetM+tetQ-*. Однако у нескольких стрептококков был выявлен ген устойчивости к тетрациклину *tetQ*, а несколько изолятов были *tetM* и *tetQ* негативными, свидетельствуя о возможном наличии других детерминант резистентности.

Таким образом, оральные стрептококки, находясь в одном из самых густонаселенных биотопов человеческого организма, могут являться посредниками для переноса детерминант резистентности более патогенным и клинически-значимым микроорганизмам, в связи с чем необходим тщательный мониторинг за уровнем их восприимчивости к антимикробным препаратам.

**Финансирование.** Работа поддержана проектом «Норвежско-российские связи в области антимикробного управления в стоматологической практике в Приполярной области» (руководитель проекта – доцент института клинической стоматологии Арктического университета Норвегии (г. Тромсе) Мухаммед Ал Харони).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА ( пп. 1-8,10-17, 19-21, 23-32  
см. REFERENCES )

9. Маянский Н.А., Кварчия А.З., Бржозовская Е.А., Пономаренко О.А., Крыжановская О.А., Куличенко Т.В. Видовое разнообразие и чувствительность к антибиотикам оральных стрептококков, выделенных у детей. *Российский педиатрический журнал*. 2019; 22(3): 153-61.
18. Брико Н.И., Дмитриева Н.Ф., Клейменов Д.А., Липатов К.В., Глушкова Е.В., Котин В.В. Чувствительность к антибиотикам стрептококков группы А различных *emm* генотипов, выделенных от больных инвазивными и неинвазивными инфекциями мягких тканей. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(1): 67-72.
22. Ильясов Ю.Ю., Лыгина Е.С., Дмитриев А.В. Спектр антибиотикорезистентности клинических изолятов стрептококков групп С и G, патогенных для человека. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15(3):235-8.

REFERENCES

1. Abranches J., Zeng L., Kajfasz J.K., Palmer S.R., Chakraborty B., Wen Z.T. et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6(5):10.
2. Wade W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol. Res.* 2013; 69:137-43.
3. Giannobile W.V., Wong D.T. Salivary diagnostics: oral health and beyond! *J. Dent. Res.* 2011; 90:1153-4.
4. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J., Farrell J.J., Paster B.J., Wong D.T. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26:781-91.
5. Willenborg J., Goethe R. Metabolic traits of pathogenic streptococci. *FEBS Lett.* 2016; 590:3905-19.
6. Cornejo O.E., Lefebvre T., Bitar P.D., Lang P., Richards V.P., Eilertson K. et al. Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30:881-93.
7. Warburton P.J., Ciric L., Lerner A., Seville L.A., Roberts A.P., Mullany P. TetAB46, a predicted heterodimeric ABC transporter conferring tetracycline resistance in *Streptococcus australis* isolated from the oral cavity. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013 Jan;68(1):17-22.
8. Naiman R.A., Barrow J.G. Penicillin-resistant bacteria in the mouths and throats of children receiving continous prophylaxis against reumatic fever. *Ann. Intern. Med.* 1963; 58:768-72.
9. Mayanskiy N.A., Kvarchiya A.Z., Brzhozovskaya E.A., Ponomarenko O.A., Kryzhanovskaya O.A., Kulichenko T.V. Species diversity and antibiotic sensitivity of oral streptococci isolated in children. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2019; 22(3): 153-61. (in Russian)
10. Lunde T.M., Roberts A.P., Al-Haroni M. Determination of copy number and circularization ratio of Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons in oral streptococci by droplet digital PCR. *J. Oral. Microbiol.* 2018; 11(1):1552060.
11. Murray P.R., Baron E. J., Jorgensen J.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover F.C. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. ASM Press: Washington, DC. 2003. Updated March, 2014.
12. CLSI. Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems. Approved Guideline. CLSI document M50-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
13. Romney M. H., April N. A., Janet A. H. Understanding and Addressing CLSI Breakpoint Revisions: a Primer for Clinical Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019, 57 (6) e00203-19; DOI: 10.1128/JCM.00203-19.
14. CLSI M100 ED29:2019 – Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing, 29th ed.
15. Richter S.S., Howard W.J., Weinstein M.P. Multicenter evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(9):2863-71.
16. Chun S., Huh H.J., Lee N.Y. Species-specific difference in antimicrobial susceptibility among viridans group streptococci. *Ann. Lab. Med.* 2015; 35(2): 205-11.



17. Nielsen M.J., Claxton S., Pizer B., Lane S., Cooke P., Paulus S. Viridans Group Streptococcal Infections in children after chemotherapy or Stem cell Transplantation: a 10-year review from a Tertiary Pediatric hospital. *Medicine (baltimore)*. 2016; 95(9): e2952.
18. Briko N.I., Dmitrieva N.F., Kleymenov D.A., Lipatov K.V., Glushkova E.V., Kotin V.V. Sensitivity to antibiotics of group A streptococci of various emm genotypes isolated from patients with invasive and non-invasive infections of soft tissues. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17(1): 67-72. (in Russian)
19. Peter C.A. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for Drug Selection. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 34(12):1613–20.
20. Tantivitayakul P., Lapirattanakul J., Vichayanrat T., Muadchiengka T. Antibiotic Resistance Patterns and Related Mobile Genetic Elements of Pneumococci and  $\beta$ -Hemolytic Streptococci in Thai Healthy Children. *Indian Journal of Microbiology*. 2016; 56(4):417-25.
21. Bhardwaj N., Mathur P., Behera B., Mathur K., Kapil A., Misra M.C. Antimicrobial resistance in beta-haemolytic streptococci in India: A four-year study. *Indian J. Med. Res.* 2018; 147(1):81-7.
22. Il'yasov Yu.Yu., Lygina E.S., Dmitriev A.V. The spectrum of antibiotic resistance of clinical isolates of group C and G streptococci pathogenic for humans. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2013; 15(3):235-8. (in Russian)
23. Kim S.M., Kim H.C., Lee S.W.S. Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. *J. Microbiol.* 2011;49(4):595–602.
24. Roberts A.P, Mullany P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2010;8(12):1441–50.
25. Roberts A.P., Mullany P. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011;35(5):856–71.
26. Seville L.A., Patterson A.J., Scott K.P. Distribution of tetracycline and erythromycin resistance genes among human oral and fecal metagenomic DNA. *Microb. Drug Resist.* 2009;15(3):159–66.
27. Chang S.C., Chang H.J., Lai M.S. Antibiotic usage in primary care units in Taiwan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1999; 11(1):23–30.
28. Ioannidis I., Sakellari D., Spala A. Prevalence of tetM, tetQ, nim and blaTEM genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *J. Clin. Microbiol.* 2009;36(7):569–74.
29. Lancaster H., Bedi R., Wilson M. The maintenance in the oral cavity of children of tetracycline-resistant bacteria and the genes encoding such resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;56(3):524–31.
30. Frazzon A.P. Gama B.A., Hermes V. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet (M) and tet (L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 26(2):365–70.
31. Roberts M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005;245(2):195–203.
32. Tong J., Lu X., Zhang J. Occurrence of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in enterococci and genomic DNA during anaerobic digestion of pharmaceutical waste sludge with different pretreatments. *Bioresour Technol.* 2017; 235:316–24.

Поступила 13.03.20

Принята к печати 15.03.20

## РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ДЕТЕЙ

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

Исследования последних лет свидетельствуют, что резистентность бактерий существовала задолго до того, как антимикробные препараты (АМП) стали применять в клинической практике, устойчивостью к АМП обладают не только патогенные микроорганизмы. Изучены 511 штаммов *E. coli*, выделенные из микробиоты кишечника детей в возрасте от 1 мес до 17 лет, проживающих в Санкт-Петербурге: определена чувствительность штаммов к 15 АМП диско-диффузионным методом, чувствительность к 6 коммерческим бактериофагам производства НПО «Микроген». Методом мультиплексной ПЦР проведён поиск генов, кодирующих *b*-лактамазы молекулярных классов TEM, SHV, OXA, CTX-M. 39,3% штаммов характеризовались устойчивостью к 1 и более классам АМП. Доля полирезистентных (устойчивых к 3 и более классам АМП) составляла 16,6%. Полирезистентны к клинически значимым группам АМП (цефалоспорины расширенного спектра (ЦРС) + фторхинолоны + аминогликозиды) 0,8% штаммов. Устойчивость к аминопенициллинам выявлена у 29,5% штаммов, ЦРС – 11,2%, фторхинолонам – 13,3%, тетрациклину – 20%, хлорамфениколу – 9,8%, аминогликозидам – 2,5%. Резистентность к *b*-лактамам обусловлена продукцией *b*-лактамаз: к ампициллину – молекулярного семейства TEM (81,9%), ЦРС – молекулярного семейства CTX-M (87,7%) групп CTX-M1 (66%) и CTX-M9 (34%). 43,5% полирезистентных штаммов *E. coli* чувствительны как минимум к одному из 6 коммерческих бактериофагов. Исследование показало, что микробиота кишечника детей является важным резервуаром штаммов *E. coli*, обладающих резистентностью (в т. ч. множественной) к АМП различных классов. Терапия бактериофагами является альтернативным методом эрадикации устойчивых к антибиотикам штаммов *E. coli*.

**Ключевые слова:** микробиота кишечника; *E. coli*; антибиотикорезистентность; *b*-лактамазы; бактериофаги; TEM; SHV; OXA; CTX-M.

**Для цитирования:** Сужаева Л. В., Егорова С. А. Резистентность к антимикробным препаратам штаммов *Escherichia coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 638-644. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-638-644>

Suzhaeva L. V., Egorova S. A.

### ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI*, ISOLATED FROM CHILDREN'S INTESTINAL MICROBIOTA

Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint-Petersburg, Russia

Recent studies have shown that bacterial resistance existed long before antimicrobials were used in medicine, and not only pathogens are resistant to antibiotics. 511 strains of *E. coli* isolated from the intestinal microbiota of children aged 1 month to 17 years living in St. Petersburg were studied: the susceptibility to 15 antibiotics was determined by the disk diffusion method, as well as the susceptibility to 6 commercial bacteriophages produced by «Microgen» (Russia). The *b*-lactamase genes of molecular families TEM, SHV, OXA, and CTX-M were detected by multiplex PCR. 39,3% *E. coli* isolates were resistant to one or more antimicrobial classes. The proportion of multidrug resistant isolates (resistant to 3 or more classes) was 16,6%. Multidrug resistance to clinically significant antimicrobial classes (extended-spectrum cephalosporins (ESC) + fluoroquinolones + aminoglycosides) was detected in 0,8% isolates. Resistance to aminopenicillins was detected in 29,5%, ESC – 11,2%, fluoroquinolones – 13,3%, tetracycline – 20,0%, chloramphenicol – 9,8%, aminoglycosides – 2,5% isolates. *b*-lactam resistance was due to the beta-lactamase production: to ampicillin – the molecular family TEM (81,9%), ESC – the CTX-M molecular family (87,7%) CTX-M1 – (66%) and CTX-M9 groups (34%). 43,5% multidrug resistant *E. coli* isolates were susceptible to at least one of the six commercial bacteriophages produced by «Microgen». The study showed that the intestinal microbiota of children is an important reservoir of *E. coli* resistant (including multidrug resistance) to various classes of antibiotics, and bacteriophage therapy is an alternative method for eradication of antibiotic-resistant *E. coli*.

**Key words:** intestinal microbiota; *E. coli*; antibiotic resistance; beta-lactamases; bacteriophages; TEM; SHV; OXA; CTX-M.

**For citation:** Suzhaeva L. V., Egorova S. A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, isolated from children's intestinal microbiota. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 638-644 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-638-644>

**For correspondence:** Suzhaeva L. V., junior researcher of laboratory of enteric infections; e-mail: [slv2211@yandex.ru](mailto:slv2211@yandex.ru)

#### Information about authors:

Suzhaeva Ludmila V., <https://orcid.org/0000-0001-7292-9933>;

Egorova Svetlana A., <https://orcid.org/0000-0002-7589-0234>.

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 19.06.2020  
Accepted 22.06.2020

Резистентность к антимикробным препаратам (АМП) у возбудителей инфекционных болезней – растущая угроза здравоохранению, представляющая проблему для многих стран и сфер деятельности [1]. Одной из стратегических целей Глобального плана действий по борьбе с устойчивостью к АМП, принятого Всемирной ассамблеей здравоохранения, является совершенствование глобального мониторинга резистентности. В различных географических районах действуют региональные программы мониторинга резистентности возбудителей, вызывающих инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (EARS-Net, CAESAR, ReLAVRA), а также заболеваний, передающихся с пищевыми продуктами (NARMS, CIPARS, EFSA/ECDC) [1 – 4]. В руководстве ВОЗ по осуществлению глобального мониторинга перечислены виды биологического материала, возбудители, АМП, приоритетные для мониторинга резистентности в повседневной практике. *Escherichia coli*, выделенная из образцов крови, спинно-мозговой жидкости, мочи, отнесена к приоритетным возбудителям [5].

*E. coli* – широко распространённый микроорганизм, обитающий в кишечнике человека и животных [6], поверхностных водоёмах [7], почве [8]. Некоторые представители вида являются возбудителями диарей и заболеваний внекишечной локализации [9]. Антимикробная терапия является основой этиотропного лечения эшерихиозов (тяжёлых форм диареи, циститов, пиелонефритов, сепсиса, менингита), мониторинг резистентности *E. coli* к АМП вызван необходимостью эффективного лечения этих заболеваний [10].

Больничная среда традиционно рассматривается как источник антибиотикорезистентных микроорганизмов. Исследования последних лет свидетельствуют, что резистентность существовала задолго до того, как АМП стали применять в клинической практике, устойчивостью к АМП обладают не только патогенные микроорганизмы. В микробиоме слюны и фекалий здоровых добровольцев обнаружены гены резистентности к 13 АМП [11]. Микробиом кишечника является резервуаром детерминант резистентности и имеет благоприятные условия для их передачи путём горизонтального переноса, в том числе и патогенным микроорганизмам [12]. Приобретают актуальность исследования резистентности к АМП бактерий микробиоты кишечника, расширяющие представления о механизмах её формирования и способах распространения.

Важной проблемой в лечении бактериальных инфекций является появление бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Ввиду высокой скорости её формирования снизился коммерческий интерес к разработке и производству новых АМП. В 2017 г. ВОЗ опубликовала перечень приоритетных патогенных микроорганизмов, для борьбы с лекарственной устойчивостью которых необходима разработка новых фармакологических препаратов. Одну из первых позиций в этом перечне занимают *E. coli*, устойчивые к цефалоспорианам расширенного спектра (ЦРС) и карбапенемам. Из 32 новых АМП, находящихся в стадии разработки, только два активны против этих граммотрицательных бактерий [13]. В поисках альтернативных стратегий борьбы с лекарственной устойчивостью бактерий возобновился интерес к терапии бактериофагами. Отсутствие достаточного количества правильно спланированных рандомизированных исследований, свидетельствующих об их эффективности и безопасности, ограничивают их широкое использование [14].

Цель – определить чувствительность к АМП штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей, проживающих в Санкт-Петербурге.

**Материал и методы.** Исследовано 511 штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей в возрасте от 1 мес до 17 лет, проживающих в Санкт-Петербурге. Диско-диффузионным методом (ДДМ) с использованием среды Мюллера-Хинтона и дисков производства Oxoid (Великобритания) согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версии 2014, 2015 гг. определена чувствительность к 15 АМП (ампициллин, цефтазидим, цефотаксим, цефепим, меропенем, налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, гентамицин, тобрамицин, амикацин, нитрофурантоин, тетрациклин, хлорамфеникол, фосфомицин, триметоприм/сульфаметоксазол), относящихся к семи классам АМП. Согласно Федеральным клиническим рекомендациям «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противэпидемической практике» оценена чувствительность к 6 коммерческим бактериофагам производства АО НПО «Микроген»: бактериофаг коли (Пермь), колипротейный бактериофаг (Нижний Новгород), пиобактериофаг поливалентный (Уфа), секстафаг® пиобактериофаг поливалентный (Пермь), пиобактериофаг комплексный (Нижний Новгород), интести-бактериофаг (Нижний Новгород).

Фенотипическая детекция б-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и цефалоспориноаз молекулярного класса C (AmpC) проведена путём выявления синергизма с ингибиторами б-лактамаз (клавулановая кислота, клаксациллин) в формате теста с двумя дисками и с использованием набора «ESBL+AmpC screen disc kit» (Liofilchem, Италия). Методом мультиплексной ПЦР с электрофоретической детекцией со специфическими праймерами проведён поиск генов, кодирующих б-лактамазы молекулярных классов TEM, SHV, OXA, CTX-M согласно ранее опубликованным протоколам [15].

Достигнутый уровень значимости различий определён с использованием критерия сопряженности  $\chi^2$  Пирсона. 95% доверительные интервалы долей и частот рассчитаны методом Уилсона.

**Результаты.** Анализ результатов определения чувствительности штаммов *E. coli* к АМП показал, что 60,7% (95%ДИ:56,4-64,8) изолятов чувствительны ко всем исследованным АМП, 39,3% (95%ДИ:35,2-43,6) – характеризовались устойчивостью к 1 и более классам АМП. Доля штаммов, резистентных к 1 или 2 классам составила 22,7% (95%ДИ:19,3-26,5), полирезистентных (устойчивых к 3 и более классам АМП) – 16,6% (95%ДИ:13,7-20,1) (рис. 1.) Доля устойчивых штаммов, выделенных из фекалий детей разных возрастных групп, значимо не отличалась ( $\chi^2=5,967$ ;  $df=3$ ;  $p=0,113$ ) и находилась в пределах от 31,3 до 46,0%. Доля полирезистентных изолятов находилась в пределах от 12 до 23% и не имела значимых отличий ( $\chi^2=5,223$ ;  $df=3$ ;  $p=0,156$ ).

Доли штаммов, устойчивых к различным классам АМП, не одинаковы. Наибольшие доли резистентных штаммов выявлены по отношению к аминопенициллинам и тетрациклинам (29,5% и 20% соответственно), наименьшие – к аминогликозидам и нитрофуранам (2,5% и 0,8%, соответственно). Доля изолятов, устойчивых к ЦРС, составила 11,2%, хинолонам – 13,3%, триметоприм/сульфаметоксазолу – 12,1%, хлорамфениколу



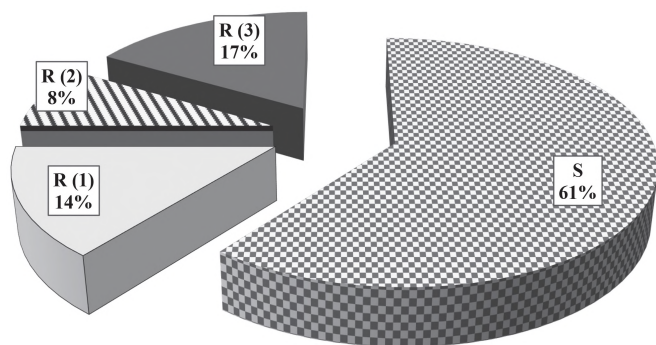


Рис. 1. Доля штаммов *Escherichia coli*, чувствительных и резистентных к различному количеству классов АМП (%). S – чувствительные ко всем исследуемым классам АМП; R(1) – резистентные к одному классу АМП; R(2) – резистентные к двум классам АМП; R(3) – резистентные к трём и более классам АМП.

– 9,8%. Не выявлены штаммы, нечувствительные к карбапенемам и фосфомицину,

Резистентность к АМП различных классов отличалась у штаммов, устойчивых и чувствительных к ампициллину. Доля штаммов, резистентных к ЦРС, хинолонам, аминогликозидам, триметоприм/сульфаметоксазолу, хлорамфениколу, тетрациклину, значительно выше у резистентных к ампициллину штаммов (рис. 2). Частота выявления полирезистентных штаммов среди ампициллинустойчивых изолятов составила 55% (95%ДИ:47,0-62,7), что значительно отличается от такого показателя среди чувствительных штаммов – 0,6% (95%ДИ: 0,2-2,0).

Подобные отличия отмечены у штаммов, кластеризованных по принципу чувствительности и нечувствительности ко всем остальным исследуемым классам АМП. Впечатляет доля полирезистентных изолятов среди штаммов, резистентных к аминогликозидам, ЦРС, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу (100%, 86%, 82%, 87%, соответственно) в отличие от долей среди штаммов, чувствительных к каждому из этих АМП (14,5%, 7,9%, 9,5%, 6,9% соответственно).

У штаммов, устойчивых к исследуемым АМП, выявлено 44 фенотипа резистентности: к одному классу АМП – 6 фенотипов; двум классам – 8 фенотипов; трём классам – 11 фенотипов; четырём классам – 8 фенотипов; пяти классам – 6 фенотипов; шести классам – 3 фенотипа; семи классам – 2 фенотипа. Часто встречался фенотип устойчивости к одному классу АМП – к ампициллину (7,8%). Доля остальных фенотипов варьировала от 0,2 до 2,5%. Фенотипы множественной резистентности чаще всего содержали ампициллин (97,6%), тетрациклин (70,6%), триметоприм/сульфаметоксазол (63,5%).

При изучении 94 штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину (чувствительных к ЦРС), выявлены гены б-лактамаз (*bla*) различных молекулярных классов. У 81,9% устойчивых штаммов выявлены *bla*-гены, кодирующие б-лактамазы молекулярного семейства TEM, у 7,4% штаммов – OXA, у 1,1% штаммов – SHV. У 3,2% штаммов одновременно выявлены гены TEM и OXA. У 12,8% штаммов гены известных б-лактамаз выявить не удалось. Наиболее распространённым механизмом резистентности к аминопенициллинам у штаммов *E. coli* является продукция БЛРС молекулярного семейства TEM, что совпадает с данными литературы.

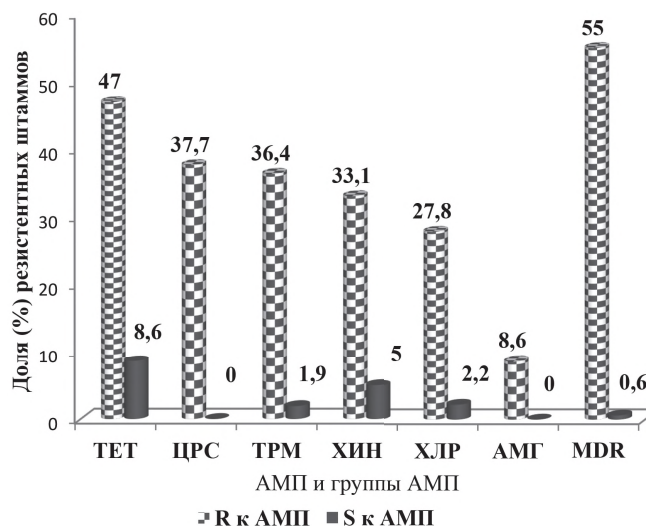


Рис. 2. Резистентность к различным АМП штаммов *Escherichia coli*, чувствительных и резистентных к ампициллину. R к АМП – резистентные к ампициллину; S – чувствительные к ампициллину; TET – тетрациклин; ЦРС – цефалоспорины расширенного спектра; ТРМ – триметоприм/сульфаметоксазол; ХИН – хинолоны; ХЛР – хлорамфеникол; АМГ – аминогликозиды; MDR – полирезистентные штаммы.

При изучении 57 штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину и ЦРС, на первом этапе использованы фенотипические подтверждающие тесты, которые у 56 штаммов подтвердили продукцию БЛРС (синергизм с клавулановой кислотой) и у 1 штамма – продукцию б-лактамазы молекулярного класса С (синергизм с клоксациллином). У 87,7% штаммов, устойчивых к ампициллину и ЦРС, обнаружены *bla*-гены, кодирующие продукцию БЛРС молекулярного семейства СТХ-М, из них 22,8% штаммов продуцировали только СТХ-М, остальные 64,9% штаммов сочетали продукцию СТХ-М с другими б-лактамазами (TEM, SHV, OXA). У 5,3% штаммов выявлены гены только молекулярного класса TEM, у 3,5% – молекулярных классов TEM и SHV. У штамма с фенотипически подтверждённой продукцией б-лактамазы молекулярного класса С выявлены гены, кодирующие продукцию AmpC-цефалоспорины SMY и TEM. У одного изолята гены известных б-лактамаз выявить не удалось.

Гены БЛРС молекулярного семейства СТХ-М преимущественно представлены молекулярной группой СТХ-М1 (66%), СТХ-М9 (34%). Штаммы *E. coli*, обладающие генами цефотаксимаз, в большинстве случаев имели гены и других б-лактамаз. В группе изолятов с генами молекулярной группы СТХ-М9 они обнаружены у 94,1% штаммов, с генами СТХ-М1 – у 63,6% штаммов ( $\chi^2=5,967$ ;  $df=3$ ;  $p=0,113$ ). Штаммы, обладающие генами БЛРС молекулярных групп СТХ-М1 и СТХ-М9, имели различную устойчивость к хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, хинолонам, аминогликозидам. Доля штаммов, резистентных к хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, аминогликозидам, в группе с СТХ-М1 меньше, чем в группе СТХ-М9. Доля штаммов резистентных к хинолонам, в группе с СТХ-М1 выше, чем в группе СТХ-М9. Устойчивость к остальным исследуемым АМП в указанных группах не отличалась.

В исследуемой популяции *E. coli* частота встречаемости штаммов, содержащих б-лактамазы различных



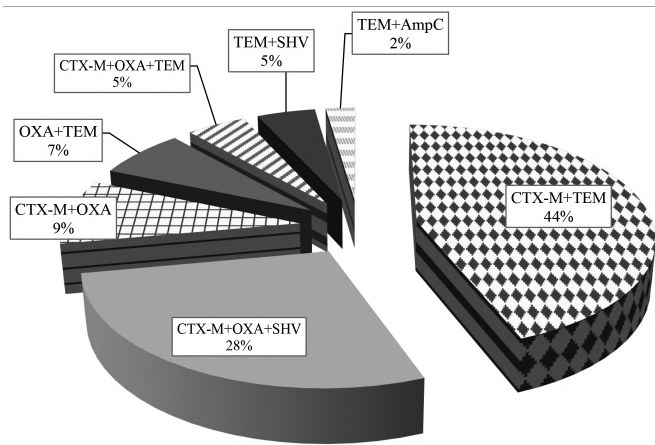


Рис. 3. Сочетания генов  $\beta$ -лактамаз различных молекулярных классов.

молекулярных семейств, составила 27%.  $\beta$ -лактамазы семейства TEM обнаружены у 22,7%, SHV – у 2,9%, OXA – у 2,5%, CTX-M – у 9,8%, AmpC – у 0,19% штаммов. Сочетанная продукция  $\beta$ -лактамаз выявлена у 8,4% штаммов. Сочетания этих ферментов представлены 7 фенотипами (рис. 3). Доли штаммов *E. coli*, содержащих гены  $\beta$ -лактамаз различных молекулярных семейств и их сочетания, статистически значимо не отличались в группах детей разного пола и возраста.

При оценке чувствительности 511 штаммов *E. coli* к шести коммерческим препаратам на основе бактериофагов выявлено, что к действию бактериофага коли чувствительны 33,7% штаммов, коли-протейного бактериофага – 11,2%, пиобактериофага поливалентного – 16,2%, секстафага – 10,6%, пиобактериофага комплексного – 6,8%, интести-бактериофага – 13,7%.

К одному из исследуемых бактериофагов чувствительны 17,2% штаммов, к двум – 11,4%, к трём – 6,7%, к четырём – 4,7%, к пяти – 1,8%, к шести – 0,8%. Минимум к одному из исследуемых бактериофагов чувствительны 42,5% штаммов *E. coli*.

Доля штаммов, чувствительных к бактериофагам, среди *E. coli*, чувствительных и резистентных к различным классам АМП, значимо не отличалась по отношению ко всем исследуемым бактериофагам, за исключением секстафага. Секстафаг чаще оказывал литическое действие на штаммы, чувствительные к ампициллину (13,1%), ЦРС (11,7%), хинолонам (11,7%), тетрациклину

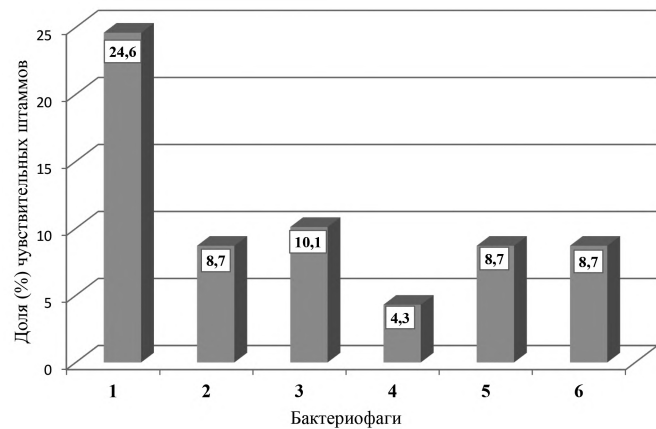


Рис. 4. Чувствительность полирезистентных штаммов *Escherichia coli* к коммерческим препаратам на основе бактериофагов. 1 – бактериофаг коли (Пермь), 2 – колипротейный бактериофаг (Нижний Новгород), 3 – пиобактериофаг поливалентный (Уфа), 4 – секстафаг® пиобактериофаг поливалентный (Пермь), 5 – пиобактериофаг комплексный (Нижний Новгород), 6 – интести-бактериофаг (Нижний Новгород).

(12%) по сравнению с резистентными к этим препаратам штаммами (4,6%, 1,8%, 2,9%, 4,9% соответственно).

Доля штаммов, чувствительных к каждому из исследуемых бактериофагов, значимо не отличалась у штаммов, резистентных к разному количеству классов АМП (см. таблицу). Доля штаммов, чувствительных как минимум к одному из исследуемых бактериофагов, среди полирезистентных штаммов составила 43,5%, среди БЛРС-продуцирующих штаммов – 44,0%. Полирезистентные штаммы чаще чувствительны к бактериофагу коли (24,6%). Чувствительность к поливалентным препаратам на основе бактериофагов варьировала от 4,3 до 10,1% (рис. 4).

**Обсуждение.** Сравнение показателей устойчивости штаммов *E. coli* к 15 АМП показало, что исследуемые штаммы наиболее часто резистентны к ампициллину и тетрациклину.

По данным литературы устойчивость к аминопенициллинам по сравнению с другими классами АМП имеет самые высокие показатели среди госпитальных штаммов *E. coli*, выделенных из крови и спинномозговой жидкости, среди изолятов, выделенных из мочи при инфекциях мочевыводящих путей (ИМП) [1, 16]. Резистентность к ампициллину у таких штаммов значи-

Доля (%) штаммов *E. coli*, чувствительных к действию коммерческих бактериофагов

Наименование бактериофагов	Количество классов антибиотиков, к которым резистентны <i>E. coli</i>								Всего $n=511$	$\chi^2$ (df=7)	$p$
	0 ( $n=310$ )	1 ( $n=73$ )	2 ( $n=43$ )	3 ( $n=35$ )	4 ( $n=22$ )	5 ( $n=14$ )	6 ( $n=12$ )	7 ( $n=2$ )			
Бактериофаг коли	36,8	35,6	30,2	28,6	27,3	7,1	16,7	0	33,7	9,481	0,220
Колипротейный бактериофаг	11,3	9,6	7,0	11,4	13,6	21,4	16,7	0	11,2	3,193	0,867
Пиобактериофаг поливалентный	18,1	11,0	14,0	17,1	13,6	14,3	8,3	50,0	16,2	4,817	0,682
Секстафаг	13,5	11,0	2,3	5,7	4,5	0	0	0	10,6	11,042	0,137
Пиобактериофаг комплексный	6,1	6,8	9,3	8,6	13,6	7,1	0	0	6,8	3,44	0,842
Интести-бактериофаг	17,4	11,0	2,3	11,4	9,1	0	8,3	0	13,7	12,178	0,095

тельно выше, чем у исследованных нами изолятов, выделенных из микробиоты кишечника (93% и 68% против 29%, соответственно). Данная ситуация выглядит вполне закономерной, так как препаратами стартовой терапии заболеваний этой локализации у пациентов детского возраста являются именно  $\beta$ -лактамы АМП, что способствует увеличению селективного давления и росту резистентности возбудителя к данной группе АМП.

Сравнение полученных результатов с данными литературы показало, что устойчивость к ампициллину диареогенных штаммов *E. coli* некоторых патотипов (энтеропатогенные, ЕРЕС; энтеротоксигенные, ЕТЕС) не отличается от таковой у штаммов, выделенных из микробиоты кишечника, у энтероинвазивных *E. coli* (ЕИ-ЕС) значительно превышает таковую [17]. Вероятно, это связано с тем, что ЕТЕС вызывает более тяжёлое клиническое течение болезни по сравнению с ЕРЕС и ЕТЕС и для лечения таких диарей чаще используются АМП.

Сравнение резистентности к ампициллину штаммов, выделенных из микробиоты кишечника здоровых детей в различных географических регионах, показало, что доля устойчивых штаммов в Санкт-Петербурге (29,5%) значительно ниже, чем в странах Африки и Азии (Ливия – 73% [18], Тайвань – 70,1% [19], Вьетнам – 65% [20], Индия – 63,7% [21]), но выше, чем в европейских странах (Германия – 16,5%) [22]. Анализ данных литературы показывает, что в странах Азиатско-Тихоокеанского региона количество потребляемых АМП значительно выше, чем в странах Европы [23-25].

Исследование показало, что устойчивые к аминопенициллинам штаммы значительно чаще резистентны к другим классам АМП в отличие от чувствительных изолятов. Аналогичная картина характерна и для штаммов, устойчивых к ЦРС, что согласуется с общемировыми тенденциями [19, 21, 22].

Основным механизмом резистентности штаммов *E. coli* к аминопенициллинам является выработка БЛРС [26]. Наиболее распространёнными  $\beta$ -лактамазами, выявленными в данной работе, являются  $\beta$ -лактамазы молекулярного семейства TEM (81,9%).

Доля штаммов, устойчивых к ЦРС, составила 11,2%, что значительно ниже, чем среди госпитальных штаммов *E. coli* (72,6%) [27] и штаммов, выделенных при внебольничных ИМП (20%) [16]. Вероятно, это связано с частым использованием этих АМП в качестве препаратов стартовой терапии различных инфекционных заболеваний у детей. Доля штаммов *E. coli*, устойчивых к ЦРС, в нашем исследовании сопоставима с показателями для штаммов, выделенных из микробиоты кишечника здоровых жителей стран Европы (Германии, Франции, Испании, Швеции, Венгрии, Австралии, Португалии), США, Аргентины, где она составляет 5-10%. Указанная доля значительно выше у жителей стран Азии (Тайланда, Вьетнама, Китая, Индии) и Мексики – 40-60%. Появление таких штаммов в микробиоте кишечника здоровых людей связано с предшествующим приёмом АМП данной группы, эпизодами пребывания в стационаре, употреблением пищевых продуктов и воды, контаминированных устойчивыми микроорганизмами, путешествием в страны с высокой распространённостью БЛРС-продуцирующих бактерий, профессиональной деятельностью в животноводстве (особенно в птицеводстве и свиноводстве), контактом с домашними животными [28].

Механизм устойчивости к ЦРС обусловлен в 87,7% случаев выработкой БЛРС молекулярного семей-

ства СТХ-М, групп СТХ-М1 (66%) и СТХ-М9 (34%).  $\beta$ -лактамазы молекулярных групп СТХ-М2, СТХ-М8, СТХ-М25 не выявлены. Полученные результаты отражают мировые тенденции распространения энтеробактерий, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы молекулярной группы СТХ-М1, которые доминируют практически во всех регионах мира за исключением Китая, Юго-Восточной Азии, Южной Кореи, Японии, Испании, где преобладает группа СТХ-М9, Южной Америки, где преобладает группа СТХ-М2 [29].

Среди штаммов, устойчивых к ЦРС, доля полирезистентных значительно выше (86,0%) по сравнению с аналогичной долей у чувствительных к этим АМП штаммов (7,9%). Вероятно, плазмиды, несущие гены цефотаксимаз, содержат гены, определяющие резистентность к другим классам препаратов (хинолонам, аминогликозидам, тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу) [30].

Вызывает интерес устойчивость штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей, к тетрациклину – препарату, в настоящее время не используемому в педиатрической практике и редко применяемому у взрослых. Устойчивость к нему одинаково часто встречалась у штаммов, выделенных от детей в возрасте 1 мес и от детей дошкольного и школьного возраста. Вероятно, младенец приобретает такие штаммы от матери, так как кишечник новорожденного при естественных родах заселяется преимущественно «материнскими» микроорганизмами. В организме матери штаммы *E. coli* могли приобрести устойчивость к тетрациклину, остаточные количества которого содержатся в пищевых продуктах вследствие его использования в ветеринарии и животноводстве [31]. Аналогичный механизм формирования резистентности у штаммов *E. coli* в микробиоте кишечника нельзя исключить и у детей более старшего возраста.

В нашем исследовании резистентные к ципрофлоксацину штаммы *E. coli* выявлены лишь в 2,9% случаев, что значительно отличается от показателей резистентности штаммов, вызывающих ИСМП (65,6%) и ИМП (17,6%) [27, 16]. Возможно, резистентные штаммы приобретены детьми от матери в момент рождения, поскольку детский и подростковый возраст является противопоказанием для приёма препаратов из группы хинолонов из-за риска нарушения формирования костно-мышечной системы [32].

Оценка чувствительности выделенных штаммов *E. coli* к коммерческим бактериофагам не выявило значимых отличий у штаммов в зависимости от чувствительности к различным классам АМП и их количеству. 43,5% полирезистентных штаммов чувствительны, как минимум к одному из шести исследуемых бактериофагов, что позволяет считать, что терапия бактериофагами является альтернативным методом эрадикации устойчивых к АМП штаммов *E. coli*.

Литическим действием на полирезистентные штаммы чаще обладал бактериофаг коли (24,6%), в отличие от остальных фагов, чувствительность к которым не превышала 10,1%. Можно предположить, что титр колифага в моновалентном препарате бактериофага выше, чем в поливалентном в пересчёте на единицу объёма. Различия в чувствительности могут быть обусловлены различиями самих фаговых коктейлей у разных завод-производителей ввиду использования ими в процессе изготовления отличающихся коллекций штаммов-«хозяев». Коллекции состоят из клинических штаммов,

выделенных при различных заболеваниях, вызванных *E. coli*, а исследуемые нами штаммы таковыми не являются. Нельзя не упомянуть о региональной специфичности фагов в отношении вида *E. coli*, отличающегося широким внутривидовым разнообразием [33]. Несмотря на объективно существующие ограничения, фаготерапия представляется перспективным методом борьбы с устойчивыми к АМП штаммами *E. coli*, учитывая растущий опыт создания препаратов бактериофагов с наибольшей литической активностью по отношению к целевому патогену и возможность локальной адаптации этих препаратов [34].

**Выводы.** При изучении чувствительности к АМП штаммов *E. coli*, выделенных из микробиоты кишечника детей, установлено, что 39,3% штаммов резистентны к АМП, причём 16,6% имеют множественную устойчивость к 3 и более классам. Одновременно устойчивы к клинически значимым группам АМП (ЦРС + фторхинолоны + аминогликозиды) 0,8% штаммов. Устойчивость к β-лактамам (АМП часто используемым в педиатрической практике) выявлена у 29,5% штаммов, включая 11,2% устойчивых к ЦРС. Резистентность к β-лактамам обусловлена продукцией β-лактамаз: к ампициллину – молекулярного семейства TEM (81,9%), ЦРС – молекулярного семейства СТХ-М (87,7%) групп СТХ-М1 (66%) и СТХ-М9 (34%).

При изучении чувствительности полирезистентных штаммов *E. coli* к коммерческим бактериофагам производства НПО «Микроген» выявлено, что 43,5% этих штаммов чувствительны как минимум к одному из тестируемых бактериофагов. Литической активностью чаще обладал бактериофаг коли, в сравнении с другими препаратами бактериофагов, содержащих в своем составе фаги против *E. coli*.

Исследование показало, что микробиота кишечника детей является важным резервуаром штаммов *E. coli*, обладающих резистентностью (в т. ч. множественной) к АМП различных классов. Появление таких штаммов в микробиоте кишечника может быть связано с их приобретением в момент рождения от матери, предшествующим приёмом АМП, эпизодами пребывания в стационаре, употреблением пищевых продуктов и воды, контаминированных устойчивыми микроорганизмами, путешествием в страны с высокой распространённостью резистентных к АМП штаммов. Устойчивые к АМП аутоштаммы *E. coli* могут быть причиной инфекции у ослабленных детей и пациентов отделений интенсивной терапии, могут передавать гены резистентности патогенным микроорганизмам. Дальнейшее изучение резистентности *E. coli*, присутствующих в микробиоте кишечника, будет способствовать расширению наших знаний о механизмах её формирования, путях распространения, способах её устранения.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (1-15, 18-25, 28-30, 33, 34 см. REFERENCES)

16. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Перепанова Т.С., Козлов Р.С. и др. Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «Дармис-2018». *Клиническая микробиология и антимикробная*

*химиотерапия*. 2019; 21(2):134-46. [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_41179883\\_46071908.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_41179883_46071908.pdf).  
17. Гончар Н.В., Партина И.В., Ныркова О.И., Драп А.С. Антибиотико- и фагорезистентность клинических штаммов кишечной палочки у госпитализированных детей Санкт-Петербурга, больных эшерихиозами. *Антибиотики и химиотерапия*. 2014; 59 (9-10): 38-43.  
26. Егоров А.М., Уляшова М.М., Рубцова М.Ю. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2018; 10(4): 33-48. [https://www.elibrary.ru/download/elibrary\\_36916320\\_74780557.pdf](https://www.elibrary.ru/download/elibrary_36916320_74780557.pdf).  
27. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Шайдуллина Э. Р., Азизов И. С. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН 2015-2016. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2):147-59. [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_41179884\\_63500344.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_41179884_63500344.pdf).  
31. Онищенко Г.Г., Шевелёва С.А., Хотимченко С.А. Гигиеническое обоснование допустимых уровней антибиотиков тетрациклиновой группы в пищевой продукции. *Гигиена и санитария*. 2012; 91 (6): 4-14. [https://www.elibrary.ru/download/elibrary\\_18846289\\_70501382.pdf](https://www.elibrary.ru/download/elibrary_18846289_70501382.pdf).  
32. Поляк М.С. Антибиотикотерапия. Теория и практика. СПб.: ИнформМед; 2010.

## REFERENCES

1. Central Asian and Eastern European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report 2017. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2017. Available at: [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0005/354434/WHO\\_CAESAR\\_AnnualReport\\_2017.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/354434/WHO_CAESAR_AnnualReport_2017.pdf).
2. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report 2013. Ontario: Public Health Agency of Canada; 2015. Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports.html>.
3. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *European Food Safety Authority Journal*. 2019; 17(2): 5598. Doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598.
4. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta: Department of Health and Human Services; 2019. Available at: <https://www.cdc.gov/narmsgnow>.
5. Global antimicrobial resistance surveillance system: manual for early implementation. Geneva: World Health Organization; 2017. Available at: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/188783/9789241549400\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/188783/9789241549400_eng.pdf).
6. Escobar-Páramo P., Le Menac'h A., Le Gall T., Amorin C., Gouriou S., Picard B. et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*. 2006; 8:1975-84. Doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x.
7. Hansen S., Messer T., Mittelstet A., Berry E. D., Bartelt-Hunt S., Abimbola O. *Escherichia coli* concentrations in waters of a reservoir system impacted by cattle and migratory waterfowl. *Science of The Total Environment*. 2020; 705: 135607. Doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135607.
8. Dusek N., Hewitt A. J., Schmidt K. N., Bergholz, P. W. Landscape-Scale Factors Affecting the Prevalence of *Escherichia coli* in Surface Soil Include Land Cover Type, Edge Interactions, and Soil pH. *Applied and environmental microbiology*. 2018; 84 (10): e02714-17. Doi:10.1128/AEM.02714-17.
9. Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2: 123-40. Doi: 10.1038/nrmicro818.
10. Vila J., Sáez-López E., Johnson J. R., Römling U., Dobrindt U., Cantón R. et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*. 2016; 40 (4): 437-63. Doi:10.1093/femsre/fuw005.
11. Sommer M., Dantas G., Church G. M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora.



- Science (New York, N.Y.)*. 2009; 325(5944): 1128-31. Doi: 10.1126/science.1176950.
12. Lerner A., Matthias T., Aminov R. Potential effects of horizontal gene exchange in the human gut. *Frontiers in immunology*. 2017; 8: 1630. Doi: 10.3389/fimmu.2017.01630.
  13. Antibacterial agents in preclinical development: an open access database. Geneva: World Health Organization; 2019. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330290/WHO-EMP-IAU-2019.12-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
  14. Sabino J., Hirten R. P., Colombel J. F. Review article: bacteriophages in gastroenterology – from biology to clinical applications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2020; 51: 53-63. Doi: 10.1111/apt.15557.
  15. Dalenne C., Costa A.D., Decré D., Favier C., Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010; 65 (3): 490-5. Doi: 10.1093/jac/dkp498.
  16. Palagin I. S., Sukhorukova M. V., Dekhnich A. V., Edelstein M. V., Perepanova T. S., Kozlov R. S. et al. Antimicrobial resistance of pathogens causing community-acquired urinary tract infections in Russia: results of multicenter study «DARMIS-2018». *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2):134-46. (in Russian)
  17. Gonchar N. V., Partina I. V., Nyrkova O. I., Drap A. C. Resistance of clinical strains of pathogenic *E.coli* to antibiotics and bacteriophage in hospitalized children with escherichiosis in St.Petersburg. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2014; 59 (9-10): 38-43. (in Russian)
  18. Ahmed S. F., Ali M. M., Mohamed Z. K., Moussa T. A., Klena J. D. Fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC-producing *Escherichia coli* in a Libyan community. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2014; 13:22. Doi: 10.1186/1476-0711-13-22.
  19. Huang I. F., Lee W. Y., Wang J. L., Hung C. H., Hu H. H., Hung W. Y. et al. Fecal carriage of multidrug-resistant *Escherichia coli* by community children in southern Taiwan. *BMC gastroenterology*. 2018; 18(1): 86. Doi: 10.1186/s12876-018-0807-x.
  20. Dyar O. J., Hoa N. Q., Trung N. V., Phuc H. D., Larsson M., Chuc N. T. et al. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* among children in rural Vietnam. *BMC infectious diseases*. 2012; 12: 92. Doi: 10.1186/1471-2334-12-92.
  21. Gupta M., Didwal G., Bansal S., Kaushal K., Batra N., Gautam V. et al. Antibiotic-resistant *Enterobacteriaceae* in healthy gut flora: A report from north Indian semiurban community. *The Indian journal of medical research*. 2019; 149 (2): 276-80. Doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_207\_18.
  22. Valenza G., Nickel S., Pfeifer Y., Eller C., Krupa E., Lehner-Reindl V. et al. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* as intestinal colonizers in the German community. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58 (2): 1228-30. Doi: 10.1128/AAC.01993-13.
  23. Holstiege J., Schink T., Molokhia M. Mazzaglia G., Innocenti F., Oteri A. et al. Systemic antibiotic prescribing to paediatric outpatients in 5 European countries: a population-based cohort study. *BMC Pediatrics*. 2014; 14: 174. Doi:10.1186/1471-2431-14-174.
  24. Boeckel T. V., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B., Levin S. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014; 14 (8): 742-50. Doi: 10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
  25. Auta A., Hadi M. A., Oga E., Adewuyi E. O., Abdu-Aguye S. N., Adeloye D. et al. Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. 2019; 78 (1): 8-18. Doi: 10.1016/j.jinf.2018.07.001.
  26. Egorov A. M., Ulyashova M. M., Rubtsova M. Yu. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae*. 2018; 10(4): 33-48. (in Russian)
  27. Sukhorukova M. V., Edelstein M. V., Ivanchik N. V., Skleenova E. Yu., Shajdullina E. R., Azyzov I. S. 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. (in Russian)
  28. Karanika S., Karantanos T., Arvanitis M., Grigoras C., Mylonakis E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk factors among healthy individuals: a systematic review and metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; 63(3): 310-8. Doi: 10.1093/cid/ciw283.
  29. Kawamura K., Nagano N., Suzuki M., Wachino J. I., Kimura K., Arakawa Y. ESBL-producing *Escherichia coli* and its rapid rise among healthy people. *Food safety (Tokyo, Japan)*. 2017; 5(4): 122-50. Doi:10.14252/foodsafetyfscj.2017011.
  30. Bartoloni A., Pallecchi L., Benedetti M., Fernandez C., Vallejos Y., Guzman E. et al. Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. *Emerging infectious diseases*. 2006; 12 (6): 907-13. Doi: 10.3201/eid1206.051258.
  31. Onishchenko G. G., Sheveleva S. A., Khotimchenko S. A. Hygienic substantiation of the permissible levels for tetracycline-group antibiotics in food. *Gigiena i sanitariya*. 2012; 91 (6): 4-14. (in Russian)
  32. Polyak M. S. Antibioticotherapy. Theory and practice. [Antibiotikoterapiya. Teoriya i praktika]. St.Petersburg: InformMed; 2010. (in Russian)
  33. Bourdin G., Navarro A., Sarker S. A., Pittet A. C., Qadri F., Sultana S. et al. Coverage of diarrhoea-associated *Escherichia coli* isolates from different origins with two types of phage cocktails. *Microbial biotechnology*. 2014; 7(2): 165-76. Doi: 10.1111/1751-7915.12113.
  34. Ujmajuridze A., Chanishvili N., Goderdzishvili M., Leitner L., Mehnert U., Chkhotua A. et al. Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9: 1832. Doi: 10.3389/fmicb.2018.01832.

Поступила 19.06.20

Принята к печати 22.06.20



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Лукова О.А.<sup>1</sup>, Заславская М.И.<sup>1</sup>, Махрова Т.В.<sup>1</sup>, Кропотов В.С.<sup>1</sup>, Китаева Е.В.<sup>2</sup>

## ЭКСПРЕССИЯ TOLL-ПОДОБНЫХ И АДГЕЗИВНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СЛИЗИСТОЙ РТА ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ООО «Клиника современной стоматологии», 603155, Нижний Новгород, Россия

*Экспрессия toll-подобных и адгезивных рецепторов на эпителиальных клетках слизистой рта меняется при различных патологических состояниях, как местного, так и системного уровня, в частности, при хроническом пародонтите. Длительное присутствие пародонтопатогенных микроорганизмов в десневой борозде стимулирует и поддерживает воспалительный процесс. Взаимодействие пародонтопатогенов с эпителиальными клетками слизистых оболочек рта является первым этапом развития пародонтита. Патологический процесс влияет на функции эпителиоцитов, в частности на их способность взаимодействовать с представителями микробиоценоза. Поэтому, естественная колонизация нормальной микробиоты полости рта на буккальных клетках, отражающая способность эпителиоцитов к микробной адгезии, является чувствительным индикатором различных дестабилизирующих процессов. Определение уровня экспрессии toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 на эпителиоцитах также позволяет оценить функциональное состояние клеток и выраженность воспалительного процесса на уровне слизистых полости рта, в частности, при хроническом пародонтите. В данной работе исследовали рецептор-зависимые реакции буккальных эпителиоцитов при хроническом пародонтите методом проточной цитофлуориметрии и путем определения уровня естественной (микробной) колонизации. Также авторами проведено сравнение этих способов определения функционального состояния мукозальных клеток при хроническом пародонтите. Результаты показали, что у пациентов с пародонтитом активность рецепторов, участвующих в адгезивных реакциях с микробиотой полости рта менялась незначительно и была несколько выше, чем у здоровых доноров. В то же время, экспрессия TLRs на эпителиальных клетках при пародонтите менялась существенно. Так, процент клеток, экспрессирующих TLR2 достоверно увеличился, а TLR4 – уменьшился. Одновременно, при патологии полости рта значительно возрос процент мукозальных клеток, не имеющих TLRs. Таким образом, исследование экспрессии TLR2- и TLR4- на буккальных эпителиоцитах является более показательным тестом в оценке выраженности воспалительного процесса при хроническом пародонтите, чем определение уровня естественной колонизации.*

**Ключевые слова:** toll-подобные рецепторы; TLRs; естественная микробная колонизация, буккальные эпителиоциты; пародонтит.

**Для цитирования:** Лукова О.А., Заславская М.И., Махрова Т.В., Кропотов В.С., Китаева Е.В. Экспрессия toll-подобных и адгезивных рецепторов на эпителиальных клетках слизистой рта при пародонтите. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 645-648. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-645-648>

Lukova O.A.<sup>1</sup>, Zaslavskaya M.I.<sup>1</sup>, Makhrova T.V.<sup>1</sup>, Kropotov V.S.<sup>1</sup>, Kitaeva E.V.<sup>2</sup>

### EXPRESSION OF TOLL-LIKE AND ADHESIVE RECEPTORS ON EPITHELIAL CELLS OF THE ORAL MUCOSA IN PERIODONTITIS

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>2</sup>«Clinic of Modern Dentistry», 603155, Nizhny Novgorod, Russia

*The expression of toll-like and adhesive receptors on epithelial cells of the oral mucosa changes in different pathological conditions, both local and systemic levels, in particular, in chronic periodontitis. The long-term presence of periodontal pathogenic microorganisms in the gingival furrow stimulates and supports the inflammatory process. The interaction of periodontal pathogens with epithelial cells of the oral mucosa is the first stage of the development of periodontitis. The pathological process affects the function of epithelial cells, in particular their ability to interact with representatives of microbiocenosis. Therefore, the natural colonization of normal oral microbiota on buccal epitheliocytes, reflecting the ability of epithelial cells to microbial adhesion, is a sensitive indicator of various destabilizing processes. Determining the level of expression of toll-like TLR2 and TLR4 receptors on epithelial cells also allows us to assess the functional state of cells and the severity of the inflammatory process at the level of the oral mucosa, in particular, in chronic periodontitis. In this paper, we studied the receptor-dependent reactions of buccal epithelial cells in chronic periodontitis using flow cytometry and by determining the level of natural (microbial) colonization. The authors also compared these methods for determining the functional state of mucosal cells in chronic periodontitis. The results showed that in patients with periodontitis, the activity of receptors involved in adhesive reactions with the oral microbiota changed slightly and was little higher than in healthy donors. At the same time, the expression of TLRs on epithelial cells in periodontitis changed significantly. Thus, the percentage of cells expressing TLR2 significantly increased, while TLR4 decreased. Concurrently, the percentage of mucosal cells that do not have TLRs increased significantly in oral pathology. Thus, the study of TLR2 – and TLR4-expression on buccal epithelial cells is a more representative test in assessing the severity of the inflammatory process in chronic periodontitis than determining the level of natural colonization.*

**Key words:** toll-like receptors; TLRs natural microbial colonization; buccal epithelial cells; periodontitis.

**For citation:** Lukova O.A., Zaslavskaya M.I., Makhrova T.V., Kropotov V.S., Kitaeva E.V. Expression of toll-like and adhesive receptors on epithelial cells of the oral mucosa in periodontitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 645-648 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-645-648>

**For correspondence:** Lukova O.A., PhD, senior lecturer, Department of epidemiology, Microbiology and evidence-based medicine; e-mail: [olga\\_domracheva@bk.ru](mailto:olga_domracheva@bk.ru)

**Information about authors:**

Lukova O. A., <https://orcid.org/0000-0001-7552-9994>;  
Zaslavskaya M.I., <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>;  
Makhrova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-6469-8987>;  
Kropotov V.S., <https://orcid.org/0000-0002-6903-962X>;  
Kitaeva E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6704-1825>.

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 18.06.2020  
Accepted 23.06.2020

**Введение.** Болезни пародонта широко представлены среди воспалительных заболеваний полости рта [1,2]. Известно, что пародонтит – заболевание воспалительно-деструктивного характера [2]. Длительное присутствие пародонтопатогенных микроорганизмов в десневой борозде стимулирует и поддерживает воспалительный процесс. При этом вовлекаются клеточные и гуморальные факторы иммунитета, что способствует разрушению эпителия и соединительнотканной структуры пародонта, а также усиливает резорбцию костной ткани [3,4].

Взаимодействие пародонтопатогенов с эпителиальными клетками слизистых оболочек рта является первым этапом развития пародонтита [2]. Развитие патологического процесса влияет на функции эпителиоцитов [5], в частности, на их способность взаимодействовать с представителями микробиоценоза. Поэтому, естественная колонизация нормальной микробиоты полости рта на буккальных клетках, отражающая способность эпителиоцитов к микробной адгезии, является чувствительным индикатором различных патологических состояний, как местного, так и системного уровня, в частности, при хроническом пародонтите [6].

Способность эпителиоцитов распознавать молекулярные структуры патогенов осуществляется особым классом клеточных рецепторов – toll-подобными рецепторами (TLRs) [7,8]. Различные варианты TLRs нацелены на распознавание определенных молекулярных мотивов – PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) бактериального, грибкового, вирусного или иного происхождения [9]. При этом для эпителиоцитов слизистых оболочек наиболее значимую роль играют TLR2 и TLR4 [10,11].

В зависимости от типа и продолжительности TLR-зависимого воздействия микробных компонентов на эпителиоциты, наблюдается различный спектр и уровень продукции медиаторов воспаления, что определяет характер и интенсивность TLR- опосредуемого иммунного ответа [12,13].

Наличие toll-подобных рецепторов и их генов у клеток слизистых оболочек можно оценивать при помощи различных методов, например, иммуногистохимии и ПЦР [5]. Для выполнения настоящей работы нами был разработан оригинальный способ оценки экспрессии TLRs на поверхности буккальных эпителиоцитов методом проточной цитофлуориметрии.

Цель исследования – сравнительная оценка рецептор-зависимых реакций буккальных эпителиоцитов при

пародонтите, основанная на определении способности мукозальных клеток к экспрессии toll-подобных рецепторов (TLR2 и TLR4) и уровня адгезии нормальной микробиоты (естественная колонизация) полости рта.

**Материал и методы.** Исследовали буккальные эпителиоциты, полученные от здоровых некурящих доноров ( $n=14$ ) и больных пародонтитом ( $n=15$ ) (мужчины и женщины 21-38 лет). Клетки собирали с внутренней поверхности щеки с утра, натошак, дважды отмывали (40g, 5 мин) забуференным физиологическим раствором (ЗФР) и подготавливали взвесь с концентрацией  $10^8$ кл/мл. Концентрацию эпителиоцитов определяли на денситометре DEN-1 (ООО «Biosan», Латвия) путем измерения оптической плотности суспензии.

Уровень естественной (микробной) колонизации оценивали путем подсчета количества бактериальных клеток, адгезированных на эпителиоците. Мазки готовили из взвеси буккальных эпителиоцитов, фиксировали метанолом (10 мин) и окрашивали 0,25% водным раствором азура А (“Sigma”, США). Индекс естественной колонизации оценивали по числу бактериальных клеток в пересчете на один эпителиоцит (бакт/эп). Учитывали средний уровень микробной колонизации после подсчета 100 эпителиоцитов.

Жизнеспособность и уровень экспрессии toll-подобных рецепторов буккальных эпителиоцитов определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II System with Fluidics Cart (6-color, blue/red, USA) по собственной оригинальной методике [14].

Эксперименты каждой серии ставили в трех повторениях. Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы FacsDiva 4.1. и вычисляли в процентах, как отношение числа буккальных эпителиоцитов, экспрессирующих на своей поверхности TLR2 и/или TLR4 к общему количеству жизнеспособных клеток в популяции.

Статистическую обработку проводили с использованием компьютерных программ Stadia и Excel. Определяли среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего арифметического (m). Применяли критерий Стьюдента, статистически достоверными различиями между выборками считали уровень значимости  $p < 0,05$ . Если распределение данных в выборках не могло характеризоваться как нормальное, использовали критерий Манна-Уитни и рассчитывали медиану показателя (Me). Силу корреляционной связи определяли по значению коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ): ни-

**Процент эпителиальных клеток в популяции, способных к экспрессии TLR2, TLR4 среди здоровых людей и при пародонтите полости рта**

Показатели Субпопуляции эпителиоцитов	Доля субпопуляции клеток в общей популяции эпителиоцитов, %		Кратность изменения субпопуляции клеток (количество раз)
	Здоровые доноры (контроль)	Пациенты с пародонтитом	
TLR2- субпопуляция: общее количество клеток, способных экспрессировать TLR2	11,8 ± 5,2	29,3 ± 10,3* ↑	2,5 ± 0,2*↑
TLR4- субпопуляция: общее количество клеток, способных экспрессировать TLR4	75,6 ± 15,5	54,1 ± 17,3* ↓	1,4 ± 0,1*↓
TLR2/4-негативные клетки	24,1 ± 4,1	44,0 ± 4,7* ↑	1,8 ± 0,2*↑

Примечание. \* - достоверность различий относительно здоровых доноров ( $p < 0,05$ ). ↑ – увеличение показателя относительно здоровых доноров, ↓ – снижение показателя относительно здоровых доноров.

же 0,3 считали слабой, от 0,3 до 0,7 – средней и от 0,7 до 1,0 – сильной.

**Результаты.** Жизнеспособность эпителиальных клеток полости рта, полученных от больных с воспалением пародонта, не отличалась от соответствующего показателя у здоровых людей. Так, процент живых клеток в пуле мукозальных эпителиоцитов у больных с пародонтитом составлял  $99,7 \pm 0,2$ , а у здоровых пациентов –  $99,1 \pm 0,5$  ( $p > 0,05$ ).

Уровень естественной колонизации буккальных эпителиоцитов при пародонтите составлял  $36,4 \pm 27,1$  бакт/эп, что было несколько больше, чем у здоровых людей –  $14,3 \pm 8,9$  бакт/эп ( $p > 0,05$ ). При этом медиана показателя естественной колонизации у больных соответственно выше, чем у здоровых ( $Me = 31,7$  и  $Me = 15,3$ ).

На следующем этапе исследовали экспрессию TLR2 и TLR4 на поверхности буккальных эпителиоцитов, которую оценивали только среди жизнеспособных клеток пула. В общей популяции эпителиоцитов определяли процент (долю) клеток, принадлежащих к следующим субпопуляциям:

- 1) экспрессирующие только TLR2;
- 2) экспрессирующие только TLR4;
- 3) экспрессирующие одновременно TLR2 и TLR4 (TLR2/4-позитивные клетки);
- 4) TLR2-субпопуляция/TLR2-позитивные клетки – общее количество клеток, способных экспрессировать TLR2 (сумма субпопуляций 1 и 3);
- 5) TLR4-субпопуляция/TLR4-позитивные клетки – общее количество клеток, способных экспрессировать TLR4 (сумма субпопуляций 2 и 3);
- 6) TLR2/4-негативные клетки – группа клеток, не экспрессирующие ни одного вышеуказанного рецептора.

Было отмечено, что на фоне патологического процесса – хронического пародонтита – наблюдали значительные изменения уровня экспрессии TLR2 и TLR4 среди эпителиоцитов, при этом сдвиг в субпопуляции TLR2-позитивных эпителиоцитов был наиболее выражен. Среди здоровых доноров процент буккальных эпителиоцитов, имеющих TLR2, был небольшим: чуть более, чем 1/10 от общей популяции, а процент эпителиоцитов, способных экспрессировать TLR4 был изначально довольно высок – более 3/4 популяции.

Количество эпителиоцитов, экспрессирующих TLR2 у больных с хроническим пародонтитом увеличивалось в  $2,5 \pm 0,2$  ( $p < 0,05$ ), а TLR4 – уменьшалось в  $1,4 \pm 0,1$  раза ( $p < 0,05$ ). Также увеличивалось общее число клеток, не экспрессирующих ни один из указанных рецепторов в  $1,8 \pm 0,2$  раза ( $p < 0,05$ ) (см. таблицу). Анализ данных показал отсутствие корреляции между изменениями в активности адгезивного рецепторного аппарата эпите-

лиоцитов (уровень естественной колонизации) и изменениями экспрессии TLR2 и TLR4 на буккальных клетках при пародонтите ( $r = 0,22$  и  $r_s = -0,17$  соответственно).

**Обсуждение.** При расчете показателя центральной тенденции – медианы – было выявлено, что воспаление пародонта усиливает адгезивные свойства эпителия полости рта, что выражается в повышении уровня естественной микробной колонизации буккальных клеток у большинства пациентов ( $p > 0,05$ ). В то же время, способность мукозальных эпителиоцитов экспрессировать TLR2 и TLR4 при пародонтите изменялась очень существенно: достоверно увеличивалось количество TLR2-позитивных клеток ( $p < 0,05$ ) и снижалось количество TLR4-позитивных клеток в популяции ( $p < 0,05$ ). При этом, изменения адгезивной активности эпителиальных клеток и их способности к экспрессии различных TLRs не имели корреляции.

Изменение уровня экспрессии TLR2 и TLR4 на клетках могло быть, предположительно, связано со следующими событиями. В норме, у эпителиальных клеток полости рта сравнительно низкая экспрессия гена, ответственного за синтез TLR2. При пародонтите, медиаторы воспаления и антигены пародонтопатогенных микроорганизмов активируют эпителиальные клетки, что вызывает усиление экспрессии TLR2 и соответствующее увеличение общего числа TLR2-позитивных эпителиоцитов. В то же время, экспрессия гена TLR4 у мукозальных эпителиоцитов, в норме, довольно высока. Дополнительная стимуляция клеток в ходе воспаления может привести к синтезу избыточного количества рецепторов и их последующего шеддинга (сбрасывания) с поверхности клеток, что характеризуется в уменьшении процента TLR4 – позитивных эпителиоцитов в популяции. Таким образом, изменение пейзажа TLR2 и TLR4 на поверхности клеток является отражением способности клетки отвечать на стимулы. На потерю мембранных рецепторов TLRs эпителиоцитами при пародонтите указывает также и то, что количество TLR2/4-негативных клеток (не способных экспрессировать данные TLRs) резко увеличивается при патологии, причем за счет субпопуляций, ранее способных к экспрессии данных рецепторов. Это показывает, что при воспалении возрастает пул «функционально старых» (ареактивных) клеток, не способных более отвечать на стимулы. Таким образом, исследование эпителиоцитов, экспрессирующих TLR2 и/или TLR4 позволяет оценить функциональное состояние клеток слизистых оболочек, а также влияние на них воспалительного процесса, в частности при хроническом пародонтите.

Таким, образом, было проведено сравнение двух способов оценки функционального состояния мукозальных



клеток при хроническом пародонтите. Было отмечено, что, по данным исследования естественной колонизации, изменение активности адгезивного аппарата эпителиоцитов, участвующего в рецептор-зависимых взаимодействиях с нормальной микробиотой, было незначительным ( $p>0,05$ ), хотя и имело тенденцию к увеличению. В то же время, изменение экспрессии TLR-2 и TLR-4 на эпителиальных клетках всегда было статистически-значимым ( $p<0,05$ ), что делает данный способ определения функционального состояния эпителиоцитов при воспалении полости рта более предпочтительным.

**Выводы:**

1. Уровень естественной колонизации эпителиоцитов у большинства пациентов с хроническим пародонтитом увеличивается по сравнению с тем же показателем у здоровых.

2. При пародонтите существенно меняется соотношение эпителиальных клеток, способных к экспрессии TLR2 и TLR4. При этом процент клеток, экспрессирующих TLR2, достоверно увеличивается, а TLR4 – уменьшается; одновременно возрастает число буккальных эпителиоцитов, не имеющих TLR2 и TLR4.

3. Определение экспрессии TLRs на буккальных эпителиоцитах является более чувствительным способом оценки функционального состояния мукозальных клеток и микроб-зависимого воспаления в полости рта при пародонтите, чем исследование естественной микробной колонизации.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4, 7, 8, 10-13  
см. REFERENCES)

2. Цепов Л.М., Михеева Е.А., Голева Н.А., Нестерова М.М. Хронический генерализованный пародонтит: Ремарки к современным представлениям. *Пародонтология*. 2010; 15.1(54): 3-7.
3. Лепеева Н.А., Ермолаева Л.А., Шишкин А.Н. Состояние тканей пародонта у больных метаболическим синдромом. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. 2012;(3): 145-52.
5. Полякова В.О., Пальцева Е.М., Крулевский В.А. Буккальный эпителий. Новые подходы к молекулярной диагностике социально значимой патологии. *СПб.: Н-Л*; 2015.
6. Лукова О.А., Пышкина Е.И., Клеменова И.А., Шебашова Н.В., Махрова Т.В., Заславская М.И. Способ оценки эффективности комплексной терапии с использованием иммуномодуляторов при хронических дерматологических заболеваниях. *Современные технологии в медицине*. 2017; 9(1): 98-102. doi.org/10.17691/stm2017.9.1.12
9. Шабашова Н. В., Данилова Е.Ю. Местный иммунитет и микробиота ротовой полости (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2015; 17 (4): 4-13.

14. Заславская М.И., Александрова Н.А., Китаева Е.В., Лукова О.А., Махрова Т.В., Кропотов В.С. Экспрессия toll-подобных рецепторов на буккальных эпителиоцитах при кандидозе ротовой полости. *Проблемы медицинской микологии*. 2019; 21(3): 24-6.

REFERENCES

1. Dahlen G., Basic A., Bylund J. Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevices and in the Pathogenesis of Periodontal Disease. *J. Clin. Med.* 2019;(8):1339. doi.org/10.3390/jcm8091339.
2. Tsepov L.M., Mikheeva E.A., Goleva N.A., Nesterova M.M. Chronic generalized periodontitis: Remarks to modern ideas. *Parodontologiya*. 2010; 15.1(54): 3-7. (in Russian)
3. Lepeeva N.A., Ermolaeva L.A., Shishkin A.N. The condition of periodontal tissues in patients with metabolic syndrome. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Meditsina*. 2012;(3): 145-52. (in Russian)
4. Ross K. F., Herzberg M.C. Autonomous immunity in mucosal epithelial cells: fortifying the barrier against infection. *Microbes Infect.* 2016; 18(6):387-98. doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.008.
5. Polyakova V.O., Pal'tseva E.M., Krulevskiy V.A. Buccal epithelium. New approaches to molecular diagnostics of socially significant pathology. St. Petersburg: N-L; 2015. (in Russian)
6. Lukova O.A., Pyshkina E.I., Klemenova I.A., Shebashova N.V., Makhrova T.V., Zaslavskaya M.I. A method for evaluating the effectiveness of complex therapy using immunomodulators in chronic dermatological diseases. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2017; 9(1): 98-102. doi.org/10.17691/stm2017.9.1.12. (in Russian)
7. McClure R., Massari P. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Immunol.* 2014;12(5): 386. doi.org/10.3389/fimmu.2014.00386.
8. Fernández A., Cárdenas A.M., Astorga J., Veloso P., Alvarado A., Merino P. et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Clinical Oral Investigations*. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02861-9>
9. Shabashova N.V., Danilova E.Yu. Local immunity and oral microbiota (review). *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2015; 17 (4): 4-13. (in Russian)
10. Sasai M., Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by toll-like receptors. *Int. Rev. Immunol.* 2013;32 (2): 116-33. doi.org/10.3109/08830185.2013.774391.
11. AlQallaf H., Hamada Y., Blanchard S., Shin D., Gregory R. Srinivasan M. Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. *PLOS ONE*. 2018;13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200231>.
12. González-Rascón A., Mata-Haro V. MicroRNAs: Regulators of TLR2-mediated probiotic immune responses. *MicroRNA*. 2015;4(3):168-74. <https://doi.org/10.2174/2211536605666151208123209>.
13. Botos I., Segal D. M., Davis D.R. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*. 2011; 19 (4): 447-59. doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004.
14. Zaslavskaya M.I., Aleksandrova N.A., Kitaeva E.V., Lukova O.A., Makhrova T.V., Kropotov V.S. Expression of toll-like receptors on buccal epithelial cells in oral candidiasis. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2019; 21(3): 24-6. (in Russian)

Поступила 18.06.20

Принята к печати 23.06.20



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Степанов М. С., Годовалов А. П., Кобзаренко Е. Е., Фадеева М. В., Гирь Э. А.

## НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ БИОПЛЁНОК

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

Микробные биоплёнки представляют разнородные, способные к движению и постоянно изменяющиеся сообщества микроорганизмов, нередко разных таксонов. Подходы к изучению и оценке действия антибиоплёночных препаратов, широко представленные сегодня, не позволяют адекватно оценить их эффекты, в то время как именно результаты изучения взаимодействия лекарственных препаратов с компонентами биоплёнки могут обеспечить как можно более правильный выбор стратегии терапии. Цель исследования – апробация нового способа морфологической оценки биоплёнки. Для формирования биоплёнок использован подход, когда предметное стекло располагали по отношению к чашке Петри под углом в 30°-45°, в пространство между чашкой Петри и предметным стеклом заливали взвесь тест-штаммов *S. epidermidis* в мясо-пептонном бульоне. Рядом с предметным стеклом укладывали стерильный ватный тампон, смоченный дистиллированной водой, для создания оптимальной влажности. Система помещалась в термостат на 24 часа. Сформированные плёнки исследовались под микроскопом при помощи видеоокуляра DCM 310 и программы Scope photo x86, 3.1.312., позволяющей провести полное морфометрическое исследование плёнки: выделить слои, каналы, полости, произвести замеры с последующим сохранением результатов на электронном носителе в формате файлов jpg. При микроскопии окрашенного препарата установлено, что биоплёнка имеет слоистое строение. В каждом изображении, полученном с помощью видеоокуляра, можно дифференцировать 4 слоя. От границы двух сред внутри: слой фрагментации, плотный слой, слой матричного вещества, слой персистеров. Через всю толщину биоплёнки наблюдаются каналы разного диаметра (от 10 до 24 мкм). Используемый подход позволяет визуализировать и оценить структуру микробной биоплёнки, измерить толщину слоёв и диаметры каналов. Способ может быть использован для изучения действия антимикробных препаратов на бактериальные плёнки.

**Ключевые слова:** микробные биоплёнки; структура; морфологические особенности; *S. Epidermidis*; метод.

**Для цитирования:** Степанов М. С., Годовалов А. П., Кобзаренко Е. Е., Фадеева М. В., Гирь Э. А. Новый подход к изучению морфологической структуры микробных биоплёнок. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 649-651. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-649-651>

Stepanov M. S., Godovalov A. P., Kobzarenko E. E., Fadeeva M. V., Gyr E. A.

A NEW APPROACH FOR THE STUDY OF THE MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF MICROBAL BIOFILMS

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

Microbial biofilms are heterogeneous, moving and constantly changing communities of microorganisms, often of various taxons. Approaches to study and assessment anti-biofilm drugs widely available today do not adequately assess their effects, while the results of studying the interaction of drugs with components of the film composition can provide them the right choice. The aim of investigation was to test a new method of morphological evaluation of biofilms. To form biofilms, we used an approach when the slide was placed at an angle of 30°-45° relatively to the Petri dish, and a suspension of test strains *S. epidermidis* in peptone broth was poured into the space between the Petri dish and the slide. A sterile cotton swab moistened with distilled water was placed next to the glass slide to create optimal humidity. The system was placed in a thermostat for 24 hours. The formed films were examined under a microscope using the DCM 310 video eyepiece and the Scope photo x86,3.1.312 program that allowed to conduct a complete morphometric study of the film: select layers, channels, cavities and make measurements, and then save the results on electronic media in jpg file format. Microscopy of the stained slides revealed that the biofilm has a layered structure. In each image obtained using a video eyepiece, it was possible to differentiate 4 layers. From the border of the two media to the inside: the fragmentation layer, the dense layer, the matrix substance layer, and the last one – the persistence layer. Channels of different diameters (from 10 to 24 microns) are observed across the entire thickness of the biofilm. Thus, used approach allows us to visualize and evaluate the structure of microbial biofilm, measure the thickness of layers and channel diameters. In addition, this method can be used to study the effect of antimicrobial drugs on bacterial films.

**Key words:** microbial biofilms; structure; morphological features; *S. epidermidis*; method.

**For citation:** Stepanov M. S., Godovalov A. P., Kobzarenko E. E., Fadeeva M. V., Gyr E. A. A new approach for the study of the morphological structure of microbial biofilms. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (10): 649-651 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-649-651>

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

### Information about authors:

Stepanov M.S., <http://orcid.org/0000-0002-3994-5461>;  
Godovalov A.P., <http://orcid.org/0000-0002-5112-2003>;  
Kobzarenko E.E., <http://orcid.org/0000-0001-6130-8402>;  
Fadeeva M.V., <http://orcid.org/0000-0003-0249-4772>;  
Gyr E.A., <http://orcid.org/0000-0003-3519-3394>.

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

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

Received 12.05.2020  
Accepted 15.05.2020

**Введение.** Микробные биоплёнки представляют разнородные, способные к движению и постоянно изменяющиеся сообщества микроорганизмов, нередко разных таксонов. Состав биоплёнки можно разделить на две части: клеточную и матрикс, способный защитить микроорганизмы от неблагоприятных факторов, действующих на биоплёнку, в том числе от эффекторов иммунитета и антимикробных средств [1, 2]. Проведено много исследований, раскрывающих роль различных компонентов биоплёнки и их функции. Исследован состав матрикса, биоплёнкообразование в условиях живого организма, действие факторов физической и химической природы на биоплёнку [3, 4]. Многие аспекты жизнедеятельности микробного сообщества в виде биоплёнки остаются нераскрытыми. Существующие методы визуализации биоплёнок не позволяют дифференцировать компоненты их состава, так как используемые красители способны формировать комплексы, как с внутриклеточными, так и с внеклеточными структурами. Ввиду этого, невозможно точно определить субстрат окрашивания. Подходы по изучению и оценке антибиоплёночных препаратов [5-7], широко представленные сегодня, не позволяют достаточно адекватно оценить их эффекты, в то время как именно результаты изучения взаимодействия лекарственных препаратов с компонентами плёночного состава могут обеспечивать их правильный выбор [8, 9].

Цель исследования – апробация нового способа морфологической оценки биоплёнки.

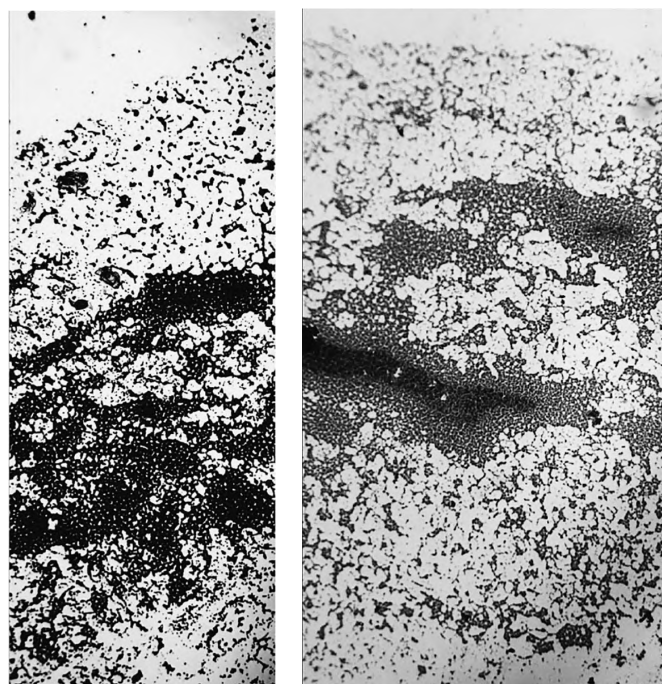
**Материал и методы.** Для формирования биоплёнок использован подход, когда предметное стекло располагали по отношению к чашке Петри под углом в 30°-45°, в пространство между чашкой Петри и предметным стеклом заливали взвесь тест-штаммов *S. epidermidis* ATCC 28922 в мясо-пептонном бульоне (МПБ). Создается разделение сред «жидкость-воздух», что приближается к идеальным условиям для формирования биоплёнки. Рядом с предметным стеклом укладывали стерильный ватный тампон, смоченный дистиллированной водой, для создания оптимальной влажности. Система помещалась в термостат на 24 часа. После 24-часовой инкубации стекло извлекали и промывали забуференным физиологическим раствором и после непродолжительного подсушивания фиксировали в пламени спиртовки с последующей окраской по методу Грама. Сформированные биоплёнки исследовались под микроскопом при помощи видеоокуляра DCM 310 и программы Score photo x86, 3.1.312., позволяющей провести полное морфометрическое исследование биоплёнки: выделить слои, каналы, полости, произвести замеры с последующим сохранением результатов на электронном носителе в формате файлов jpg [10].

**Результаты.** При микроскопии окрашенного препарата установлено, что биоплёнка имеет слоистое строение. В каждом изображении, полученном с помощью видеоокуляра, можно дифференцировать 4 слоя (см. рисунок, а). Они отличаются по размеру, густоте заселения микроорганизмами и содержанию матриксного вещества. Данные особенности морфологии слоёв по-

зволили обозначить их. От границы двух сред внутри: слой фрагментации, плотный слой, слой матриксного вещества, слой персистеров. Через всю толщу биоплёнки наблюдаются каналы разного диаметра (от 10 до 24 мкм). Самый первый слой, наружный (193±20 мкм), образовавшийся на границе двух сред, имеет интенсивную окраску по Граму, содержит большое количество микроорганизмов, находящихся в состоянии покидания материнской биоплёнки. Этот слой объясняет стадию фрагментации в морфо- и патогенезе биоплёнкообразования, он содержит микрочастицы, готовые к отрыву и колонизации новых сайтов. Следующий слой – плотный, значительно больше первого (269±41 мкм;  $p < 0,05$  к размеру наружного слоя), здесь находится основная масса микроорганизмов, принимающих участие в метаболизме, построении и фрагментации биоплёнки. Эта зона является основным местом обитания микроорганизмов. Биоплёнка – открытая формация, взаимодействующая с окружающей средой [11]. Все продукты жизнедеятельности и токсины сбрасываются через пронизывающую биоплёнку систему каналов и цистерн, предназначенных для запасаения каких-либо полезных веществ и удаления продуктов обмена биоплёнок [12]. В ряде случаев система каналов и цистерн делит этот слой на равные части (см. рисунок, б). Предпоследним слоем является слой матриксного вещества (508±50 мкм;  $p < 0,05$  при сравнении с размерами предыдущих слоев), содержащий лишь единичные вкрапления микроорганизмов на большом протяжении. Предполагается, что данный слой ответственен за сохранение и существование бактерий-персистеров и является хранилищем питательных веществ. Последний слой составляют сами клетки-персистеры, имеющие слабую приверженность к окраске, представляющие резерв микробной популяции, реализующийся в неблагоприятных для биоплёнки условиях.

**Обсуждение.** Располагаясь в организме или на абиотических объектах, биоплёнка имеет трёхмерную структуру, которую ограничивают лишь резкие границы изменения факторов (например, разделение двух сред). Существует много методов визуализации биоплёнок, среди которых широко применяемым является способ G. O'Toole [13], использующий плоскодонный иммунологический планшет. В этом случае биоплёнка образуется в лунке планшета, и при визуализации её с помощью микроскопа будет представлять напластования слоёв без возможности дифференциации. Представленный в эксперименте способ позволяет увидеть биоплёнку на протяжении предметного стекла от начала накопления биомассы до границы воздуха. Метод не позволяет увидеть трёхмерную структуру пленки, но даёт яркую картину среза, проецированного на исследуемое стекло. Преимущество метода заключается в том, что он удобен для окрашивания любым способом, позволяющим выделить субстрат каждого слоя биоплёнки, сформированного тем или иным микроорганизмом, что в последующем поможет судить о биохимическом составе исследуемой формации.

**Заключение.** Использованный подход позволяет визуализировать и оценить структуру микробной био-



*a*

*б*

Морфологическая структура биопленки *Staphylococcus epidermidis*. *a* – слоистая структура, *б* – показан плотный слой, пронизанный системой каналов и цистерн. Окраска по Граму. Ув.  $\times 10$ .

плёнки, измерить толщину слоёв и диаметры каналов. Способ может быть применён для изучения действия антимикробных препаратов на бактериальные плёнки.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-7, 9, 12, 13 см. REFERENCES)

1. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Маянский Н.А. Матрикс микробных биопленок. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016; 18(1): 9-19.
2. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биоплёнки: структура, регуляция, отторжение. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 1:101-8.
3. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10): 632-4.

4. Петрова Н.В. Биоплёнки: этапы формирования, свойства и клинические последствия. *Клиническая патофизиология*. 2015; 3: 9-16.
8. Годовалов А.П., Степанов М.С., Яковлев М.В., Кобзаренко Е.Е., Батог К.А. Определение биоплёнкообразующей активности микроорганизмов на синтетических полимерных материалах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(12): 758-61.
10. Годовалов А.П., Степанов М.С., Кобзаренко Е.Е. Способ оценки морфологической структуры биопленок микроорганизмов. Патент РФ № RU 2719402 C1; 2020.
11. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г. Ультраструктура микробных биопленок при межклеточных взаимоотношениях бактерий в сообществах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 4:87-92.

#### REFERENCES

1. Chebotar' I.V., Mayanskiy A.N., Mayanskiy N.A. The matrix of microbial biofilms. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2016; 18(1): 9-19. (in Russian)
2. Mayanskiy A.N., Chebotar' I.V. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2011; 1:101-8. (in Russian)
3. Godovalov A.P., Karpunina T.I. Determination of the component composition of biofilms of gram-positive bacteria. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(10): 632-4. (in Russian)
4. Petrova N.V. Biofilms: stages of formation, properties and clinical consequences. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2015; 3: 9-16. (in Russian)
5. Kumar A., Alam A., Rani M., Ehtesham N.Z., Hasnain S.E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017; 307(8):481-9.
6. Stewart P.S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol Spectr.* 2015; 3(3):10.
7. Yin W., Wang Y., Liu L., He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(14): 3423.
8. Godovalov A.P., Stepanov M.S., Yakovlev M.V., Kobzarenko E.E., Batog K.A. Determination of biofilm-forming activity of microorganisms on synthetic polymeric materials. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(12): 758-61. (in Russian)
9. Yan J., Bassler B.L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe*. 2019; 26(1):15-21.
10. Godovalov A.P., Stepanov M.S., Kobzarenko E.E. A method for evaluating the morphological structure of biofilms of microorganisms. Patent RF № RU 2719402 C1; 2020. (in Russian)
11. Rybal'chenko O.V., Bondarenko V.M., Orlova O.G. Ultrastructure of microbial biofilms in intercellular relationships of bacteria in communities. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2014; 4: 87-92.
12. Otto M. Staphylococcal Biofilms. *Microbiol. Spectr.* 2018; 6(4):10.
13. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47: 2437.

Поступила 12.05.20

Принята к печати 15.05.20



Немченко У.М.<sup>1</sup>, Кунгурцева Е.А.<sup>1</sup>, Григорова Е.В.<sup>1</sup>, Белькова Н.Л.<sup>1</sup>, Маркова Ю.А.<sup>2</sup>, Носкова О.А.<sup>1</sup>,  
Чемезова Н.Н.<sup>1</sup>, Савилов Е.Д.<sup>1</sup>

## МОДЕЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК И ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ, К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕМУ СРЕДСТВУ СЕКУСЕПТ АКТИВ

<sup>1</sup>ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, 664003, Иркутск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений, 664033, Иркутск, Россия

*Изучено действие дезинфицирующего средства Секусепт актив (ДС СА), препарата на основе надуксусной кислоты, на штаммы микроорганизмов, выделенных от пациентов с тяжёлыми инфекционными заболеваниями, находившихся на лечении в детском многопрофильном стационаре регионального уровня. При идентификации культуры отнесены к грамотрицательным неферментирующим бактериям (НГОБ) (22 штамма), семейству Enterobacteriaceae (18 штаммов), к бациллам – 3 штамма. Бицидную активность ДС СА оценивали по степени ингибирования роста бактерий, находящихся в планктонной форме и в биоплёнке (БП) (на плоскостном пластиковом иммунологическом планшете). Способностью образовывать БП обладали все исследуемые штаммы, большая их часть (67,4%) формировала умеренно выраженные БП, особенно выраженный коэффициент биоплёнокообразования имели НГОБ. Выбранные концентрации ДС СА подавляли рост планктонных клеток, способность ДС препятствовать образованию БП зависела от концентрации (наиболее эффективны концентрации 0,8 и 3,0%). Чувствительность к воздействию ДС культур, находящихся в зрелых БП, значимо ниже, особенно устойчивы к такому влиянию БП, сформированные НГОБ и представители сем. Enterobacteriaceae. Подтверждена важность тестирования эффективности биоцидов не только в соответствии со стандартными методиками, разработанными для микроорганизмов, находящихся в планктонной форме, но и в отношении БП.*

**Ключевые слова:** биоциды; Секусепт актив; микроорганизмы; устойчивость; инфекции; связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП); планктонные бактерии; биоплёнки.

**Для цитирования:** Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Маркова Ю.А., Носкова О.А., Чемезова Н.Н., Савилов Е.Д. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 652-658. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658>

Nemchenko U.M.<sup>1</sup>, Kungurtseva E.A.<sup>1</sup>, Grigorova E.V.<sup>1</sup>, Belkova N.L.<sup>1</sup>, Markova Y.A.<sup>2</sup>, Noskova O.A.<sup>1</sup>, Chemezova N.N.<sup>1</sup>, Savilov E.D.<sup>1</sup>

### SIMULATION OF BACTERIAL BIOFILMS AND ESTIMATION OF THE SENSITIVITY OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTION PATHOGENS TO BACTERICIDE SEKUSEPT ACTIVE

<sup>1</sup>Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia;

<sup>2</sup>Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants, Irkutsk, Russia

*The effect of bactericide Sekusept active (B SA), a peracetic acid-based preparation, on microbial strains, isolated from patients with severe infectious diseases who were treated in a regional children's multi-specialty hospital, was studied. Based on the biochemical identification, the strains were classified as gram-negative non-fermenting bacteria (22 strains), Enterobacteriaceae family (18 strains), and bacilli – 3 strains. The biocidal activity of B SA was evaluated by the degree of inhibition of the growth of bacterial cells, existing in the planktonic form and in the form of biofilm (on a flat-bottomed plastic immunological tablet). It was shown that all the studied strains had the ability to biofilm formation, most of them (67,4%) formed moderately pronounced biofilms, and non-fermenting bacteria had a particularly pronounced coefficient of biofilm formation. The selected concentrations of B CA inhibited the growth of planktonic cells, and the ability of bactericide to prevent the formation of biofilms depended on the concentration (the most effective concentrations were 0,8 and 3,0%). Sensitivity of the strains existed in the aged biofilm to the bactericide was significantly lower, especially resistant to this effect were biofilms formed by non-fermenting bacteria and representatives of fam. Enterobacteriaceae. Our results confirm the importance of testing the effectiveness of biocides not only in accordance with standard methods developed for microorganisms in planktonic form, but also for biofilms.*

**Key words:** bactericide; Sekusept active; microorganisms; resistance; healthcare-associated infection; planktonic bacteria; biofilms.

**For citation:** Nemchenko U.M., Kungurtseva E.A., Grigorova E.V., Belkova N.L., Markova Y.A., Noskova O.A., Chemezova N.N., Savilov E.D. Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (10): 652-658. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658>

**For correspondence:** Nemchenko U.M., PhD of biological Sciences, researcher of the laboratory of the microbiome and microecology; e-mail: [umnemch@mail.ru](mailto:umnemch@mail.ru)

#### Information about authors:

Nemchenko U.M., ORCID iD: 0000-0002-7656-342;

Kungurtseva E.A., ORCID iD: 0000-0002-4535-9397;

Grigorova E.V., ORCID iD: 0000-0001-6588-2591;



Belkova N.L., ORCID iD: 0000-0001-9720-068X;  
Markova Y.A., ORCID iD: 0000-0001-7767-4204;  
Chemezova N.N., ORCID iD: 0000-0001-5375-7785;  
Savilov E.D., ORCID iD: 0000-0002-9217-6876.

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

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

Received 20.04.2020  
Accepted 25.05.2020

**Введение.** Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), остаются глобальной мировой проблемой в силу широкого распространения, негативных последствий для здоровья пациентов, персонала медицинских учреждений и экономики государства [1-3]. Ежегодно в России регистрируется до 30 тыс. случаев ИСМП (официальная статистика), по мнению экспертов, эта величина достигает 2 млн. При этом длительность госпитализации пациентов с ИСМП возрастает трёхкратно, риск летального исхода – от 4 до 15 раз. Предполагают, что к 2050 г. число больных ИСМП достигнет 10 млн человек [2].

Наиболее тяжёлые формы ИСМП вызывают госпитальные штаммы, обладающие полирезистентностью к антимикробным препаратам (АМП). Инфекции, вызванные устойчивыми к АМП возбудителями, часто нивелируют не только результаты лечения в отделениях общего профиля и интенсивной терапии, но и результаты дорогостоящих высокотехнологичных и жизненно важных вмешательств [4].

Множественная резистентность госпитальной микрофлоры к АМП, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, обусловлена преимущественным её существованием в виде биоплёночных сообществ и микробных консорциумов, способных колонизировать организм пациента, адгезироваться на инвазивных медицинских изделиях [5].

Одним из приоритетных направлений профилактики ИСМП является совершенствование микробиологического мониторинга возбудителей ИСМП, в т. ч. повышение эффективности дезинфекционных мероприятий, которые относятся к ключевым направлениям эпидемиологического надзора при ИСМП. Данное направление включает (наряду с другими аспектами) разработку методики определения чувствительности / устойчивости госпитальных штаммов микроорганизмов к дезинфицирующим средствам (ДС), т. к. многие методические вопросы проведения мониторинга устойчивости к ДС по-прежнему остаются актуальными. Разработаны методические указания МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях» (утв. 13.03.2017). Указанные МУ распространяются на микроорганизмы, находящиеся в планктонной форме<sup>1</sup>. В составе биоплёнок (БП) клетки значительно более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической, биологической природы, в т. ч. АМП [6-8].

Результаты тестирования ДС на планктонных клетках не могут быть экстраполированы для прогнозирова-

ния эффективности ДС в отношении бактериальных БП [9,10]. Отсутствует быстрый воспроизводимый метод оценки эффективности АМП и ДС по отношению к БП. Исследований, направленных на изучение чувствительности бактериальных БП к ДС и АМП недостаточно [11-13].

Одним из высокоэффективных средств для дезинфекции, очистки и стерилизации медицинского оборудования является ДС Секусепт актив (ДС СА), содержащее в качестве активного компонента надуксусную кислоту, относящуюся к кислородсодержащей группе. ДС СА оказывает антимикробный эффект, разрушая клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий. Эффективен в отношении микобактерий туберкулёза, оказывает спороцидное действие. По степени воздействия на организм по ГОСТ 12.1.007-76 относится к 3 и 4 классу умеренно и малоопасных веществ [14].

Цель исследования – сравнительная оценка чувствительности возбудителей ИСМП, находящихся в планктонной и биоплёночной форме, к дезинфицирующему средству Секусепт актив.

**Материал и методы. Штаммы микроорганизмов.** Штаммы получены от пациентов с тяжёлыми инфекционными заболеваниями (сепсис, острый гематогенный остеомиелит, перитонит, пневмония) из отделений реанимации и интенсивной терапии детского многопрофильного стационара регионального уровня (г. Иркутск) в период с января 2018 г. по декабрь 2019 г. Материал для исследования – кровь, мокрота, смывы с трахеобронхиального дерева, зев, раневое отделяемое, жидкость из брюшной полости. Идентификацию клинических изолятов (43 штамма бактерий) осуществляли по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим свойствам. Выделенные культуры относились к НГОБ (22 штамма) и сем. *Enterobacteriaceae* (18 штаммов), к бациллам – 3 штамма.

**Дезинфицирующее средство.** Использовано кислородсодержащее ДС СА производства компании «Эколаб Дойчленд ГмбХ» (Германия). Согласно инструкции производителя для дезинфекции и стерилизации инструментов медицинского назначения при бактериальных, вирусных инфекциях и кандидозе рекомендуются концентрации 0,5; 1,0; 2,0%. Учитывая данные литературы о большей устойчивости БП к воздействию АМП и ДС по сравнению с планктонными формами, использованы более высокие концентрации ДС СА: 0,8; 1,5; 3,0%. Указанные концентрации готовили в стерильной дистиллированной воде при температуре 22-25°C.

**Подготовка культур.** Способность культур образовывать БП, ингибирование процесса биоплёнокообразования, деструкцию зрелой БП под действием ДС моделировали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-ти луночного стерильного плоскостонного пластикового иммунологического план-

<sup>1</sup> МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности в дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях» (утв. 13.03.2017)

шета. Использовали суточную культуру бактерий в планктонной форме, суспендированную в мясо-пептонном бульоне (МПБ). Стартовую концентрацию исследуемых культур доводили до одной оптической плотности (ОП), которая составила 0,200-0,300 единиц при длине волны 492 нм, что эквивалентно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл или 0,5 по McFarland. Тестируемые штаммы инокулировали в количестве 150 мкл в лунку планшета в 4-х повторностях. Контролем фона служил стерильный МПБ, так же вносимый в 4-х повторностях по 150 мкл.

**Ингибирование образования БП ДС.** Для определения способности ДС ингибировать образование БП в планшет с культурой вносили по 50 мкл ДС в тестируемых концентрациях, контролем служила стерильная вода. Планшеты культивировали во влажной камере в термостате в течение 48-ми час. По окончании срока инкубации планктонные клетки удаляли из лунок пипетированием, планшет трёхкратно промывали стерильной дистиллированной водой.

**Окраска БП и определение ОП.** В лунки добавляли 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% генциан-виолета и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Не связавшийся краситель удаляли путём трёхкратной отмывки дистиллированной водой. Затем в лунки добавляли по 200 мкл 95% этанола для экстракции связавшегося с биомассой красителя и измеряли ОП раствора при длине волны 492 нм. Для контрольных лунок все действия аналогичны. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени плёноко-

образования. Количественным выражением активности образования БП служили значения ОП, измеряемые на микропланшетном фотометре STAT FAX®4300 (Awareness Technology Inc, USA) [15,16].

**Деструкция ДС зрелых БП.** Для определения способности ДС разрушать зрелую БП из планшета с исследуемыми культурами через 48 час инкубации удаляли планктонные клетки, планшет трёхкратно промывали стерильной дистиллированной водой и вносили в каждую лунку по 150 мкл стерильной воды и 50 мкл ДС в тестируемых концентрациях. В контрольные лунки вносили 150 мкл стерильной воды. Планшеты инкубировали 24 час. Дальнейший порядок действий аналогичен вышеизложенному.

**Контроль биоплёнокообразования.** Для определения контрольных значений биоплёнокообразования культуры не подвергалась воздействию ДС. После 48-ми час инкубирования БП окрашивали по выше изложенной методике. Полученные в экспериментах значения ОП использовали для расчёта коэффициента биоплёнокообразования (КБП) и сравнивали между собой.

**Учёт результатов ОП.** КБП рассчитывали после измерения ОП окрашенных лунок во всех планшетах как отношение  $A_{492_{\text{эксп}}} / A_{492_{\text{контроль}}}$  [17,18]. Контролем служила ОП стерильного МПБ. Результаты интерпретировали следующим образом: при значениях КБП  $\leq 2$  единиц штаммы относили к слабообразующим БП; при КБП от 2 до 3,99 – штаммы обладали умеренной способностью к образованию БП; при КБП от 3,99 и выше – высокой способностью к образованию БП.

Влияние ДС СА на процессы ингибирования и деструкции БП определяли как отношение ОП БП, подвергшихся влиянию ДС, к ОП БП культур, не подвергавшихся влиянию ДС ( $\text{БП}_{\text{инг или дестр}} / \text{БП}_{\text{без ДС}}$ ) [19]. Для установления исходного уровня, превышение которого можно интерпретировать как способность ДС ингибировать образование или разрушать уже сформированную БП использованы следующие показатели:  $< 0,5$  ДС ингибирует или разрушает БП; от 0,5 до 0,7 – ДС слабо ингибирует или разрушает БП; от 0,7 и выше – ДС не ингибирует и не разрушает БП.

Прирост планктонных клеток в лунках планшета определяли по формуле:  $\text{ОП}_{\text{кон}} / \text{ОП}_{\text{нач}}$ , где  $\text{ОП}_{\text{кон}}$  – оптическая плотность суспензии планктонных клеток бактерий через 48 ч культивирования,  $\text{ОП}_{\text{нач}}$  – исходная

Таблица 1

Исследованные микроорганизмы

Вид	Количество штаммов
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Serratia marcescens</i>	3
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Bacillus</i> spp.	3

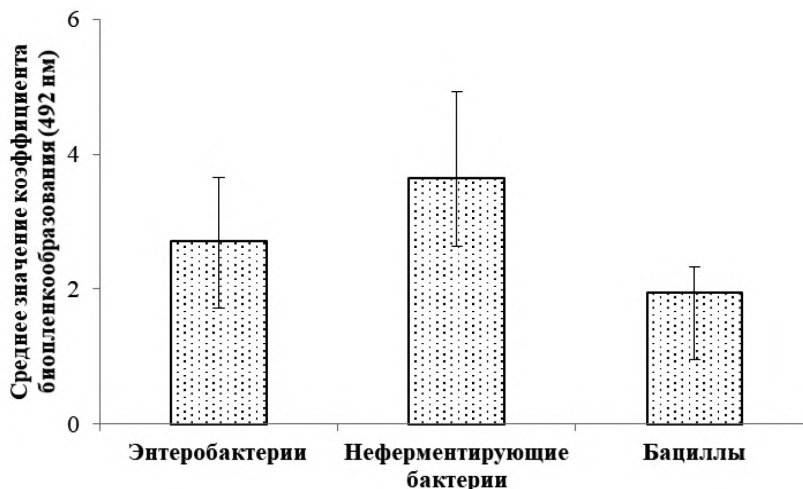


Рис. 1. Среднее значение коэффициента биообразования у разных видов возбудителей ИСМП.

Таблица 2

**Планктонные клетки культур, рост которых варьировал под действием ДС СА (абс./%)**

Концентрация ДС СА (%)	Отсутствие роста	Слабый рост	Значительный рост
0*	1 / 2,3	3 / 7,0	39 / 90,7
0,8	32 / 74,4	8 / 18,6	3 / 7,0
1,5	30 / 69,7	13 / 30,3	–
3,0	29 / 67,4	14 / 32,6	–

Примечание. \* – ДС СА подавляет рост планктонных клеток, разница значима между ОП до и после воздействия ДС ( $p < 0,001$ ).

Таблица 3

**Влияние ДС СА на образование БП (доля чувствительных биопрёнкообразующих культур, %)**

Концентрация ДС СА, %	Соотношение БП <sub>инг</sub> /БП <sub>без ДЗ</sub>		
	<0,5	от 0,5 до 0,7	0,7 и выше
0,8	67,4	23,3	9,3
1,5	55,8	11,6	32,6*
3,0	72	14,0	14,0

Примечание. \* – концентрация 1,5% не ингибирует биопрёнкообразование ( $\chi^2=4,17$  между концентрациями 1,5 и 3%;  $\chi^2=7,03$  между концентрациями 0,8 и 1,5%;  $p < 0,05$ ).

Таблица 4

**Влияние ДС СА на разрушение зрелой БП (доля чувствительных биопрёнкообразующих культур, %)**

Концентрация ДС СА (%)	Соотношение БП <sub>дестр</sub> /БП <sub>без ДЗ</sub>		
	<0,5	от 0,5 до 0,7	0,7 и выше
0,8	30,2	9,3	60,5*
1,5	34,9	20,9	44,2
3,0	41,9	20,9	37,2

Примечание. \* – концентрация 0,8% не разрушает зрелую биопренку ( $\chi^2=4,15$  между концентрациями 3% и 0,8%;  $p < 0,05$ ).

плотность. Если показатель равен 1, прирост отсутствует, от 1 до 2 – слабый, больше 2 прирост считается значительным [20].

Статистическая обработка данных произведена при помощи лицензионных прикладных программ «MS Excel for Windows». Вычислялись основные показатели параметрических методов вариационной статистики (средняя арифметическая, достоверность полученных результатов), непараметрические критерии оценки достоверности (критерий  $\chi^2$ , U-критерия Манна-Уитни). Критический уровень значимости (P) принят равным 0,05 [21].

**Результаты.** Клинические изоляты выделяли со слизистой оболочки зева и носа (39,5%), смывов с трахеобронхиального дерева и мокроты (30,2%), в 18,6% – из крови (табл. 1).

Способностью к биопрёнкообразованию обладали все исследуемые штаммы, при этом большая их часть (67,4%) формировала умеренно выраженные БП, высокой и слабообразующей способностью образовывать БП обладали по 16,3% соответственно.

НГОБ (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*) имели более выраженный КБП, чем энтеробактерии и бациллы (в среднем КБП НГОБ  $3,64 \pm 1,29$ ; энтеробактерий  $2,71 \pm 0,94$ ; бацилл  $1,95 \pm 0,38$ ) (рис. 1).

При изучении роста микробной популяции без воздействия и под воздействием ДС установлено, что планктонные клетки возбудителей ИСМП обладают значительной скоростью роста, увеличивая за 48 час культивирования ОП более чем в два раза по сравнению с начальной (табл. 2). Выбранные концентрации ДС эф-

фективно подавляют рост планктонных клеток и только 7% культур не чувствительны к концентрации 0,8% ( $p < 0,001$ , см., табл. 2).

Способность ДС СА препятствовать образованию БП зависела от концентрации: самыми эффективными являлись концентрации 0,8 и 3%; соотношение БП<sub>инг</sub>/БП<sub>без ДЗ</sub> <0,5 в 67,4 и 72% соответственно. Концентрация ДС 1,5% меньше ингибировала образование БП – соотношение БП<sub>инг</sub>/БП<sub>без ДЗ</sub> от 0,7 и выше в 32,6% случаев (табл. 3).

Чувствительность к воздействию ДС культур, находящихся в зрелых БП, значимо ниже, соотношение БП<sub>дестр</sub>/БП<sub>без ДЗ</sub> <0,5 менее, чем в 50% случаев, при этом наименее эффективна концентрация 0,8% (табл. 4).

КБП культур, пребывающих в зрелых БП значимо выше, чем у культур, подвергшихся воздействию ДС до начала формирования БП, не зависит от концентрации ( $U_{Эмп} = 483,5$  для 3%;  $U_{Эмп} = 622,5$  для 1,5%;  $U_{Эмп} = 322,5$  для 0,8%,  $p < 0,01$ ).

Проанализировано влияние ДС на КБП различных видов возбудителей ИСМП. ДС в концентрациях 0,8 и 3% не разрушает зрелые БП НГОБ, КБП НГОБ в экспериментах по определению деструкции выше, чем при ингибировании ( $U_{Эмп} = 107,5$  и 136 соответственно,  $p < 0,01$ ) (рис. 2).

У энтеробактерий КБП зрелых БП выше при воздействии концентрации 0,8 и 3,0% ( $U_{Эмп} = 88$  и 47,  $p < 0,01$ ), для бацилл значимой разницы не обнаружено (рис. 3).

**Обсуждение.** Способность к образованию БП возбудителями ИСМП является основным фактором выживаемости. Микроорганизмы, находящиеся внутри БП,

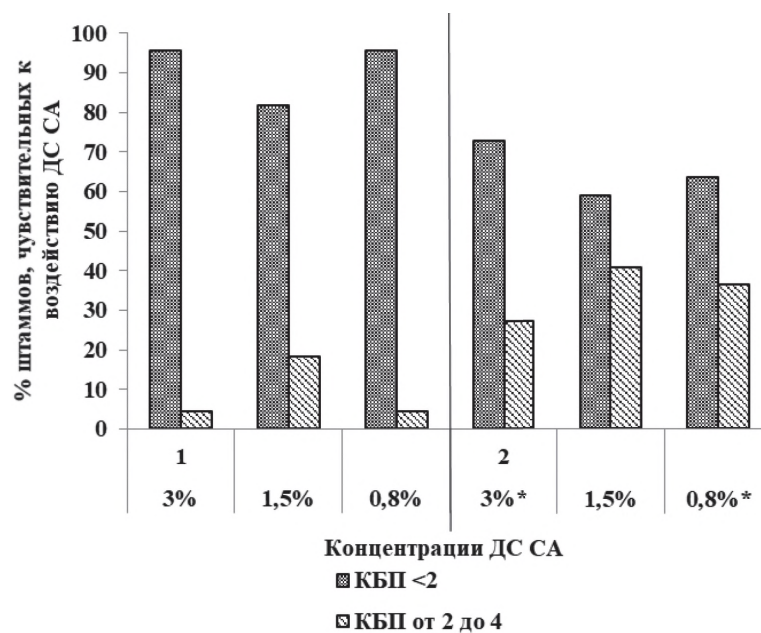


Рис. 2. Сравнение КБП при различном влиянии ДС СА на био пленки неферментирующих бактерий. \* – КБП от 2 до 4 значимо выше в зрелой БП для концентраций 0,8 и 3,0%;  $p < 0,01$ .

1 – влияние ДС СА на образование БП (ингибирование); 2 – влияние ДС СА на разрушение БП (деструкция).

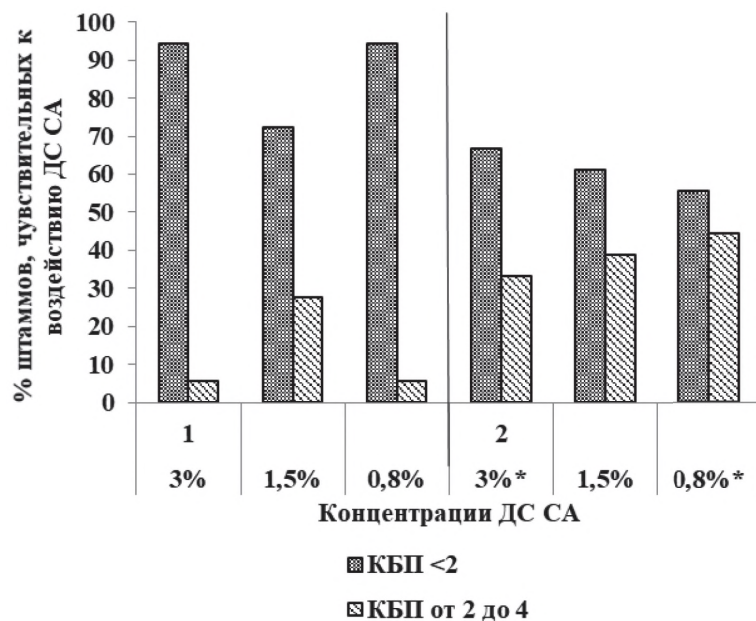


Рис. 3. Сравнение КБП при различном влиянии ДС СА на био пленки энтеробактерий. \* – КБП от 2 до 4 значимо выше в зрелой БП для концентраций 0,8 и 3%;  $p < 0,01$ .

1 – влияние ДС СА на образование БП (ингибирование); 2 – влияние ДС СА на разрушение БП (деструкция).

проявляют повышенную устойчивость к АМП и биоцидам и служат в качестве резервуара патогенов в больнице, вызывая высокий процент ИСМП [6,8].

Способностью формировать БП обладали все штаммы изученных возбудителей ИСМП, более 80% культур обладали высокой и умеренно выраженной способностью к био пленкообразованию. Наибольший КБП имели НГОБ, что является одной из причин их лидерства среди возбудителей ИСМП в РФ [22].

Обязательным атрибутом ДС, используемых в больничной среде, является их высокая биоцидная эффективность, конечным результатом воздействия ДС должно являться полное уничтожение микроорганизмов на обрабатываемом объекте. Научные исследования по изучению эффективности действия препаратов биоцидов на бактерии в составе БП немногочисленны и фрагментарны [23,24], что тормозит разработку вопросов эпидемиологического надзора за ИСМП.



Модифицирован планшетный метод определения чувствительности к ДС СА планктонных культур и БП микроорганизмов, возбудителей ИСМП. ДС выбранных концентраций вносили одновременно с суспензией клеток для проверки эффективности воздействия на формирующиеся БП, после удаления планктонных клеток для оценки способности разрушать ДС зрелые БП.

Показано, что ДС СА подавляет рост планктонных клеток, но не препятствует образованию БП, которое значительно при концентрации 1,5% у более 30% культур, концентрации 0,8 и 3% не эффективны в 9,3 и 14% случаев. Сохранение способности к биоплёнокообразованию под воздействием ДС способствует селекции устойчивых микроорганизмов, поддерживая их длительную персистенцию во внутрибольничной среде [25].

Представляет интерес вопрос об эффективности ДС против патогенов ИСМП, уже сформировавшихся БП, прикрепленные к поверхности. Некоторые биоциды не эффективны против биоплёнокообразующих бактерий, их суббактерицидные концентрации индуцируют образование БП, тем самым поддерживая ИСМП [26,27].

Нами показано, что чувствительность к воздействию ДС клеток, находящихся в зрелых БП, значимо ниже, тестируемые концентрации ДС не разрушают БП у более чем 60% культур, КБП выше, чем у культур, подвергшихся воздействию ДС до начала формирования БП. БП, образованные НГОБ и представителями сем. *Enterobacteriaceae*, более устойчивы к концентрациям 0,8 и 3%, чем бациллы. Причины этого явления могут быть связаны, со структурой и физиологическими особенностями самой БП (наличием внеклеточного полимерного матрикса, уменьшением проницаемости со снижением метаболизма клеток, ферментативной инактивацией биоцидов, активацией эффлюксных систем), адаптацией бактерий к систематическому воздействию ДС, сопровождающейся фенотипическими изменениями клеток [24,28].

**Заключение.** Методические указания МУ 3.5.1.3439-17 разработаны для микроорганизмов, находящихся в планктонном состоянии, без учёта их способности образовывать БП. Для достижения антимикробного эффекта в отношении микробных клеток в составе БП требуются более высокие концентрации ДС.

Исследования по действию ДС СА на возбудителей ИСМП свидетельствуют о его активности в отношении планктонных клеток и ингибирующем влиянии на образование этими штаммами БП. Это воздействие не полностью удаляет сформированные БП. Полученные результаты подтверждают важность тестирования эффективности биоцидов не только в соответствии со стандартными указаниями, но и в отношении БП, что требует самостоятельных методических подходов и разработки унифицированных методов.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 6-10, 12, 13, 18, 26-28  
см. REFERENCES)

1. Акимкин В.Г. Актуальные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. *Поликлиника*. 2014; 6: 6-9.
2. Найговзина Н.Б., Попова А.Ю., Бирюкова Е.Е., Ежлова Е.Б., Игонина Е.П., Покровский В.И., Акимкин В.Г. «и др.». Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с ока-

- занием медицинской помощи в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; 1:6-14.
4. Давыдов Д.С. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(1):50-6.
  5. Галимзянов Х.М., Башкина О.А., Досмуханова Э.Г., Абдрахманова Р.О., Демина Ю.З., Даудова А.Д. и др. Клиническое значение биоплёнокообразования у бактерий. *Астраханский медицинский журнал*. 2018; 13(4):32-42.
  11. Ковалишена О.В., Алебашина Л.А., Саперкин Н. В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* к дезинфектантам: систематический обзор. *Журнал МедиАль*. 2014; 3 (13):72-7.
  14. Абрамова И. М., Пантелеева Л. Г., Федорова Л. С., Левчук Н. Н., Дьяков В. В., Панкратова Г. П. и др. Инструкция № 03/05-11 по применению средства «Секусепт Актив» для дезинфекции, очистки и стерилизации изделий медицинского назначения М.; 2011.
  15. Анганова Е. В., Савилов Е. Д., Ушкарева О. А., Аблов А. М., Духанина А. В. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биопленок. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014; 5 (99):34-7.
  17. Малафеева Э. В., Гульнева М. Ю., Носков С. М., Романов В. А. Формирование биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными у больных с ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (11): 53-5.
  19. Плюта В.А., Андреев Ю.В., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 в присутствии перекиси водорода; влияние гена *aiiA*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 4:10-4.
  20. Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Немченко У.М., Носкова О.А., Чemezova Н.Н., Кунгурцева Е.А., Духанина А.В. Способность к биоплёнокообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2020; 1:32-5. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35.
  21. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ. Методы статистической обработки материала. Новосибирск; 2011: 156.
  22. Склеенова Е.Ю., Азизов И.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 3:164-71.
  23. Дегушева Е.В., Родин В.Б., Слукин П.В., Ершова О.Н., Александрова И.А., Курдюмова Н.В. и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(1):57-66.
  24. Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ; 2017: 300.
  25. Кобзев Е. Н., Чугунов В. А., Родин В. Б., Дегушева Е. В., Слукин П. В., Фёдорова Л. С., Акимкин В. Г. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 6:48-54.

## REFERENCES

1. Akimkin V.G. Actual directions of scientific research in the field of non-specific prevention of infections associated with medical care. *Poliklinika*. 2014; 6: 6-9. (in Russian)
2. Naygovzina N.B., Popova A.Yu., Biryukova E.E., Ezhlova E.B., Igonina E.P., Pokrovskiy V.I., Akimkin V.G. et al. Optimization of the system of measures to control and prevent infections associated with the provision of medical care in the Russian Federation. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2018; 1: 6-14. (in Russian)
3. Khan H.A., Baig F.K., Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2017; 7(5): 478-82. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>

4. Davydov D. S. National strategy of the Russian Federation to prevent the spread of pathogenic microbial resistance to antimicrobial drugs: difficulties and prospects for containing one of the global biological threats of the XXI century. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(1):50-6. (in Russian)
5. Galimzyanov Kh.M., Bashkina O.A., Dosmukhanova E.G., Abdrahmanova R.O., Demina Yu.Z., Daudova A.D. et al. Clinical importance of biofilm formation in bacteria. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 13(4):32-42. (in Russian)
6. Oz Y., Dag I., Kiraz N. Efficacy of disinfectants on *Candida* biofilms at different concentrations and contact time. *British Microbiology Research Journal*. 2012; 2(2):40-52 <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2012/1281>.
7. Carter M.Q., Louie J.W., Feng D., Zhong W., Brandl M.T. Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol.* 2016; 57: 81-9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.006>.
8. Shittu A. S., Ja'afaru. Effect of biocides on biofilms of some multi-drug resistant clinical bacterial isolates. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 2017;10(1): 126-32. <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v10i1.26S>.
9. Lee K.W., Periasamy S., Mukherjee M., Xie C., Kjelleberg S., Rice S.A. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J*. 2014; 8:894-907. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.194>
10. Sanchez-Vizuet P., Orgaz B., Aymerich S., Le Coq D., Briand R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front. Microbiol.* 2015; 6:705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>
11. Kovalishena O.V., Alebashina L. A., Saperkin N. V. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to disinfectants: a systematic review. *Zhurnal Meditsiny*. 2014; 3 (13):72-7. (in Russian)
12. Jurgens D.J., Sattar S.A., Mah T.F. Chloraminated drinking water does not generate bacterial resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; 46 (5):562-7. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02354.x>
13. Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol. Sci.* 2009; 14 (2):65-8. <https://doi.org/10.4265/bio.14.65>
14. Abramova I.M., Panteleeva L.G., Fedorova L.S., Levchuk N.N., D'yakov V.V., Pankratova G.P. et al. Instruction no. 03/05-11 on the use of Secusept Active for disinfection, cleaning and sterilization of medical devices. Moscow; 2011. (in Russian)
15. Anganova E. V., Savilov E. D., Ushkareva O. A., Ablov A. M., Dukhanina A. V. Ability of pathogenic and opportunistic enterobacteria to formation of biofilms. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014; 5 (99):34-7. (in Russian)
16. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47:2437. <https://doi.org/10.3791/2437>.
17. Malafeeva E. V., Gul'neva M. Yu., Noskov S. M., Romanov V. A. The formation of bio-films by opportunistic microorganisms isolated from patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (11): 53-5. (in Russian)
18. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:996-1006.
19. Plyuta V.A., Andreenko Yu.V., Kuznetsov A.E., Khmel' I.A. Formation of *Pseudomonas aeruginosa* RAO1 biofilms in the presence of hydrogen peroxide; influence of the *aiiA* gene. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2013; 4:10-4. (in Russian)
20. Savilov E.D., Markova Yu.A., Nemchenko U.M., Noskova O.A., Chemezova N.N., Kungurtseva E.A., Dukhanina A.V. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 1:32-5. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35. (in Russian)
21. Savilov E.D., Astaf'ev V.A., Zhdanova S.N., Zarudnev E.A. The epidemiological analysis. Methods of statistical processing of the material. Novosibirsk; 2011. (in Russian)
22. Skleenova E.Yu., Azizov I.S., Shek E.A., Eydel'shteyn M.V., Kozlov R.S., Dekhnich A.V. *Pseudomonas aeruginosa*: the history of one of the most successful nosocomial pathogens in Russian hospitals. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 3:164-71. (in Russian)
23. Detusheva E. V., Rodin V. B., Slukin P. V., Ershova O. N., Aleksandrova I. A., Kurdyumova N. V. et al. Sensitivity of nosocomial strains of *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *P. mirabilis* to chlorhexidine-based antiseptics. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17(1):57-66. (in Russian)
24. Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Microbial biofilms in clinical Microbiology and antibacterial therapy. Vitebsk: VGMU; 2017.
25. eSmith K., Hunter I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 2008; 57(8): 966-73. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47668-0>.
26. Ebrahimi A., Hemati M., Habibi Dehkordi S., Bahadoran S., Khoshnood S., Khubani S. et al. Chlorhexidine digluconate effects on planktonic growth and biofilm formation in some field isolates of animal bacterial pathogens. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 2014; 14;9(2): e14298. doi: 10.17795/jjnpp-14298.
27. Markova J.A., Turskaya A.L., Bybin V.A., Anganova E.V., Savilov E.D. Regulation of *Escherichia coli* biofilm formation (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018; 54 (1).

Поступила 20.04.20

Принята к печати 25.05.20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Шутикова А. Л., Лубова В. А., Леонова Г. Н.

## ВЕРИФИКАЦИЯ МОНО- И МИКСТ-ИНФИЦИРОВАННОСТИ ПЕРЕНОСЧИКОВ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Минобрнауки  
России, 690087, Владивосток, Россия

На территории Приморского края нозоареалы возбудителей клещевых инфекций часто совпадают и приводят к микст-инфицированию клещей, что служит причиной возникновения микст патологии у людей. Исследованы иксодовые клещи, снятые с людей в эпидемический сезон 2019 г., на спектр возбудителей трансмиссивных инфекций для выявления степени их моно- и микст-инфицированности. Исследован 651 экз. иксодовых клещей. РНК/ДНК возбудителей определено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), антиген ВКЭ – методом ИФА. Выявлено наличие в клещах возбудителей следующих заболеваний: ИКБ (35,3%), ВКЛ (11,3%) ГАЧ (2,6%), МЭЧ (2,4%), КВЭ (1,8%), КР (1,0%). Как возбудители моно-инфекций, вирус КЭ, эрлихия, анаплазмы, риккетсии встречались в клещах реже, чем в сочетании с другими патогенами. Обнаружена высокая частота встречаемости *B. burgdorferi* s.l. при моно-инфекции (58,7%). *B. miyamotoi* равномерно встречалась у клещей с моно- и микст-инфекциями. Общая микст-инфицированность клещей составила 23,1%. Во всех микст случаях выявлены боррелии. Варианты двойных комбинаций (95,5% случаев из всех микстов) следующие: *B. burgdorferi* s.l. + *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. + *E. chaffeensis* / *E. muris*, *B. burgdorferi* s.l. + ВКЭ, *B. burgdorferi* s.l. + *R. heilongjiangensis*, *B. burgdorferi* s.l. + *B. miyamotoi*. Частым сочетанием была комбинация *B. burgdorferi* s.l. + *B. miyamotoi* (37,8% из всех микстов). При тройном инфицировании *B. burgdorferi* s.l. + *A. Phagocytophilum* + ВКЭ и *B. burgdorferi* s.l. + *A. phagocytophilum* + *B. miyamotoi* частота встречаемости для каждой комбинации составила 2,2%. Необходима комплексная лабораторная диагностика клещевых инфекций у лиц, обратившихся по поводу присасывания клеща, включающая детекцию всех возбудителей распространенных на очаговых территориях.

Ключевые слова: клещевые инфекции; иксодовые клещи; ПЦР; ИФА; микст-инфицированность.

Для цитирования: Шутикова А. Л., Лубова В. А., Леонова Г. Н. Верификация моно- и микст-инфицированности переносчиков клещевых инфекций. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 659-664. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-659-664>

Shutikova A. L., Lubova V. A., Leonova G. N.

### VERIFICATION OF MONO- AND MIXED CONTAMINATIONS TRANSMITTING AGENTS TICK-BORNE INFECTIONS

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

In the territory of the Primorsky region, the nosoareas of causative agents of tick-borne infections often coincide and lead to mixed infection of ticks, which causes the mixed pathology in humans. We investigated ixodid ticks taken from people during the epidemic season of 2019 for the spectrum of pathogens of transmissible infections to determine the degree of their mono- and mixed infection. 651 specimens of ixodid ticks investigated. RNA/DNA pathogens was determined by the method of polymerase chain reaction (PCR), TBEV antigen by ELISA. The presence in ticks of the following diseases was detected: Lyme borreliosis (35.3%), tick-borne relapsing fever (11.3%), human granulocytic anaplasmosis (2.6%), human monocytic ehrlichiosis (2.4%), tick-borne encephalitis (1.8%), tick-borne rickettsiosis (1.0%). As agents of mono-infections, the virus of TBE, ehrlichia, anaplasma and rickettsia in ticks occurred less frequently than in combination with other pathogens. A high frequency of occurrence *B. burgdorferi* s.l. in mono-infection detected (58.7%). *B. miyamotoi* has met evenly at ticks with mono- and mixed infections. Total mixed infection of ticks was 23.1%. *Borrelia* have been identified in all mixed cases. Variants of double combinations (95.5% of cases from all mixed infections) were as follows: *B. burgdorferi* s.l. + *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. + *E. chaffeensis* / *E. muris*, *B. burgdorferi* s.l. + TBEV, *B. burgdorferi* s.l. + *R. heilongjiangensis*, *B. burgdorferi* s.l. + *B. miyamotoi*. The most frequent combination was *B. burgdorferi* s.l. + *B. miyamotoi* (37.8% of all mixed infections). In triple infection of *B. burgdorferi* s.l. + *A. phagocytophilum* + TBEV and *B. burgdorferi* s.l. + *A. phagocytophilum* + *B. miyamotoi*, the frequency of occurrence for each combination was 2.2%. Given the above, a complex laboratory diagnosis of tick-borne infections in individuals who have been bitten by a tick is necessary, including the detection of all pathogens common in focal areas.

Key words: tick-borne infections; ixodid ticks; PCR; ELISA; mixed infection.

For citation: Shutikova A. L., Lubova V. A., Leonova G. N. Verification of mono- and mixed contaminations transmitting agents tick-borne infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (10): 659-664 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-659-664>

For correspondence: Shutikova A.L., candidate of medical sciences, researcher at the laboratory of natural focal transmissible infections; e-mail: [shutikova79@mail.ru](mailto:shutikova79@mail.ru)

#### Information about authors:

Shutikova A.L., <https://orcid.org/0000-0002-6803-0439>;

Leonova G.N., <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>;

Lubova V.A., <http://orcid.org/0000-0002-4290-6164>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 07.04.2020  
Accepted 13.04.2020

Для корреспонденции: Шутикова Анна Леонидовна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. природно-очаговых трансмиссивных инфекций; e-mail: [shutikova79@mail.ru](mailto:shutikova79@mail.ru)



**Введение.** Проблема клещевых инфекций привлекает внимание учёных и врачей разных специальностей. На территории Приморского края известно шесть трансмиссивных клещевых инфекций вирусной и бактериальной этиологии. К возбудителям этих инфекций относят: вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), риккетсии, боррелии (в том числе, *Borrelia miyamotoi*), эрлихии, анаплазмы [1]. Наличие общих переносчиков этих патогенов ведёт к возникновению сочетанных природных очагов клещевого вирусного энцефалита (КВЭ), иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), клещевого риккетсиоза (КР), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), возвратной клещевой лихорадки (ВКЛ) [2]. Сочетанность природных очагов служит причиной микст-патологии у людей [3] и требует проведения более широких исследований проб клещей, снятых с людей, образцов клинического материала на весь спектр возбудителей клещевых инфекций. Выявление генетических маркёров с высокими показателями аналитической надёжности (точность, чувствительность, специфичность) обеспечивают стандартизованные методы обнаружения ДНК/РНК (ПЦР-диагностика) или антигенов (ИФА) возбудителей выше указанных инфекций.

Цель работы – провести молекулярно-генетическую диагностику заражённости иксодовых клещей, снятых с людей на спектр трансмиссивных инфекций для выявления степени моно- и микст-инфицированности переносчиков.

**Материал и методы.** Исследован 651 экземпляр присосавшихся иксодовых клещей, снятых с людей в эпидемический сезон 2019 г. на территории Приморского края.

Антиген ВКЭ в гомогенатах клещей определён методом ИФА с использованием набора «ВектоВКЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя тест-системы. На наличие генетических маркёров ВКЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Ehrlichia muris*, *Rickettsia sibirica* / *Rickettsia heilongjiangensis*, *Borrelia miyamotoi* материал исследован методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием наборов «АмплиСенс ТБЕВ, *B. burgdorferi s.l.*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris-FL*» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва), «РеалБест ДНК *R. Sibirica* / *R. heilongjiangensis*, ДНК *B. miyamotoi*» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителей. Исследования проведены на амплификаторе с флуоресцентной детекцией «ROTOR-GENE Q» (QIAGEN, Германия).

Достоверность различия средних величин оценено на основе критерия Стьюдента (t). Различия показателей считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** По данным оперативного мониторинга в 2019 г. зарегистрировано 6247 случаев присасывания клещей (показатель обращаемости – 339,1 на 100 тыс. населения) на 30 административных территориях края, что на 6,7% меньше, чем за аналогичный период 2018 г. (6733 обращений – показатель обращаемости 363,6 на 100 тыс. населения) [4]. Малоснежная зима и большой охват территорий пожарами оказали влияние на общую популяцию клещей, что привело к уменьшению случаев их нападения на человека.

Юг Дальнего Востока является высоко эндемичной территорией в отношении КВЭ, за последние десять лет картина изменилась: заболеваемость снизилась, случаи с летальным исходом стали единичными. В 2010 г. заболеваемость КВЭ составляла 2,9 на 100 тыс. населения, летальность 9,09% [5]. По данным Роспотребнадзора [4] в 2019 г. заболело 13 человек, что составило 0,68 на 100 тыс. населения. Из них, у 12 (92,3%) заболевание КВЭ связано с присасыванием клеща, у 1 (7,7%) отмечен алиментарный путь заражения (употребление сырого козьего молока). Случаев с летальным исходом не зарегистрировано.

Ведущее место в заболеваемости клещевыми инфекциями стали занимать иксодовые боррелиозы. На протяжении последних 10 лет заболеваемость ИКБ в Приморском крае колебалась от 5,7 (2014 г.) до 10,8 (2016 г.) случаев на 100 тыс. населения, и значительно превышала заболеваемость КВЭ [6]. К 2019 г. заболеваемость ИКБ снизилась до 4,36 на 100 тыс. населения. В числе прочих природно-очаговых инфекций в Приморском крае в эпидемический сезон 2019 г. зарегистрировано 90 случаев (4,73 на 100 тыс. населения) КР.

С 2013 г. в России введена официальная регистрация гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека. Заболеваемость ГАЧ регистрируется в 11 регионах страны, варьирует от 0,09 до 2,8 на 100 тыс. населения. Заболеваемость МЭЧ регистрируют в 7 регионах РФ, варьирует от 0,04 до 2,8 на 100 тыс. населения [7]. ГАЧ и МЭЧ чаще выявляют у пациентов с микст-инфекцией (обычно в сочетании с КВЭ или ИКБ) [8]. ГАЧ и МЭЧ в патологии человека на территории Приморского края занимают незначительное место. В 2019 г. случаев заболевания ГАЧ и МЭЧ не выявлено.

Первое обращение в связи с укусом клеща в 2019 г. зарегистрировано 11 марта, последнее – 23 октября. Длительность сезона активности клещей, связанная с ранним весенним потеплением составила 227 дней, что на 2,5 нед. продолжительнее, чем в предыдущие годы [9, 10].

Случаи присасывания клещей *I. persulcatus* у людей зарегистрированы в 91,2%, клещей родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis* – в 2,8% и 6,0%. Для клещей *I. persulcatus* на территории Приморья характерна доминирующая численность и повышенная агрессивность по сравнению с другими видами. Они являются основными переносчиками всех клещевых инфекций [2, 11].

Из 651 экземпляра исследованных клещей, снятых с людей, 40,1% содержал возбудителей клещевых заболеваний. Чаще других из клещей выделены боррелии генокомплекса *B. burgdorferi s.l.* (35,3 %) и *B. miyamotoi* (11,3%). Суммарный показатель инфицированности всех клещей вирусом КЭ по данным ПЦР-РВ и ИФА составил 1,8%. Возбудители ГАЧ и МЭЧ детектированы в 2,6% и 2,4% случаев. ДНК *R. heilongjiangensis* обнаружена в 4-х экз. клещей, что составило 1,0% от общей выборки (табл. 1).

Для клещей *I. persulcatus* характерно выявление методом ПЦР-РВ генетических маркёров вируса КЭ в 1,4% случаев, иксодового клещевого боррелиоза – в 38,3%, МЭЧ – в 2,8%, ГАЧ – в 2,4%, КР – в 1,1% и ВКЛ – в 11,4%.

В клещах *Haemaphysalis* в 2-х случаях выявлена ДНК *B. burgdorferi s.l.* и *B. miyamotoi*, по 1 случаю – генетические маркёры ВКЭ и *A. phagocytophilum*. В 2-х клещах



**Заражённость иксодовых клещей возбудителями трансмиссивных клещевых инфекций**

Вид клеща	n	%	ИФА	ПЦР-РВ					
			КВЭ	КВЭ	ИКБ	МЭЧ	ГАЧ	КР	ВКЛ
Количество исследованных клещей/положительные пробы/%									
<i>I. persulcatus</i>	594	91,2	92/1/1,1 594/9/1,5	571/8/1,4	571/219/38,3	571/16/2,8	571/14/2,4	361/4/1,1	325/37/11,4
<i>Haemaphysalis</i>	39	6,0	9/0/0 39/1/2,5	38/1/2,6	38/2/5,3	38/0/0	38/1/2,6	18/0/0	14/2/14,2
<i>D. silvarum</i>	18	2,8	8/0/0 18/2/11,1	17/2/11,7	17/0/0	17/0/0	17/0/0	9/0/0	7/0/0
Всего	651	100	109/1/0,9 651/12/1,8	626/11/1,75	626/221/35,3	626/16/2,6	626/15/2,4	388/4/1,0	346/39/11,3

Т а б л и ц а 2

**Распределение случаев инфицированности клещей *I. persulcatus* возбудителями клещевых инфекций (моно- и микст-инфекция)**

Показатель	ПЦР-РВ					
	КВЭ	ИКБ	МЭЧ	ГАЧ	КР	ВКЛ
абс. (%)						
Моно-инфекция	2 (0,7±0,5%) <sup>1</sup>	175 (58,7±2,8%) <sup>3</sup>	6 (2,0±0,8%) <sup>1</sup>	4 (1,3±0,6%) <sup>2</sup>	1 (0,3±0,3%) <sup>4</sup>	18 (6,0±1,37%) <sup>4</sup>
Распределение случаев в группе «моно-инфекция», n=206	1,0%	84,9%	2,9%	1,9%	0,5%	8,8%
Микст-инфекция	6 (2,0±0,8%) <sup>1</sup>	44 (14,7±2,0%) <sup>3</sup>	10 (3,4±1,0%) <sup>1</sup>	10 (3,4±1,0%) <sup>2</sup>	3 (1,0±0,6%) <sup>4</sup>	19 (6,4±1,4%) <sup>4</sup>
Распределение случаев в группе «микст-инфекция», n=92	6,5%	47,8%	10,9%	10,9%	3,3%	20,6%
Всего случаев инфицирования	8 (2,7%)	219 (73,4%)	16 (5,4%)	14 (4,7%)	4 (1,3%)	37 (12,4%)
298						

Пр и м е ч а н и е. Достоверные значения при  $p < 0,05$  (<sup>1</sup> $p = 0,05$ ; <sup>2</sup> $p = 0,01$ ; <sup>3</sup> $p = 0,001$ ; <sup>4</sup> $p > 0,05$ ).

*Dermacentor* обнаружена РНК ВКЭ, других возбудителей не детектировано (табл. 1).

Микст-заражённость иксодовых клещей различными возбудителями природно-очаговых заболеваний – нормальное, естественное и широко распространённое явление. В качестве компонентов большинства природно-очаговых экосистем одновременно выступают популяции нескольких патогенных и/или условно-патогенных микроорганизмов [12, 13].

На территории Приморского края нозоареалы возбудителей клещевых инфекций часто совпадают, что ведёт к наличию в клещах двойных и тройных комбинаций патогенов, что обуславливает возможность развития сочетанной патологии у человека.

В природе одновременное инфицирование клеща двумя или тремя возбудителями возможно в процессе питания их на прокормителях [14]. Микст-заражённость клещей является достаточно частым событием и регистрируется в 6,3-25,8% случаев [15, 16]. Тройные миксты описываются, как достаточно редкое явление [17, 18].

В нашем исследовании микст-инфицированность обнаружена только у клещей *I. persulcatus*. Клещи родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis* заражены возбудителями одного вида.

Проведён анализ распределения случаев моно- и микст-инфицированности клещей *I. persulcatus* различными возбудителями природно-очаговых инфекций.

Вирус КЭ в моно-варианте встречался в клещах в 2,8 раза реже, чем в сочетании с другими патогенами. Частота встречаемости возбудителей МЭЧ и ГАЧ при микст-инфицированности в 1,7-2,6 раза выше, чем при моно-инфекции. В отношении *B. burgdorferi s.l.* наблюдается обратная картина. Заражённость клещей *B. burgdorferi s.l.* в 3,9 раза выше при моно-инфекции. *B. miyamotoi* равномерно встречалась у клещей с моно- и микст-инфекциями. Частым сочетанием была комбинация *B. miyamotoi* + *B. burgdorferi s.l.* (у 17 клещей из 19). *R. heilongjiangensis* в 1,0% случаев сочеталась с другими возбудителями и в 0,3% случаев присутствовала в моно-варианте (табл. 2).

При распределении случаев внутри группы «моно-инфекция» отмечено, что наиболее часто в клещах встречалась *B. burgdorferi s.l.* (84,9%). Реже – *B. miyamotoi* (8,8%). Анаплазмы, эрлихии, вирус КЭ, риккетсии в моно-варианте выявлялись редко (от 0,5% до 2,9% случаев). Обнаружена высокая частота встречаемости этих возбудителей (от 3,3% до 20,6%) при микст-инфицировании. *B. burgdorferi s.l.* при микст-заражении выявлялась в высоком проценте (47,8%) и присутствовала во всех микстах (табл. 2).

Варианты микст-инфицирования клещей *I. persulcatus* возбудителями клещевых инфекций

Варианты микст-инфицирования возбудителями клещевых инфекций	Количество клещей с возбудителями	Количество микст случаев		Частота встречаемости микст случаев, %, n=45
		абс.	%	
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + ВКЭ	232	5	2,2	11,1
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>B. miyamotoi</i>	164	17	10,4	37,8
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>A. phagocytophilum</i>	232	8	3,5	17,8
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>E. chaffeensis</i> / <i>E. muris</i>	232	10	4,3	22,2
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>R. heilongjiangensis</i>	180	2	1,1	4,5
<i>B. miyamotoi</i> + <i>R. heilongjiangensis</i>	164	1	0,6	2,2
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>A. phagocytophilum</i> + ВКЭ	232	1	0,4	2,2
<i>B. burgdorferi s.l.</i> + <i>A. phagocytophilum</i> + <i>B. miyamotoi</i>	164	1	0,6	2,2
Общее количество микст случаев		45	23,1	100

По мнению А. Н. Алексеева [19] происходит постепенное замещение ВКЭ бактериальными патогенами (боррелии). Показано, что в организме клеща оба возбудителя находятся в антагонистических взаимоотношениях: клещи, заражённые боррелиями, либо не восприимчивы к вводимому парентерально высоковирулентному штамму ВКЭ, либо в их организме репликация вируса тормозится.

Число микст-заражённых иксодовых клещей, от общего количества инфицированных – составило 45 клещей (23,1%). Во всех микст случаях выявлены боррелии, что указывает на высокую частоту заражённости данным возбудителем популяции иксодовых клещей Приморского края. Двойное инфицирование встречалось в 95,5% случаев из общего числа микстов, 4,5% микст-инфицированных клещей содержали одновременно генетический материал трёх групп патогенов. Варианты двойных комбинаций следующие: *B. burgdorferi s.l.* + *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi s.l.* + *E. chaffeensis* / *E. muris*, *B. burgdorferi s.l.*+ ВКЭ, *B. burgdorferi s.l.* + *R. heilongjiangensis*, *B. burgdorferi s.l.*+ *B. miyamotoi*. Частое сочетание комбинация *B. burgdorferi s.l.* + *B. miyamotoi* (37,8% из всех микстов). При невысокой встречаемости эрлихий (2,8 %) и анаплазм (2,4%) (табл. 1), доля клещей, одновременно заражённых *B. burgdorferi s.l.* + *E. chaffeensis* / *E. muris* и *B. burgdorferi s.l.* + *A. phagocytophilum* составила 22,2% и 17,8% от всех микст-инфекций. Это можно объяснить тем, что эти микробы занимают разные «экологические ниши» в организме клеща при внутриклеточном (анаплазмы, эрлихии) и внеклеточном (боррелии) паразитизме [12]. Часто описываемый в литературе [3, 20] вариант микст-инфицирования *B. burgdorferi s.l.* + ВКЭ в наших исследованиях, несмотря на низкую вирусофорность иксодовых клещей ВКЭ, отмечен в высоком проценте от общего количества микст случаев (11,1%). При тройном инфицировании (*B. burgdorferi s.l.* + *A. phagocytophilum* + ВКЭ и *B. burgdorferi s.l.* + *A. Phagocytophilum* + *B. miyamotoi*) частота встречаемости для каждой комбинации составила 2,2% (табл. 3).

**Заключение.** В Приморском крае за последние годы сложилась неблагоприятная эпидемиологическая ситуация особенно в отношении боррелиозов. Инфицированность клещей боррелиями на данной территории имеет

тенденцию к неуклонному росту [9, 10]. В природных очагах одновременно циркулируют два вида боррелий *B. burgdorferi s.l.* и *B. miyamotoi*. По данным литературы заражённость клещей *B. miyamotoi* значительно ниже, чем боррелиями комплекса *B. burgdorferi s.l.* [21]. В ряде регионов России показатель заражённости *B. miyamotoi* достигает 16% [22]. В Приморье по результатам исследования 2019 г. заражённость клещей *B. miyamotoi* составила 11,3%, *B. burgdorferi s.l.* – 35,3%, комбинацией этих возбудителей – 10,4%. Существенная недооценка клинико-эпидемиологических особенностей ВКЛ, вызываемой *B. miyamotoi*, ведёт к отсутствию диагностики ВКЛ. Только своевременно проведённое обследование клещей и крови пациентов (в период бактериемии) в ПЦР позволяет верифицировать возбудителя ВКЛ [23]. Поскольку выявление антител методом иммуноферментного анализа (ИФА) при ВКЛ недостаточно специфично, т. к. возможно перекрестное реагирование антител с антигенами возбудителей комплекса *B. burgdorferi s.l.* [24], целесообразно определять *B. miyamotoi* в присосавшихся клещах, что может облегчить дальнейшую диагностику ВКЛ.

Высокая частота встречаемости возбудителей природно-очаговых инфекций в иксодовых клещах диктует необходимость проведения комплексной лабораторной диагностики этих заболеваний у лиц, обратившихся по поводу присасывания клеща, принимая во внимание детекцию не только известных, но и недавно выявленных возбудителей на очаговых территориях.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Работа выполнена в рамках научного проекта (0545-2019-0007) Министерства науки и высшего образования.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п. 23 см. REFERENCES)

1. Леонова Г.Н., Лубова В.А., Иванис В.А. Мониторинг возбудителей клещевых инфекций на территории приморского края в 2014-2018 гг. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018; 74 (4): 10-4. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.10-14>.
2. Лубова В.А., Леонова Г.Н., Бондаренко Е.И. Комплексная характеристика природных очагов клещевых инфекций на юго-

- восточных территориях Сихотэ-Алиня. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; 68 (1): 30-5. Doi: 10.5281/zenodo.345611
3. Леонова Г.Н., Якушева С.С., Иванис В.А., Дададова О.Б., Крылова Н.В., Симакова А.И., Маистровская О.С. Диагностика клещевых микст-инфекций в Приморском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2005; 4: 25-31.
  4. Санитарно-эпидемиологическая обстановка [Электронный ресурс]: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека по Приморскому краю. URL: <http://25.rospotrebnadzor.ru/bytag2>.
  5. Воронок В.М., Загней Е.В. Эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту в Приморском крае. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 58 (4): 126-31. URL: <https://yadi.sk/i/kaJBAw kfZKuWc>.
  6. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2017 году». <http://25.rospotrebnadzor.ru/306>.
  7. Проворова В.В., Краснова Е.И., Хохлова Н.И., Савельева М.А., Филимонова Е.С., Кузнецова В.Г. Старые и новые клещевые инфекции в России. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019; 8 (2): 102-12. Doi: 10.24411/2305-3496-2019-12013.
  8. Сарксян Д.С., Платонов А.Е., Карань Л.С., Калинин И.Е., Халитова Л.И., Шахов В.И. и др. Клинические особенности «нового» клещевого боррелиоза, вызываемого *Borrelia miyamotoi*. *Терапевтический архив*. 2012; 11: 34-41.
  9. Берлизова М.В., Лубова В.А., Курловская А.В., Леонова Г.Н. Иксодовые клещи как переносчики возбудителей природно-очаговых заболеваний в эпидемический сезон 2017 года на территории Приморского края. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018; 73 (1): 4-12. Doi: 10.5281/zenodo.1194868.
  10. 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): 424-29. Doi: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-429>.
  11. Зверева Т.В., Алленов А.В., Никитин А.Я. Видовые особенности контактов иксодовых клещей с человеком на юге Приморского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4: 14-7.
  12. Коренберг Э. И. Взаимоотношения возбудителей трансмиссивных болезней в микст-инфицированных иксодовых клещах (ixodidae). *Паразитология*. 1999; 33 (4): 273-89.
  13. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микст-инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Вестник РАМН*. 2001; 11: 41-6.
  14. Наумов Р.Л., Васильева И.С. Микст-инфекции у клещей: правило или исключение? *Медицинская паразитология*. 2002; 4: 27-33.
  15. Козлова И.В., Верховина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Дорошенко Е.К., Лисак О.В. и др. Сочетанные очаги трансмиссивных клещевых инфекций на территории Прибайкалья. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 53 (4): 40-6.
  16. Шкарин В.В., Благоданова А.С., Чумаков М.Э. Эпидемиологические особенности сочетанных природно-очаговых инфекций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2017; 16 (5): 43-52. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-5-43-52>.
  17. Глушакова Л.И., Корабельников И.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Микрюкова Т.П., Кононова Ю.В. и др. Выявление возбудителей заболеваний в *Ixodes persulcatus* на территории Республики Коми. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 111 (4): 88-91.
  18. Любезнова О.Н., Бондаренко А.Л., Карань Л.С. Зараженность клещей *Ixodes persulcatus* возбудителями различных заболеваний в эндемичном регионе европейской части России. *Актуальная инфектология*. 2014; 2 (3): 49-52. doi: <https://doi.org/10.2214/1/2312-413x.2.03.2014.82356>.
  19. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Вашукова М.А., Волкова Л.И. Боррелии как вероятные антагонисты вируса клещевого энцефалита: паразитологический и клинический аспекты проблемы. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2001; 3: 3-11.
  20. Субботин АВ, Семёнов ВА, Этенко ДА. Проблема современных смешанных нейроинфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Архив внутренней медицины*. 2012; 4 (2): 35-9. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2012-0-2-35-39>.
  21. Богоярков В.Ю., Фоменко Н.В., Панов В.В., Чикова Е.Д. Исследование зараженности боррелиями таежных клещей на территории Новосибирского научного центра СО РАН. *Паразитология*. 2010; 44 (6): 543-56.
  22. Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н., Боргоярков В.Ю., Козлова И.В. и др. Выявление *Borrelia miyamotoi* в клещах *Ixodes persulcatus* на территории России. *Паразитология*. 2010; 44 (3): 201-11.
  24. Платонов А.Е., Карань Л.С., Гаранина С.Б. и др. Природно-очаговые инфекции в XXI веке в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009; 2: 38-44.
- 
- ## REFERENCES
1. Leonova G.N., Lubova V.A., Ivanis V.A. Monitoring causative agents of tick-borne infections in Primorsky Krai (2014-2018). *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 74 (4): 10-4. <https://doi.org/10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.10-14>. (in Russian)
  2. Lubova V.A., Leonova G.N., Bondarenko E.I. Natural foci of tick-borne infections on the southeast areas of Sikhote-Alin complex characteristics. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2017; 68 (1): 30-5. Doi: 10.5281/zenodo.345611. (in Russian)
  3. Leonova G.N., Yakushev S.S., Ivanis V.A., Dadachova O.B., Krylov N.I. Simakova A.I., Maistrovskaya O.S. Diagnostics of tick-borne mixed infections in Primorsky region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2005; 4: 25-31. (in Russian)
  4. Sanitary and epidemiological situation [Electronic resource]: Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare in Primorsky region. URL: <http://25.rospotrebnadzor.ru/bytag2>. (in Russian)
  5. Voronok V.M., Zagney E.V. The epidemiological situation of tick-borne encephalitis in Primorsky region. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2014; 58 (4): 126-31. URL: <https://yadi.sk/i/kaJBAw kfZKuWc>. (in Russian)
  6. State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in Primorsky region in 2017». URL: <http://25.rospotrebnadzor.ru/306>.
  7. Provorova V.V., Krasnova E.I., Khokhlova N.I., Savel'eva M.A., Filimonova E.S., Kuznetsova V.G. Tissue infections in Russia. *Infeksionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2019; 8 (2): 102-12. Doi: 10.24411/2305-3496-2019-12013. (in Russian)
  8. Sarksyant D.S., Platonov A.E., Karan L.S., Malinin I.E., Khalitova L.I., Shakhov V.I. et al. Clinical presentation of "new" tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi*. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2012; 11: 34-41. (in Russian)
  9. Berlizova M.V., Lubova V.A., Kurlovskaya A.V., Leonova G.N. Iksodetic tongs as the carriage of the forgers of natural-focal diseases to the epidemic season 2017 in the territory of the Primorsky Region. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2018; 73 (1): 4-12. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1194868>. (in Russian)
  10. 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. Doi: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-9>. (in Russian)
  11. Zvereva T.V., Allenov A.V., Nikitin A.Y. Species determined peculiarities of the tick-man contacts in the south of the Primorsky territory. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 4: 14-7. (in Russian)
  12. Korenberg E.I. The relationship of pathogens transmissible diseases in the mixed-infected Ixodes ticks (Ixodidae). *Parazitologiya*. 1999; 33 (4): 273-89. (in Russian)



MICROBIOLOGY

13. Korenberg E.I. The study and prevention of mixed infections transmitted by ticks. *Vestnik RAMS*. 2001; 11: 41-6. (in Russian)
14. Naumov R.L., Vasilyeva I.S. Mixed infections in ticks: rule or exception? *Meditsinskaya parazitologiya*. 2002; 4: 27-33. (in Russian)
15. Kozlova I.V., Verkhovina M.M., Dyomina T.V., Dzhioev Yu.P., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., et al. Combined foci of transmissible tick-borne infections in the Baikal region. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2010; 53 (4): 40-6. (in Russian)
16. Shkarin V.V., Blagonravova A.S., Chumakov E.M. Epidemiological features of combined natural-focal infections. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2017; 16 (5): 43-52. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-5-43-52>. (in Russian)
17. Glushakova L.I., Korabel'nikov I.V., Ternovoj V.A., Protopopova E.V., Mikryukova T.P., Kononova Yu.V. et al. Detection of causative agents in *Ixodes persulcatus* in the Komi Republic. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 111 (4): 88-91. (in Russian)
18. Lyubeznova O.N., Bondarenko A.L., Karan L.S. Infectiousness of *Ixodes persulcatus* ticks with pathogens of various diseases in endemic regions of European Russia. *Aktual'naya infektsiologiya*. 2014; 2 (3): 49-52. doi: <https://doi.org/10.22141/2312-413x.2.03.2014.82356>. (in Russian)
19. Alekseev A.N., Dubinina E.V., Vashukova M.A., Volkova L.I. *Borrelia* as probable antagonists of tick-borne encephalitis virus: parasitological and clinical aspects of the problem. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2001; 3: 3-11. (in Russian)
20. Subbotin AV, Semenov VA, Etenko DA. The problem of contemporary mixed neuroinfections transmitted by ticks. *Arkhiv vnutrennei meditsiny*. 2012; 4 (2): 35-9. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2012-0-2-35-39>. (in Russian)
21. Bogoyarkov V.Yu., Fomenko N.V., Panov V.V., Chikova E.D. Investigation of contamination of *Borrelia taiga* ticks on the territory of the Novosibirsk Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. *Parazitologiya*. 2010; 44 (6): 543-56. (in Russian)
22. Fomenko N.V. Livanova N.N., Borgoyakov V.Yu., Kozlova I.V. et al. Detection of *Borrelia miyamotoi* in ticks *Ixodes persulcatus* in Russia. *Parazitologiya*. 2010; 44 (3): 201-11. (in Russian)
23. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V. et al. Humans infected with the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (10): 1816-22.
24. Platonov A.E., Karan L.S., Garanina S.B. et al. Natural-focal infections in the 21st century in Russia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2009; 2: 38-44. (in Russian)

Поступила 07.04.20

Принята к печати 13.04.20