

*На правах рукописи*

**КОЗЛОВ**  
**Андрей Владимирович**

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ОЦЕНКА ИНФЕКЦИОННЫХ  
ОСЛОЖНЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИМИ  
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ У ПАЦИЕНТОВ С  
МУКОВИСЦИДОЗОМ**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

1.5.11. Микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук доцент **Гусякова Оксана Анатольевна;**

доктор медицинских наук доцент **Лямин Артем Викторович.**

**Официальные оппоненты:**

**Кзаков Сергей Петрович** – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, центр клинической лабораторной диагностики, начальник – главный лаборант госпиталя;

**Чернуха Марина Юрьевна** – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций, заведующая.

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «06» июня 2023 г. в 14:30 часов на заседании диссертационного совета 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197345, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, дом 54 и на сайте <https://nrserm.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат медицинских наук доцент

**Санников Максим Валерьевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Совершенствование методов диагностики и лечения муковисцидоза за последние десятилетия привели к увеличению случаев выявления патологии в раннем детском возрасте и продолжительности жизни больных, сохраняя одно из самых частых наследственных заболеваний актуальной медико-социальной проблемой современного здравоохранения [Castellani C., 2017; Corriveau S., 2018; Castellani C., 2019; Maule G., 2020; Scotet V., 2020; Bell S.C., 2020]. Однако, несмотря на значительные успехи в диагностике и терапии, осложнения, связанные с инфицированием бронхолегочной системы неферментирующими грамотрицательными бактериями (НФГОб), по-прежнему остаются основной причиной смертности пациентов с муковисцидозом, вследствие чего выявление нарушений при патологических состояниях инфекционного генеза являются приоритетной задачей диагностической службы при работе с материалом от пациентов с муковисцидозом [Красовский С.А., 2019; Кондратенко О.В., 2020; Национальный консенсус. Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия, 2016; Воронина О.Л., 2019; Руководство по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом, 2019; Blanchard A.C., 2019]. Также определение качественных и количественных характеристик лабораторных параметров воспалительного синдрома (лейкоцитоз, повышение скорости оседания эритроцитов, высокие значения С-реактивного белка) не всегда точно способствует выявлению этиологической причины воспаления, которое может быть локализовано вне респираторного тракта, часто характеризуется периодическими обострениями или может быть вызвано инфекционными агентами вирусной и грибковой природы. В связи с этим появляется потребность в разработке методик лабораторного исследования для диагностики заболевания, определения и прогнозирования тяжести течения инфекционно-воспалительных процессов в респираторном тракте больных муковисцидозом.

Поиск лабораторных параметров в альтернативных биологических жидкостях, например в мокроте, может служить дополнительным диагностическим критерием в диагностике инфекционных осложнений бактериального генеза при муковисцидозе, разработка критериев клинической значимости изменения при динамическом наблюдении за состоянием пациента позволит оценить тяжесть течения и обострения инфекционно-воспалительного процесса в бронхолегочной системе. Однако, использование мокроты в качестве субстрата для биохимических исследований требует валидации методик и стандартизации преаналитической подготовки материала, а также персонализированного

подхода к каждому пациенту при интерпретации полученных результатов. Валидирующие мероприятия, в свою очередь, предполагают предварительное изучение закономерностей внутрииндивидуальных колебаний аналитов при исследовании новых биосубстратов [Фрейзер К. Г., 2010; Мурский С. И., 2019].

В диагностике инфекционных осложнений муковисцидоза исследование микроорганизмов на популяционном уровне является определяющим не только с точки зрения контроля за противоэпидемическими мероприятиями, но и представляет интерес в организации и проведении микробиологических исследований. Оптимизация методов выделения, культивирования и идентификации микроорганизмов при муковисцидозе остается наиболее значимым диагностическим звеном, определяющим вектор терапии и прогноз заболевания. Вместе с тем остается открытым вопрос клинического значения выделенных микроорганизмов и роль конкретного патогена в развитии инфекционных осложнений. Недостаточно освещены особенности метаболизма клинически значимых для пациентов с муковисцидозом микроорганизмов, в первую очередь НФГОБ, их роль в экологии микробных сообществ и взаимодействие с макроорганизмом.

Таким образом, необходим поиск дополнительных лабораторных показателей инфекционно-воспалительных осложнений в бронхолегочной системе у пациентов с муковисцидозом, вызванных НФГОБ с разработкой критериев значимости их изменений. Использование информации о метаболических особенностях клинически значимых для больных муковисцидозом микроорганизмов поможет оптимизировать методы культивирования и идентификации патогенов. Актуальным является регулярный микробиологический мониторинг структуры микробиоты пациентов с оценкой клинического течения обострения хронического инфекционного процесса в легких.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Полученные за последние десятилетия данные по этиопатогенезу и распространенности муковисцидоза способствовали появлению новых подходов к диагностике и терапии инфекционных осложнений, вызванных НФГОБ. Описаны работы по исследованию мокроты с целью поиска маркеров инфекционно-воспалительного процесса, однако отсутствуют данные по валидации методов биохимического анализа мокроты и стандартизации преаналитического этапа исследования, которые обеспечивают достоверность получаемых результатов [Radtke T., 2018; Koller D.Y., 1997; Mohan S., 2017; HaileMariam M., 2021; Rubin, B.K., 2009; Gray R.D., 2010].

В зарубежной литературе имеются данные, характеризующие более высокие уровни железа и железосвязывающих белков в мокроте больных муковисцидозом по сравнению с пациентами с другими заболеваниями бронхолегочной системы [Reid D.W., 2004; Hunter

R.C., 2013; Stites S.W., 1998]. Однако нет данных об интерпретации полученных результатов и значении их изменения при оценке состояния пациента. Также не проводилось изучения взаимосвязи показателей обмена железа и видовым составом микробиоты, инфицирующей респираторный тракт пациентов с муковисцидозом.

Описаны механизмы утилизации микроорганизмом железа из окружающей среды и его значение для метаболизма бактерий из *Burkholderia cepacia* complex [Whitby P.W., 2006; Butt, A.T., 2008; Butt, A.T., 2017; Tyrrell J., 2015; Sass A.M., 2020]. При этом отсутствует информация об использовании железосодержащих добавок для культивирования бактерий *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала пациентов с муковисцидозом, а также влияние их применения на результаты видовой идентификации с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

### **Цель исследования**

Определить дополнительные клинико-лабораторные критерии диагностики инфекционно-воспалительных процессов в легких у пациентов с муковисцидозом для прогнозирования риска развития осложнений, вызванных неферментирующими грамотрицательными бактериями.

### **Задачи исследования:**

1. Оценить видовое разнообразие микробиоты, выделенной из нижних дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом и определить в ней долю представителей неферментирующих грамотрицательных бактерий с установлением сроков выделения наиболее значимых патогенов.
2. Провести валидирующие мероприятия методов биохимического исследования показателей обмена железа в мокроте.
3. Проанализировать результаты биохимического исследования содержания железа и железосвязывающих белков в мокроте и сыворотке крови у пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы.
4. Выявить особенности изменений показателей обмена железа в мокроте и сыворотке крови у пациентов с муковисцидозом в зависимости от микробиоты, выделенной из нижних дыхательных путей.
5. Оценить влияние железосодержащей добавки для плотных питательных сред на ростовые свойства представителей *Burkholderia cepacia* complex при исследовании клинического материала от пациентов с муковисцидозом.
6. Разработать критерии значимости изменений биохимических показателей мокроты для оценки динамики течения инфекционно-воспалительного процесса у пациентов с муковисцидозом.

## **Научная новизна**

Предложен новый стандарт проведения преаналитического этапа для биохимического исследования мокроты. Проведен комплекс валидирующих мероприятий для биохимического исследования содержания железа, ферритина, трансферрина в мокроте.

Рассчитаны коэффициенты критической разницы показателей обмена железа в мокроте, которые могут быть использованы для динамического наблюдения за развитием инфекционного процесса в легких, вызванного неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом.

Предложены критерии коэффициента персональной критической разницы для содержания ферритина в мокроте у пациентов с муковисцидозом и высевом *Burkholderia cepacia* complex для оценки риска развития осложнений и степени участия микроорганизма в инфекционном процессе.

Разработана питательная среда для культивирования микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex с железосодержащей добавкой для повышения показателя продуктивности.

Доказано влияние органической соли железа в качестве ростовой добавки в питательной среде на улучшение результатов идентификации при использовании метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Показано видовое разнообразие неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных из нижних дыхательных путей пациентов с муковисцидозом Самарской области.

Предложен алгоритм стандартизации преаналитической пробоподготовки мокроты для последующего биохимического анализа (Патент РФ № 2686052).

Проведенный комплекс валидирующих мероприятий для определения показателей обмена железа в мокроте с помощью методов биохимического исследования позволяет использовать рутинные методики исследования для тестирования образцов мокроты.

Рассчитаны коэффициенты критической разницы для оценки изменений показателей обмена железа в мокроте и персональной критической разницы для ферритина, что может использоваться в оценке состояния пациентов с муковисцидозом при динамическом наблюдении (Патент РФ № 2789114).

Разработана плотная питательная среда для культивирования микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex (Патент РФ № 2759831). Установлено повышение показателя продуктивности плотных питательных сред и улучшение результатов идентификации с

помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии *Burkholderia cepacia* complex при использовании железосодержащих добавок.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа выполнялась с соблюдением всех правил проведения научных исследований и международных и российских этических принципов и норм. Для реализации цели и решения задач исследования применялись общенаучные, как теоретико-эмпирические, так и специальные методы научного познания. Для обоснования основных положений были использованы анализ литературы, изучение нормативных документов, лабораторные и статистические методы.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Методы биохимического исследования показателей обмена железа в сыворотке крови применимы для исследований мокроты и могут быть использованы для определения содержания железа, ферритина и трансферрина после проведения корректирующих мероприятий, основанных на результатах валидации.
2. Доминирующими микроорганизмами среди неферментирующих грамотрицательных бактерий у пациентов с муковисцидозом в Самарской области являются представители *Burkholderia cepacia* complex, характеризующиеся замедленным ростом при посеве клинического материала.
3. Высокие уровни железа и железосвязывающих белков в мокроте и снижение уровня железа в сыворотке крови достоверно взаимосвязаны с инфицированием неферментирующими грамотрицательными бактериями у пациентов с муковисцидозом и могут быть использованы для прогнозирования риска развития инфекционных осложнений.
4. Использование железа (III) гидроксида полимальтозата в качестве ростовой добавки повышает показатель продуктивности селективной питательной среды для выделения бактерий *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала и сокращает сроки их культивирования, что может быть использовано для улучшения микробиологической диагностики инфекционных осложнений у пациентов с муковисцидозом.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов обоснована теоретическим анализом проблемы с использованием литературных данных международных цитируемых баз, достаточным объемом выборок обследованных лиц, использованием современных методов исследования и корректными приемами статистической обработки.

Результаты диссертационного исследования были представлены и обсуждены на V Юбилейном Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2019), XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию ЮУГМУ (Челябинск, 2019), Научно-практической конференции «Современные методы лабораторной диагностики: технологии и клиническая значимость», посвященной 100-летию СамГМУ в рамках тридцать пятой образовательной недели (Самара, 2019), Научно-практической конференции «Муковисцидоз (клиническая картина, диагностика, лечение, диспансеризация)» (Ижевск, 2019), 30-м Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (Париж, 2020), 43-ей Европейской конференции по муковисцидозу (Лион, 2020), Всероссийском конгрессе по микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии (XXIII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2020), XXV Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Наука и практика лабораторных исследований» (Москва, 2020), Научно-практической конференции «Актуальные вопросы лабораторной медицины» (Самара, 2021).

#### **Личный вклад автора**

Диссертант непосредственно участвовал на всех этапах проведения исследования. Формулировка цели и задач, разработка дизайна исследования проводились совместно с научными руководителями д.м.н., доцентом Гусяковой О.А. и д.м.н., доцентом Ляминим А.В. Сбор и анализ зарубежной и отечественной литературы по теме диссертационного исследования, проведение лабораторных исследований, статистическая обработка результатов, написание текста диссертации выполнены диссертантом самостоятельно. Подготовка публикаций и докладов по теме исследования выполнена совместно с сотрудниками кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой и кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

#### **Внедрение результатов в практику**

Результаты проведенного исследования используются в работе отдела лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, клиничко-диагностических лабораторий Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ГБУЗ «Самарская областная детская клиническая больница им. Н.Н. Ивановой», ГБУЗ СО «Тольяттинская городская больница №5». Результаты диссертационного исследования



включены в программу практических занятий и лекционного курса для студентов, ординаторов и врачей, также используются в научно-исследовательской деятельности кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; общей и клинической микробиологии, иммунологии, аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

#### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертационного исследования опубликовано 17 печатных работ, включая 5 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, получено 3 патента РФ на изобретение.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием использованных материалов и методов исследования, четырех глав собственных данных, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация изложена на 160 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 таблицами и 29 рисунками. Список литературы состоит из 158 источников, из них 26 – отечественные, 132 – зарубежные.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** Исследование проводилось на базе клиничко-диагностической лаборатории Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Материал от пациентов с диагнозом «Кистозный фиброз» (код по МКБ E84) поступал из Самарского областного центра по оказанию медицинской помощи больным муковисцидозом на базе инфекционного отделения ГБУЗ СОДКБ им. Н.Н. Ивановой. Всего в исследовании использовался материал от 88 больных муковисцидозом, в возрасте от 5 до 34 лет. Критериями включения являлись лабораторно и клинически верифицированный диагноз, наличие свободно отделяемой мокроты. Критерием исключения из исследования являлось отсутствие свободно отделяемой мокроты.

Материал от пациентов с диагнозами «Пневмония» (код по МКБ J15.9) и «Бронхит» (код по МКБ J40) поступал из отделения пульмонологии и аллергологии Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Критериями включения в группы обследования были наличие свободно отделяемой мокроты, лабораторные признаки острого воспаления:

лейкоцитоз  $>10 \cdot 10^9/\text{л}$ , СРБ  $>5$  мг/л, СОЭ  $>20$  мм/ч. Схема дизайна исследования приведена на рисунке 1.

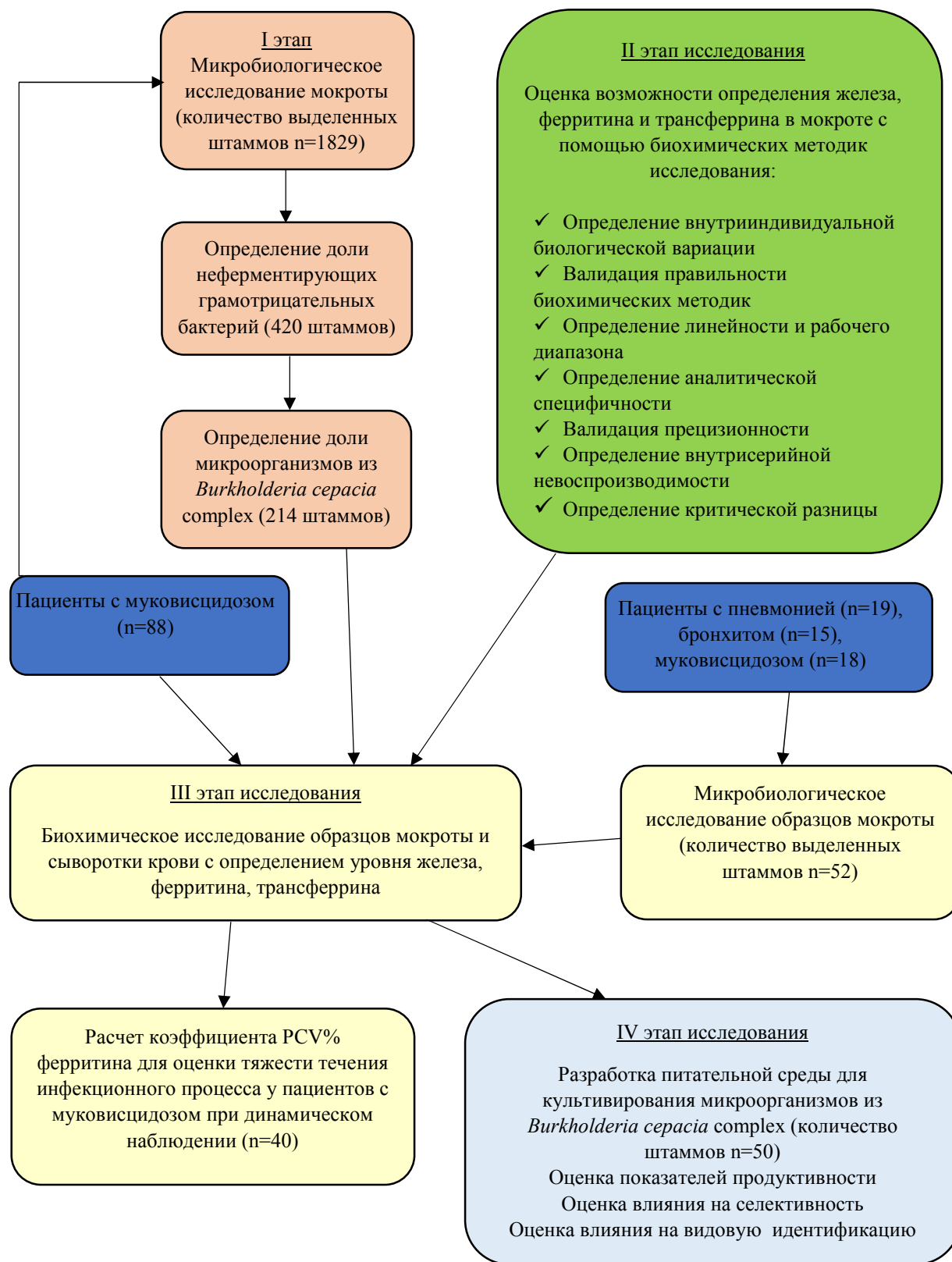


Рисунок 1 – Схема дизайна исследования

Сбор образцов мокроты проводился в соответствии с методическими указаниями 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». Пробоподготовка образцов мокроты для биохимических исследований проводилась по авторской методике, описанной в Патенте РФ № 2686052. Взятие образцов крови для исследования проводилось в утреннее время, натощак (последний прием пищи не позднее, чем за 12 часов до взятия), путем венопункции из локтевой вены.

Проведение комплекса валидирующих мероприятий для последующего биохимического исследования железа и железосвязывающих белков в мокроте включало в себя определение соответствия критериям специфичности, линейности, прецизионности и правильности методик. Определение показателей обмена железа в мокроте и сыворотке крови проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400+ (Roche Diagnostics, Швейцария). Для выполнения исследований и проведения контроля качества также использовались коммерческие реактивы и наборы компании Roche Diagnostics (Швейцария).

Для посева поступившей в лабораторию мокроты использовался метод секторных посевов на следующие плотные питательные среды: универсальная хромогенная среда (BioRad, США), 5% кровяной агар с бараньей кровью (HiMedia, Индия). Для культивирования дрожжеподобных и мицелиальных грибов применялся посев «в три точки» на агар Сабуро (HiMedia, Индия). При работе с материалом от пациентов с муковисцидозом дополнительно проводился посев на селективную питательную среду *Burkholderia cepacia* selective agar (HiMedia, Индия). Идентификация проводилась с помощью метода MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Для проведения серии экспериментов по повышению показателя продуктивности и по сохранению свойств селективности при разработке плотной питательной среды с ростовой добавкой в виде органических солей железа для выделения микроорганизмов из ВСС из клинического материала, а также для подготовки инокулюма из контрольных культур были использованы методики, описанные в клинических рекомендациях «Внутрилабораторный контроль качества питательных сред для микробиологических исследований», 2014 год.

Проведение анализа белковых профилей, полученных при видовой идентификации микроорганизмов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии осуществлялось с помощью программного обеспечения flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета

программ Microsoft Office Excel 2013, MedCalc (version 11.3.0) и StatTech (version 2.4.3, разработчик ООО "Статтех", Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки видового разнообразия микробиоты нижних дыхательных путей больных МВ было проведено микробиологическое исследование 613 образцов мокроты от 88 пациентов Самарской области. Всего за период исследования было выявлено и идентифицировано 1829 штаммов микроорганизмов, ранжированных на группы клинического значения для больных МВ.

При анализе полученных результатов было определено, что доминирующей группой являются бактерии, не имеющие клинического значения в развитии легочной патологии у пациентов с МВ, выделенные в количестве 1060 штаммов, что представляет долю в 58% от общего числа выделенных микроорганизмов. К данной когорте, в соответствии с руководством по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей пациентов с муковисцидозом также были отнесены 37 штаммов *S.pneumoniae* и 80 бактерии из порядка *Enterobacteriales*, выделенные в многокомпонентных ассоциациях с представителями нормальной микробиоты слизистых оболочек, в титрах от  $10^2$  до  $10^4$  КОЕ включительно, что является сомнительным критерием участия данных патогенов в инфекционно-воспалительном процессе легких. В случаях выявления в количестве  $\geq 10^5$  КОЕ в монокультуре либо в двухкомпонентных ассоциациях с бактериями нормальной орофарингеальной флоры, данные микроорганизмы могут быть расценены как клинически значимые при сопутствующих клинических проявлениях.

Группа бактерий, имеющих доказанное клиническое значение для пациентов с МВ, по результатам нашего исследования, была представлена 577 штаммами, что составило 31,5% от общего числа микроорганизмов. Лидирующее положение в данной группе занимал *S.aureus*, выделенный в 223 случаях, что является долей в 38,65% от общего числа выявленных клинически значимых возбудителей.

Сопоставимыми оказались данные по распространенности бактерий из *Burkholderia cerasia* complex, идентифицированных в количестве 214 штаммов, что составило 37,1% в группе микроорганизмов, имеющих доказанное клиническое значение. Следует отметить, что микроорганизмы не отличались по культуральным и другим свойствам в случае выделения от пациентов, сдавших мокроту во время обострения и в период ремиссии, что значительно затрудняет оценку их клинического значения в конкретный момент течения заболевания и не дает возможности оценить риск развития «цепация-синдрома». В 35

случаях наблюдались ассоциации бактерий из ВСС с двумя и более микроорганизмами из разных родов, включая микроорганизмы из групп с доказанным и сомнительным значениями для пациентов с МВ. Также у пациентов с длительным хроническим инфицированием отмечалась тенденция к диссоциации бактерий из ВСС на 2 морфотипа, которые впоследствии становятся истинно доминирующими возбудителями, реже выделяясь в ассоциациях с представителями других родов (Рисунок 2).

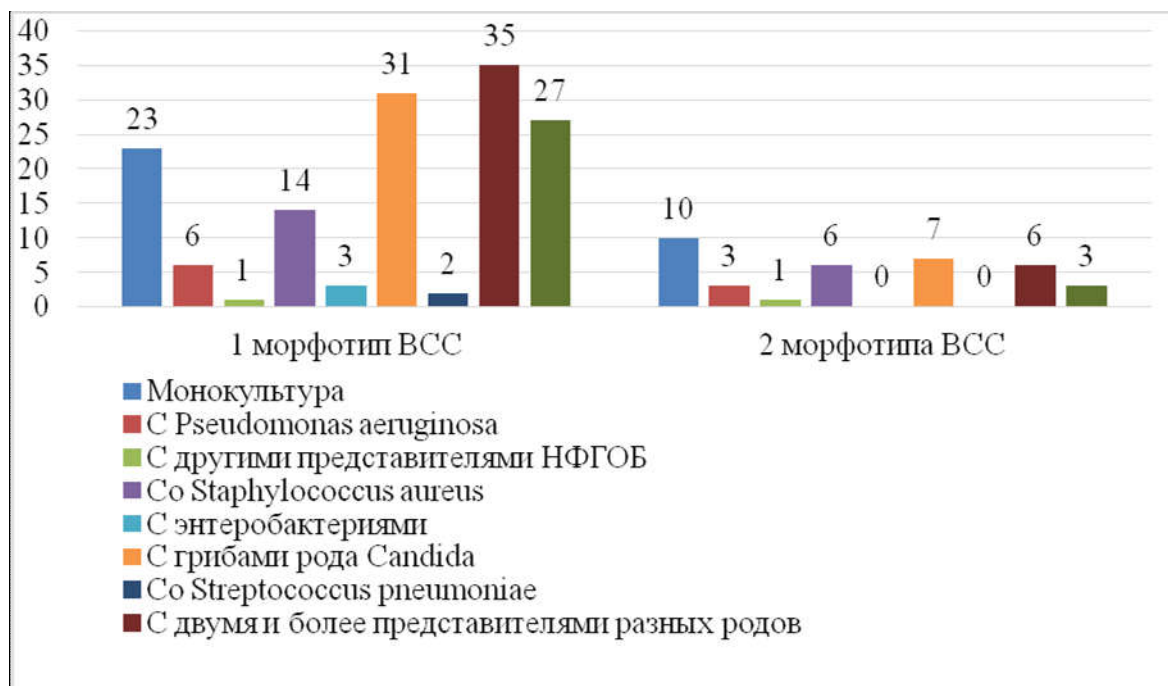


Рисунок 2 – Ассоциации бактерий из *Burkholderia cepacia* complex с микроорганизмами других родов в абсолютных значениях

Следующим по частоте встречаемости патогеном был вид *P.aeruginosa*, представленный 109 штаммами и 18,9% в структуре клинически значимых микроорганизмов. Оставшаяся часть клинически значимых микроорганизмов была представлена 20 штаммами *S.maltophilia*, 7 штаммами *A.xylooxidans* и 4 штаммами *H.influenzae*, что в целом составило 5,4% группы.

Таким образом, выявлено, что бактерии с доказанной клинической значимостью образуют подавляющее большинство (83,3%) в структуре всех НФГОБ, выделенных из мокроты больных МВ Самарской области. В случае с микроорганизмами ВСС необходимо отметить, что данные возбудители по частоте встречаемости на первом месте среди выявленных НФГОБ и на втором в структуре всех клинически значимых патогенов. Большое значение имеет качественная и своевременная микробиологическая диагностика не только при обострениях хронического инфицирования и риске развития «цепация-синдрома», когда временной ресурс ограничен, но и при раннем выявлении патогена,

когда клинические проявления еще отсутствуют и вероятность эрадикации возбудителя выше. Полученные результаты по распространенности НФГОб среди пациентов с МВ обосновывают необходимость разработки новых методов оценки их участия в инфекционном процессе, в том числе, и на основании клинико-лабораторных данных.

В связи с тем, что в рутинной практике мокрота не используется в качестве биологического материала для биохимических исследований, а также отсутствуют общепринятые референтные величины определяемых в ней показателей, первоначально были определены коэффициенты внутрииндивидуальной биологической вариации (CVi%) для показателей обмена железа среди клинически здоровой группы курильщиков (n=10). Определение коэффициентов CVi позволило в дальнейшем провести расчет общей аналитической ошибки и продолжить валидацию методик.

Валидация правильности биохимических методик исследования с расчетом общей аналитической ошибки проводилась на основании протокола CLSI EP15-A2. Проведен анализ 20 проб валидируемым нами методом и методами сравнения. Полученные результаты позволили определить аналитическое смещение и стандартное отклонение различий, что в свою очередь позволяет определить доверительные границы валидируемой методики. По итогу, в соответствии с ГОСТом Р 53133.1-2008 была рассчитана общая аналитическая ошибка (Tea%), составившая для железа 34,3%, для ферритина 33,7% и для трансферрина 30%. В соответствии с протоколом CLSI EP-6A были определены рабочие диапазоны биохимической методики исследования: для железа они составили 2-72,5 мкмоль/л, для ферритина – 22-295 мкг/л, для трансферрина – 0,017-0,074 г/л. Высокие значения содержания ферритина, определяемые у пациентов с муковисцидозом, требуют предварительного разведения 1:20 – 1:60.

Аналитическую специфичность биохимических методик при исследовании показателей обмена железа в мокроте определяли с помощью эксперимента на открытия в соответствии с ГОСТом Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний» и протоколом CLSI EP7-A2. Полученные значения процента открытия для всех аналитов находились в пределах 90-100%, что отвечает критериям приемлемости нормативных документов.

Для валидации прецизионности биохимических методик исследования показателей обмена железа в мокроте был использован протокол CLSI EP5-A2. Первоначально было необходимо вычислить межсерийный коэффициент вариации (CV%), составивший для железа 4,65%, для ферритина 2,56%, для трансферрина 6,02%. Полученные результаты вместе с определенными до этого значениями общей аналитической ошибки и аналитического смещения, позволили определить аналитическую эффективность

методики, соответствующую мировому уровню приемлемости для железа и ферритина, и хорошему уровню приемлемости для трансферрина.

Установлено соответствие внутрисерийной невоспроизводимости метода исследования показателей обмена железа в мокроте критериям Приказа № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» и ГОСТа Р53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях».

Определение критической разницы (RCV%) для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении изменений показателей обмена железа в мокроте было проведено согласно ГОСТу Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». Полученные коэффициенты RCV для железа (48,3%), ферритина (35,1%) и трансферрина (45,5%) использовались в дальнейшем для определения коэффициента персональной разницы (PCV%), позволяющем оценить клиническую значимость изменения количества железа и железосвязывающих белков в мокроте.

Для выявления дополнительных показателей воспаления, вызванного НФГОБ, в нашем исследовании было проведено обследование пациентов с заболеваниями бронхолегочной системы: пневмония (n=19), бронхит (n=15), муковисцидоз (n=18). Были определены показатели обмена железа в мокроте и сыворотке крови; предварительно проводился посев всех образцов мокроты с выделением и видовой идентификацией возбудителей.

По результатам биохимического исследования мокроты было выявлено, что у пациентов с МВ содержание железа, ферритина и трансферрина в мокроте значительно выше, чем у пациентов с другими нозологиями ( $p < 0,05$ ). При биохимическом анализе сыворотки крови были выявлены статистически значимые различия по уровню железа и ферритина, у пациентов с МВ эти показатели были достоверно ниже, чем у пациентов с бронхитом и пневмонией ( $p < 0,05$ ). Полученные различия могут быть связаны с хроническим инфицированием респираторного тракта больных МВ специфическими НФГОБ, обычно не контаминирующими дыхательные пути здоровых людей и пациентов с другими заболеваниями. В связи с этим нами был проведен анализ результатов бактериологического посева мокроты всех трех групп пациентов, выявивший преобладание НФГОБ у пациентов с МВ: у четырех пациентов выделены бактерии из

ВСС, у троих идентифицированы штаммы *P.aeruginosa*, по одному – *A.xylooxidans* и *S.maltophilia*. Наряду с этим, в группе пациентов с пневмонией было выделено четыре штамма НФГОБ – по два случая выявления *P.aeruginosa* и *A.baumannii*, а преобладающей микробиотой были представители грамположительных микроорганизмов (n=9). В группе пациентов с бронхитом также преобладали грамположительные возбудители (n=9), а НФГОБ были выделены лишь в трех случаях: определен один штамм *A.baumannii* и два штамма *P.aeruginosa*.

Полученные результаты позволяют предположить зависимость содержания железа и железосвязывающих белков в мокроте и сыворотке крови с выделенными микроорганизмами среди больных МВ. В связи с этим следующим этапом нашей работы было обследование большего количества пациентов с МВ. За период проведения исследования было обследовано 88 пациентов с МВ Самарской области. Обследование также включало в себя предварительное микробиологическое исследование мокроты, по результатам которого пациенты бы ли разделены на 2 группы: к первой группе были отнесены пациенты, инфицированные НФГОБ с доказанным клиническим значением (n=67), ко второй – пациенты, по результатам посева мокроты которых были выявлены другие микроорганизмы (n=21).

Проведенное биохимическое исследование показало достоверные различия между группами по содержанию железа, ферритина и трансферрина в мокроте: уровень железа в группе с НФГОБ по медиане составил 16,10 (6,60–37,80) мкмоль/л, ферритина 831,60 (207,50–4609,10) мкг/л, трансферрин в мокроте обнаружен не был; в группе пациентов с высевом другой микробиоты показатели обмена железа в мокроте значительно ниже, уровень железа по медиане был равен 3,05 (2,15–4,53) мкмоль/л, ферритина 45,35 (24,00–95,35) мкмоль/л, трансферрин также не был обнаружен (Рисунок 3).

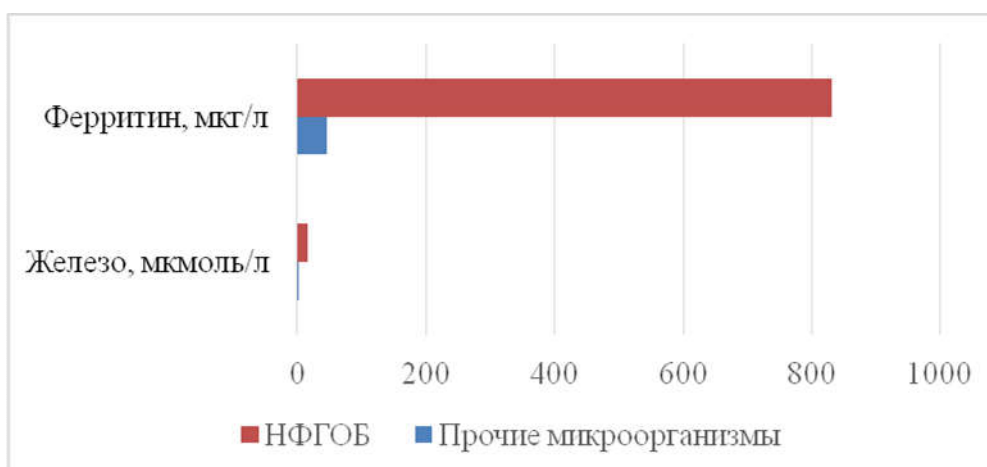


Рисунок 3 – Сравнение содержания железа и ферритина в мокроте пациентов с муковисцидозом по результатам микробиологического исследования



При оценке результатов биохимического исследования сыворотки крови были отмечены статистически значимые различия по содержанию железа: у пациентов с НФГОБ уровень железа в крови оказался достоверно ниже, и по медиане составил 10,00 (6,75–16,30) мкмоль/л. Среди пациентов с высевом других микроорганизмов данный показатель был выше и составил по медиане 14,45 (11,41–21,25) мкмоль/л ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 4).

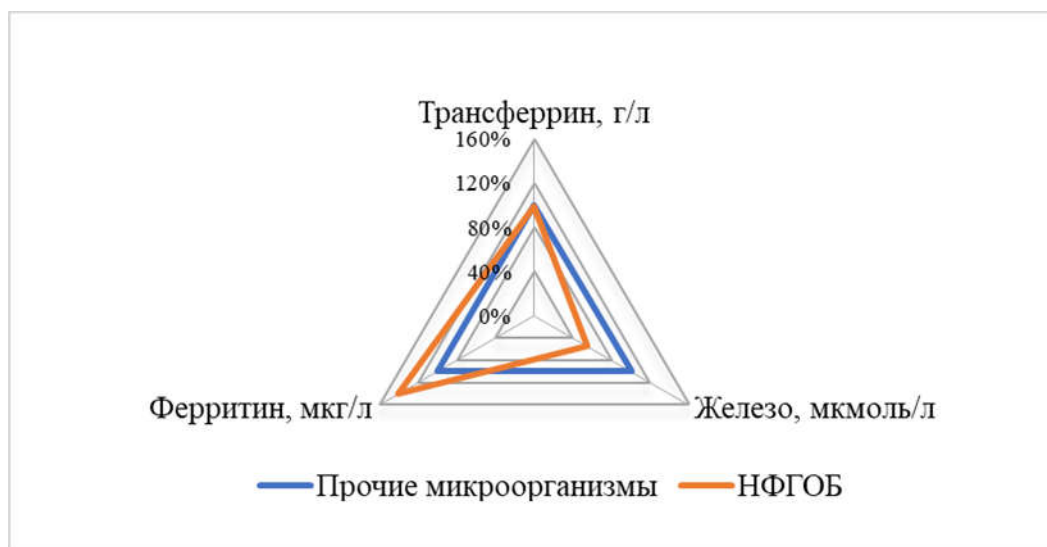


Рисунок 4 – Сравнение содержания железа, ферритина, трансферрина в сыворотке крови пациентов с муковисцидозом по результатам микробиологического исследования

По полученным результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что высокое содержание железа и железосвязывающих белков в мокроте больных МВ достоверно связано с выявлением НФГОБ. Также, можно предположить, что хроническое инфицирование НФГОБ может быть причиной железодефицита, а соответственно развития анемий у пациентов с МВ. Закономерно возникает вопрос можно ли использовать показатели обмена железа для оценки активности инфекционно-воспалительного процесса в легких и прогноза развития осложнений?

По результатам проведенных валидирующих мероприятий нами был определен коэффициент критической разницы (RCV%) показателей обмена железа в мокроте для оценки значимости изменения этих показателей при динамическом наблюдении (Таблица 1). Коэффициент RCV%, в свою очередь, дает возможность в дальнейшем оценить коэффициент персональной разницы (PCV%), рассчитываемый индивидуально для каждого пациента и позволяющий оценить значимость изменения показателей обмена железа в мокроте при динамическом наблюдении за состоянием пациента.

Таблица 1 – Критическая разница показателей обмена железа в мокроте при динамическом наблюдении

| Аналит      | $CV_A$ | $CV_i$ | RCV   |
|-------------|--------|--------|-------|
| Железо      | 4,65%  | 16,8%  | 48,3% |
| Ферритин    | 2,56%  | 12,4%  | 35,1% |
| Трансферрин | 6,02%  | 15,3%  | 45,5% |

С помощью проведения ROC-анализа установлены пороговые значения RCV ферритина и приемлемые уровни чувствительности и специфичности в рамках оценки риска осложнения инфекционного процесса у пациентов с муковисцидозом.

Таким образом, повышение значений железа и железосвязывающих белков в мокроте пациентов с МВ могут свидетельствовать об обострении инфекционно-воспалительного процесса в легких пациентов с МВ, вызванного НФГОБ, а рассчитанные коэффициенты RCV% и PCV% позволяют оценить значимость изменения данных показателей и спрогнозировать развитие осложнений. Помимо этого, достоверное снижение железа в крови у пациентов, инфицированных НФГОБ может быть одной из причин железодефицитных состояний пациентов с МВ.

Как мы видим, тенденция повышения количества железа в респираторном тракте и его снижения в крови пациентов с МВ может быть результатом жизнедеятельности НФГОБ, в частности ВСС, обусловленным особенностями их метаболизма и потребностью, что может быть выявлено лабораторными исследованиями. Вследствие этого попытки использования соединений железа в микробиологической диагностике для оптимизации культивирования и идентификации ВСС могут быть аргументированы.

Известно, что железо является эссенциальным микроэлементом для бактерий ВСС, обеспечивающим процессы жизнедеятельности микробной клетки. Применение железа в качестве ростовой добавки может повысить показатель продуктивности питательной среды, что в свою очередь позволит сократить сроки культивирования патогенов из ВСС. Данный факт является одной из приоритетных задач при микробиологическом обследовании пациента с МВ в период ухудшения состояния. По результатам нашего исследования было предложено использование железа (III) гидроксид полимальтозата в качестве ростовой добавки при приготовлении селективных плотных питательных сред для выделения бактерий ВСС для первичного посева клинического материала от больных МВ. Добавление железа (III) гидроксид полимальтозата в количестве, соответствующем 80 мг или 120 мг железа на один литр агаризованной среды достоверно повышает

показатель продуктивности по сравнению с коммерческой селективной питательной средой OFPBL Agar ( $p < 0,01$ ).

Далее проведена оценка влияния добавления железосодержащей ростовой добавки на результаты идентификации методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Проведенное исследование на 50 штаммах бактерий BCC, выделенных из мокроты пациентов с МВ показало, что штаммы, культивируемые на питательных средах с предложенной добавкой, достоверно лучше проходят видовую идентификацию (Рисунок 5).

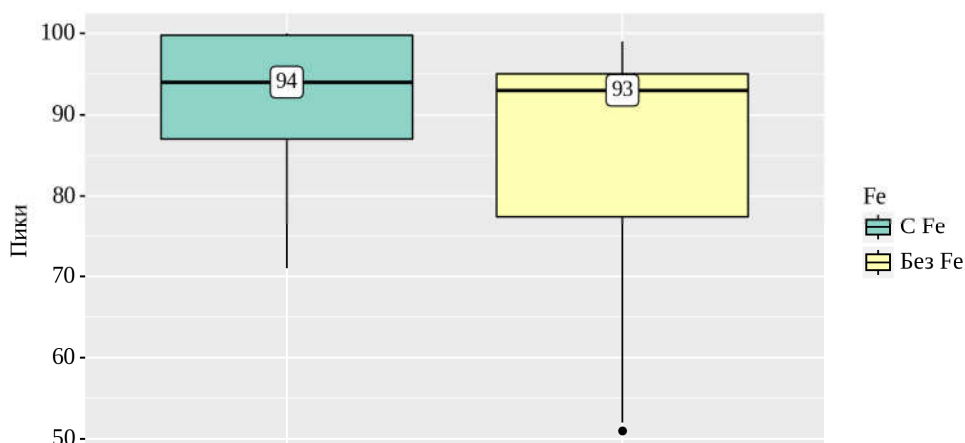


Рисунок 5 – Сравнение количества пиков в масс-спектрах, полученных при идентификации микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex, культивированных на средах с железосодержащей добавкой и без добавки

При определении видовой принадлежности бактерий, культивированных на питательной среде с железосодержащей добавкой, получено большее количество масс-спектров, чем при идентификации штаммов, выращенных на коммерческой питательной среде OFPBL Agar, полученные различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

Также достоверно определено повышение показателя Score в результате идентификации BCC при использовании предлагаемой питательной среды в сравнении с применением коммерческой селективной питательной среды OFPBL Agar ( $p < 0,001$ ) (Таблица 2).

Таблица 2 – Результаты сравнения уровней коэффициента совпадения (Score) полученных при идентификации микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex, культивированных на средах с железосодержащей добавкой и без добавки

| Вид питательной среды | Score |                                 |    | p       |
|-----------------------|-------|---------------------------------|----|---------|
|                       | Me    | Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> | n  |         |
| С добавкой            | 2,30  | 2,27 – 2,35                     | 50 | < 0,001 |
| Без добавки           | 2,23  | 2,19 – 2,30                     | 50 |         |

Таким образом, использование железосодержащей ростовой добавки для плотных питательных сред достоверно повышает показатель продуктивности среды, сокращая сроки культивирования патогенов ВСС и при этом, не влияя на ее селективные свойства, повышая в конечном итоге точность видовой идентификации методом MALDI-ToF масс-спектрометрии.

## ВЫВОДЫ

1. При оценке видового разнообразия микробиоты, выделенной из нижних дыхательных путей пациентов с муковисцидозом, установлено, что доля неферментирующих грамотрицательных бактерий составила 23% от общего числа выделенных микроорганизмов, из которых 51% были представлены патогенами из *Burkholderia cepacia* complex.
2. Выделение представителей *Burkholderia cepacia* complex при первичном посеве клинического материала больных муковисцидозом по медиане составило четверо суток и характеризовалось преобладанием ассоциаций с другими микроорганизмами (84,6%). Сопутствующая флора не оказывала влияния на сроки выделения *Burkholderia cepacia* complex.
3. При проведении валидирующих мероприятий по критериям специфичности, линейности, прецизионности и правильности показана приемлемость методик биохимического исследования для определения железа, ферритина и трансферрина в мокроте после проведения корректирующих мероприятий, основанных на результатах валидации.
4. По результатам биохимического исследования мокроты установлено достоверное отклонение в сторону увеличения содержания железа и ферритина у больных муковисцидозом, по сравнению с пациентами с другими заболеваниями бронхолегочной системы. В сыворотке крови у пациентов с муковисцидозом уровень железа и ферритина достоверно ниже, чем у пациентов с другими нозологиями.
5. Показано достоверное повышение количества железа и ферритина в мокроте пациентов с муковисцидозом, инфицированных неферментирующими грамотрицательными бактериями, по сравнению с пациентами, инфицированными микроорганизмами других групп.
6. Применение железосодержащей добавки для плотных питательных сред позволяет сократить сроки культивирования представителей *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала от пациентов с муковисцидозом.

7. Определены критерии значимости изменений уровня ферритина при биохимическом исследовании мокроты для оценки динамики течения инфекционно-воспалительного процесса у пациентов с муковисцидозом.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для специалистов клинико-диагностических лабораторий рекомендовано применение биохимических исследований мокроты с использованием стандартизированной процедуры пробоподготовки при проведении преаналитического этапа (Патент РФ № 2686052).

2. Для оценки клинической значимости изменения уровня ферритина в мокроте больных муковисцидозом врачам-педиатрам и врачам-пульмонологам рекомендуется определять коэффициент персональной разницы (PCV%) с последующим ранжированием пациентов по течению инфекционного процесса (Патент РФ № 2789114).

3. Для врачей-бактериологов и медицинских микробиологов рекомендовано применение ростовой добавки в виде железа (III) гидроксид полимальтозата в количестве, соответствующем концентрации железа 80 мг/л для повышения показателя продуктивности плотной питательной среды и сокращения сроков выделения микроорганизмов *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала от пациентов с муковисцидозом (Патент РФ № 2759831).

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Перспективным является поиск новых дополнительных маркеров воспаления в мокроте и валидация методик их исследования для оценки тяжести течения инфекционно-воспалительных процессов в бронхолегочной системе и прогнозирования развития осложнений.

Исследование ростовых добавок, в том числе содержащих железо в различных формах и их влияния на результаты культивирования и видовой идентификации бактерий, вызывающих инфекционно-воспалительные процессы в нижних дыхательных путях пациентов с муковисцидозом.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ**

1. Козлов, А.В. Диагностические возможности современного биохимического исследования мокроты у пациентов с муковисцидозом (обзор литературы) / А.В. Козлов,

О.А. Гусякова, А.А. Ерещенко, А.В. Халиулин // Клиническая лабораторная диагностика – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 24-28.

2. Козлов, А.В. Метаболизм железа как патогенетическое звено развития инфекционных осложнений при муковисцидозе / А.В. Козлов, О.А. Гусякова, А.В. Лямин, А.А. Ерещенко, О.В. Арчибасова, Н.В. Иванова, А.В. Жестков, Д.Ф. Сергиенко // Астраханский медицинский журнал – 2019. – Т.14, № 2. – С. 25-33.

3. Козлов, А.В. Хроническая инфекция дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом: обмен железа и его значение / А.В. Козлов // Иммунопатология, аллергология, инфектология – 2019. – № 4. – С. 62-67.

4. Козлов, А.В. Микобактериозы у пациентов с муковисцидозом: причина или следствие микрoэкологических изменений в бронхолегочной системе / А.В. Козлов, А.В. Лямин, О.В. Кондратенко, О.А. Гусякова, А.В. Жестков, Д.Д. Исмагуллин, А.В. Халиулин // Астраханский медицинский журнал – 2020. – Т.15, № 1. – С. 57-65.

5. Козлов, А.В. Обмен железа в бактериальной клетке: от физиологического значения к новому классу антимикробных препаратов/ А.В. Козлов, А.В. Лямин, А.В. Жестков, О.А. Гусякова, А.В. Халиулин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия – 2022. – Т.24, № 2. – С. 165-170.

#### **Авторские свидетельства, патенты**

6. Козлов, А.В. Способ оценки активности инфекционного процесса, вызванного неферментирующими грамотрицательными бактериями в бронхо-легочной системе у пациентов с муковисцидозом / А.В. Козлов, А.В. Лямин, А.А. Ерещенко, О.В. Кондратенко, Е.А. Васильева, А.В. Халиулин, Т.Р. Никитина, Л.В. Сосновская // Патент на изобретение № 2686052. Заявка: 2018134718. Опубликовано: 24.04.2019. Бюл.№12.

7. Козлов, А.В. Питательная среда для культивирования микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex / А.В. Козлов, О.А. Гусякова, А.В. Лямин, А.А. Ерещенко, О.В. Кондратенко, И.И. Исмагуллин, А.В. Халиулин, О.А. Балдина // Патент на изобретение № 2759831. Заявка: 2021115742. Опубликовано: 18.11.2021. Бюл.№32.

8. Козлов, А.В. Способ оценки риска осложнений инфекционного процесса у пациентов с муковисцидозом. / А.В. Козлов, А.А. Ерещенко, О.А. Гусякова, Ф.Н. Гильмиярова, С.И. Мурский, А.В. Лямин, Л.Н. Виноградова, О.В. Тихомирова // Патент на изобретение № 2789114. Заявка: 2022122244. Опубликовано: 30.01.2023. Бюл.№4.

#### **Статьи в научных журналах, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов**

9. Лямин, А.В. Железо как эссенциальный фактор роста микобактерий / А.В. Лямин, А.В. Халиулин, Д.Д. Исмагуллин, А.В. Козлов, О.А. Балдина // Известия

Самарского научного центра Российской академии наук – 2016. – Т. 18, № 5(2). – С. 320-327.

10. Кондратенко, О. В. Динамический мониторинг микрофлоры нижних дыхательных путей при муковисцидозе / О.В. Кондратенко, А.В. Лямин, А.В. Козлов, М.В. Видманова, М.А. Прилепина // Лаборатория. – 2016. – № 1. – С. 23.

11. Кондратенко, О. В. Видовой состав бактерий рода *Acinetobacter*, выделенных от пациентов с муковисцидозом / О. В. Кондратенко, А. В. Лямин, А. В. Козлов // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 79.

12. Козлов, А.В. Биохимические особенности крови и мокроты при инфекционном процессе у пациентов с муковисцидозом / А.В. Козлов, О.А. Гусякова, А.В. Лямин, О.В. Кондратенко, А.А. Ерещенко, Е.А. Васильева // Тезисы научно-практической конференции «Лабораторная служба в современных реалиях». Лабораторная служба. – 2019. – Т.8. – №1. – С. 32.

13. Козлов, А.В. Лабораторная диагностика инфекционно-воспалительных осложнений в бронхолегочной системе у пациентов с муковисцидозом / А.В. Козлов, А.В. Лямин, О.В. Кондратенко // Материалы XVII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 75-летию Южно-Уральского государственного медицинского университета. – Челябинск, 2019. – С. 59–61.

14. Козлов, А.В. Показатели обмена железа как маркеры развития респираторных осложнений у пациентов с муковисцидозом / А.В. Козлов, О.А. Гусякова, А.В. Лямин, О.В. Кондратенко, А.В. Халиулин, Е.А. Васильева // Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского Конгресса Лабораторной Медицины. – Москва, 2019. – С. 39.

15. Kozlov, A. Sputum iron metabolism in patients with cystic fibrosis as a marker of infectious complications / A. Kozlov, A. Lyamin, O. Gusyakova, O. Kondratenko, D. Ismatullin, A. Khaliulin // Abstract Book 2020 30<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2020. – Paris. – P. 1698.

16. Kondratenko, O. Heterogeneity of the population of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from patients with cystic fibrosis in 2019 in the Russian Federation / O. Kondratenko, A. Lyamin, A. Kozlov, A. Zhestkov, D. Ismatullin // Abstract of the 43<sup>rd</sup> European Cystic Fibrosis Conference. – 2020. – Lyon. – P. S81.

17. Kozlov, A. Structure and prevalence of micromycetes among patients with cystic fibrosis in the Russian Federation / A. Kozlov, O. Kondratenko, A. Lyamin, Y. Borzova, T. Bogomolova // Abstract of the 43<sup>rd</sup> European Cystic Fibrosis Conference. – 2020. – Lyon. – P. S85.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КОЕ – Колониеобразующие единицы

МВ – Муковисцидоз

НФГОб – Неферментирующие грамотрицательные бактерии

ВСС – *Burkholderia cepacia* complex

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

MALDI-ToF – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

PCV – Personal change value

RCV – Reference critical value