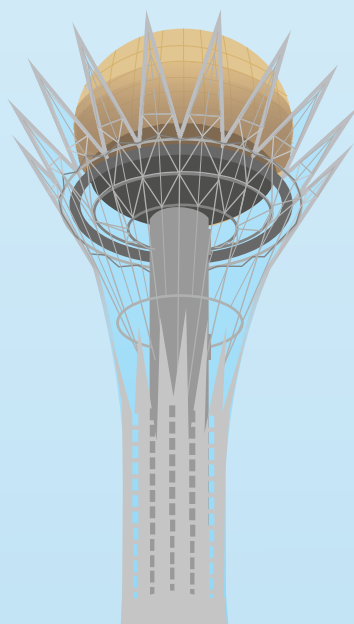


АСТАНА МЕДИЦИНАЛЫҚ ЖУРНАЛЫ



1/2020



СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК

Министерство здравоохранения
и социального развития
Республики Казахстан



***Астана
медициналық
журналы***

***Astana Medical
Journal***

***специальный выпуск
№1/2020***

*Ежеквартальный
научно-практический журнал
Собственник:*

*НАО "Медицинский университет
Астана"*

*Журнал перерегистрирован
Министерством культуры и
информации Республики Казахстан
29.10.2012 г. Астана*

*Одобрено Комитетом по контролю в
сфере образования и науки МОН РК*

Регистрационный номер 13129 Ж

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Павалькис Дайнюс

зам.главного редактора

Даулетьярова М.А.

Сармурзина З.С.

Кожахметов С.С.

Тулешова Г.Т.

Дусмагамбетов М.У.

Цой О.Г.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Шарманов Т.Ш. (Алматы)

Нургожин Т.С. (Алматы)

Батпенов Н.Д. (Астана)

Досмагамбетова Р.С. (Караганда)

Телеуов М.К. (Актобе)

Жунусов Е.Т. (Семей)

Рысбеков М.М. (Шымкент)

Rainer Rienmuller (Medical University
of Graz, Austria)

Comman I.E. (Rosewell Park Institute
of Cancer, Buffalo, USA)

Masaharu Hoshi (Hiroshima University, Japan)

АДРЕС РЕДАКЦИИ

010000 Нур-Султан

ул.Бейбитшилиқ 49А

53 корпус, 4 этаж, 412 каб.

НАО «Медицинский университет Астана»

тел.: 871728577896 внутр.459

87016166251

87024168595

e-mail: oleg_tsoy@rambler.ru

s.maïra.e@yandex.ru

Rcm



Медицинский
Университет
Астана



NAZARBAYEV
UNIVERSITY
N A T I O N A L
LABORATORY ASTANA



*Материалы Республиканской конференции «Микробиом: фундаментальные и прикладные аспекты», посвященной 70-летию доктора медицинских наук, профессора **Алмагамбетова Каиртай Хамитовича***

*Медицина ғылымдарының докторы, профессор **Қайыртай Хамитұлы Алмагамбетовтің** 70 жылдығына арналған «Микробиома: фундаменталды және қолданбалы аспектілері» республикалық конференциясының материалдары*

*Materials of the Republican Conference "Microbiome: Fundamental and Applied Aspects" dedicated to the 70th anniversary of Doctor of Medical Sciences, Professor **Kairtai Almagambetov***

АЛМАГАМБЕТОВ КАИРТАЙ ХАМИТОВИЧ

ВКЛАД В РАЗВИТИЕ РЕСПУБЛИКАНСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Алмагамбетов Каиртай Хамитович родился в селе Бузулук Есильского района Акмолинской области 5 июля 1950 года.

Его отец, Алмагамбетов Хамит Алмагамбетович, был призван на фронт, в пехотные войска. Дошел до Берлина, до стен рейхстага, был командиром отделения, заместителем командира взвода, старшиной пехотной роты. Имел ранения, контузию, был награжден орденом «Красной звезды» и медалью «За отвагу». Его мать, Кусаинова Раушан Кожаметовна, воспитала шестерых детей.

Алмагамбетов Каиртай Хамитович закончил Есильскую среднюю школу № 83, затем поступил в Целиноградский государственный медицинский университет (ЦГМИ).

В 1977 году был принят старшим лаборантом кафедры патофизиологии и ЦГМИ. Под научным руководством доктора медицинских наук, профессора Валентина Гавриловича Корпачева в 1982 году защитил кандидатскую диссертацию на тему «Отек головного мозга в постреанимационном периоде» (г. Алматы).

С 1984 по 2001 годы преподавал на кафедре микробиологии (старший преподаватель, доцент, профессор кафедры).

В 1992 году в диссертационном совете Первого московского государственного медицинского института им. И.М. Сеченова защитил докторскую диссертацию на тему «Транслокация бактерий из кишечника и ее предупреждение энтеросорбентами». Научным консультантом выступал заведующий лабораторией генетики вирулентности бактерий НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, доктор медицинских наук, профессор Виктор Михайлович Бондаренко.

В 1996 году **Алмагамбетову К.Х.** присуждено звание профессора.

С 1993 года по 1999 годы будучи проректором по научной работе и заместителем главного редактора журнала «Астана медициналык журналы» активно участвовал в подготовке научных кадров для кафедры ЦГМИ.

В мае 2001 года был переведен из ЦГМИ первым заместителем генерального директора Национального центра биотехнологии РК, расположенного в г. Степногорск.

В сентябре 2001 года после рассылки некоторым сенаторам в Вашингтоне писем с бациллами сибирской язвы стал актуальным вопрос учета и контроля микроорганизмов в Казахстане, России и других странах.

После террористических актов 11 сентября 2001 года совершённых в США членами террористической организации «Аль-Каида», встал вопрос об усилении мер по обеспечению безопасности коллекционных культур микроорганизмов, хранящихся в научно-исследовательских институтах и ВУЗах биологического профиля.

30 июля 2002 года Постановлением Правительства Республики Казахстан «О республиканской коллекции микроорганизмов» № 850 органом, осуществляющим функции республиканской коллекции микроорганизмов по промышленным микроорганизмам определено республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Республиканская коллекция микроорганизмов» (РКМ) Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

В январе 2003 года была создана межведомственная комиссия под руководством академика К.А. Тулемисовой, которая провела инвентаризацию функционирующих в Республике Казахстан коллекций патогенных и непатогенных микроорганизмов по таким параметрам, как учет штаммов, условия поддержания их жизнеспособности и обеспечения безопасности хранения, наличие паспортов.

Первым директором созданного института – республиканского депозитария ресурсов промышленных микроорганизмов, ведущим сохранение, учет и пополнение штаммов на основе их паспортизации, был назначен **Алмагамбетов Каиртай Хамитович**.

Ранее, по инициативе академика К.А. Тулемисовой 16 ноября 2001 года, за № 259 был принят Закон РК «О присоединении Республики Казахстан к Будапештскому договору о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры».

Изначально для создания коллекции профильными коллекциями Казахстана, были переданы часть хранящихся культур в фонд РКМ. Именно благодаря коллегам-микробиологам, особенно заведующей кафедрой микробиологии КазНУ им. Аль-Фараби профессора А.А. Жубановой был создан изначальный фонд коллекционных культур в депозитарии РКМ (табл.).

Таблица 1 - Количество штаммов, переданных профильными коллекциями Казахстана в фонд РКМ.

Организации, передавшие коллекции культуры в депозитарий РКМ	Количество штаммов
Институт фармбиотехнологии, г. Степногорск	56
РГП НЦБ РК	48
КазНУ им. Аль-Фараби	53
АО «Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина	28
ТОО «КазНИИПСХП» АО КазАгро-Инновация	12
РГП НЦППП г. Алматы	18
РГП «НИИ проблем биологии и биотехнологии»	17
КазНИИЗР, г. Алматы	10
КАЗНИИПП г. Алматы	6
АО "Биомедпрепарат инжиниринговый центр", г. Степногорск	3
ТОО "Биокорм" г. Степногорск	3
ТОО «Екофлора» г. Павлодар	1
ТОО «Био –Жер-Күші», г. Шымкент	1
Итого	256

Вместе с тем несколько десятков штаммов бактерий были безвозмездно переданы РКМ из рабочей коллекции лаборатории генетики вирулентности бактерий НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Параллельно были начаты работы по проверке чистоты культур, отработке технологий консервации, паспортизации штаммов в соответствии с унифицированными требованиями (в рамках Правил Будапештского договора), а также проведение патентных процедур с целью обеспечения сохранения интеллектуальных прав.

В 2003 году под общей редакцией академика НАН РК, доктора биологических наук К.А. Тулемисовой и соавторами (**Алмагамбетов К.Х.**, Махмудова Г.С. и др.) был издан первый в Казахстане Каталог культур микроорганизмов, насчитывающий более 600 штаммов, хранящихся в АО «Институт промышленной биотехнологии», РГКП «Научно-исследовательский сельскохозяйственный институт», НПЦ перерабатывающей и пищевой промышленности, Институте проблем биологии и биотехнологии при КазНУ им. Аль-Фараби, ДГП «Научно-исследовательский ветеринарный институт», ТОО «Биоком», Алматинском биокомбинате, Институте микробиологии и вирусологии.

В 2014 году под редакцией **Алмагамбетова К.Х.** был издан иллюстрированный Атлас коллекционных культур микроорганизмов, состоящий из двух разделов. Первый посвящен сведениям о наиболее широко используемых в биотехнологии микроорганизмах. Второй содержит сведения о штаммах, находящихся на хранении в депозитарии РКМ.

Также, под председательством **Алмагамбетова К.Х.** впервые в РКМ проведены республиканские и международные конференции:

- международная научно-практическая конференция «Современная микробиология в биотехнологии, науке и образовании», посвященная 75-летию крупного ученого-

микробиолога, организатора биотехнологических исследований в Казахстане, академика НАН РК Клары Ахмедьевны Тулемисовой, Астана, 2012;

- республиканский научно-практический семинар «Молочнокислые микроорганизмы, производство пробиотиков и заквасок», Астана, 2013;

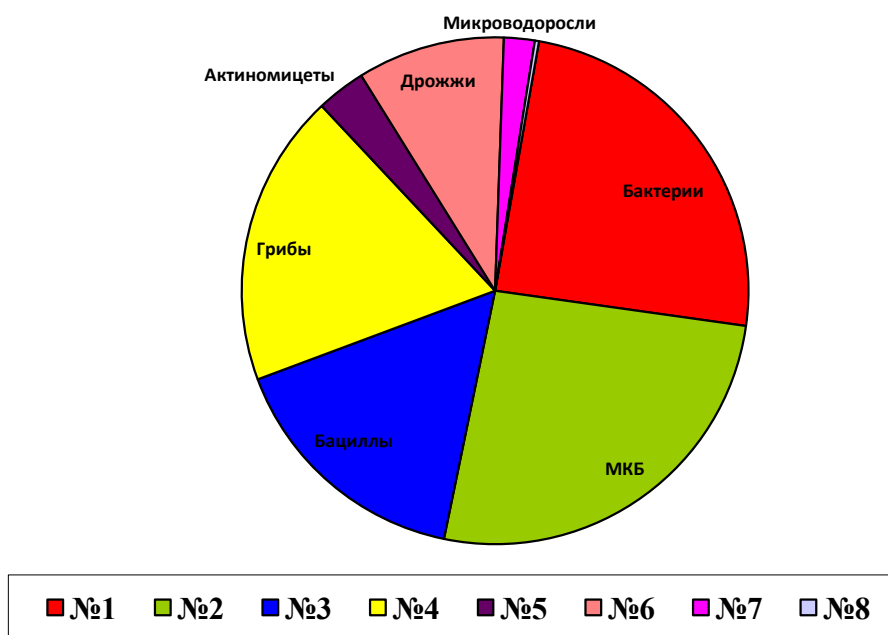
- республиканская научная конференция с международным участием «Ресурсы промышленных микроорганизмов – сохранение, развитие и применение», Астана, 2014.

Работы по пополнению коллекции, улучшению условий хранения, углублению исследований их молекулярно-биологических характеристик, расширению фено- и генотипических характеристик при паспортизации культур, разработке информационно-аналитической базы были особенно востребованы в период реализации целевой научно-технической программы «Создание, сохранение, учет и использование микробиологических ресурсов в Республике Казахстан» на 2012-2014 годы (руководитель **Алмагамбетов К.Х.**). А также в этот период реализованы проекты грантового финансирования: «Разработка информационно-аналитической базы данных коллекций промышленных микроорганизмов и оценка их интеллектуального потенциала», «Разработка биопрепарата с ростстимулирующей и фунгицидной активностью на основе ризо- и планосферной микрофлоры лекарственных растений», «Разработка и опытно-промышленное производство биопрепарата «Микрофит» на основе микроорганизмов и экстрактов растений и др.

Продолжая наследие и развивая научную деятельность Республиканской коллекции микроорганизмов, в 2016 году РКМ проведена Международная интернет конференция «Биоразнообразие: актуальные проблемы и решения», посвященной 25-летию Независимости Республики Казахстан. В 2019 году – Международная научно-практическая интернет-конференция «Актуальные проблемы биоразнообразия и биотехнологии», посвященной Году молодежи в Республике Казахстан. По результатам указанных конференции выпущены сборники материалов конференции.

Сегодня Республиканская коллекция микроорганизмов является основным республиканским хранилищем культур микроорганизмов, необходимых для проведения научно-исследовательских работ и биотехнологического производства. Фонд коллекции ежегодно пополняется новыми штаммами культур микроорганизмов из различных регионов Казахстана.

В настоящее время в коллекционном фонде РКМ насчитывается уже 764 культур (бактерии, актиномицеты, дрожжи и мицелиальные грибы), депонированных из различных научных организаций Казахстана, России и Беларуси (рисунок).



№ 1 - Молочнокислые бактерии, № 2 - бактерии, № 3 - бациллы, № 4 - мицелиальные грибы, № 5 - актиномицеты, № 6 - дрожжи, № 7 –микроводоросли, № 8 - гибридные клетки.

Рисунок - Коллекционный фонд РКМ.

Кроме того, Республиканская коллекция микроорганизмов является эффективной и профессиональной научной организацией, предоставляющая качественные исследовательские и сервисные услуги в сфере микробиологии и биотехнологии и имеет проекты грантового финансирования фундаментального и прикладного характера.

Плодотворная работа в научной деятельности **Алмагамбетова К.Х.** помогла его ученикам и приемникам. Под его научным руководством защитили диссертации:

- 2 доктора наук;
- 18 кандидатов наук;
- 2 PhD доктора.

За годы своей активной деятельности **Алмагамбетов К.Х.** отмечен следующими наградами:

- Орден «Құрмет» (2013)
- Юбилейные медали: «Қазақстан Республикасының Парламентына 10 жыл» (2005), «Қазақстан Республикасының тәуелсіздігіне 20 жыл» (2011)
- Нагрудные знаки: «Отличник здравоохранения» (1999), «За заслуги в развитии науки РК» (2015), «Еңбек ардагеры» (2018).
- Почетная грамота (Агенство РК по делам здравоохранения (2000).

Сердечно поздравляем с 70-ем, видного ученого, доктора медицинских наук профессора, со-основателя Республиканской коллекции микроорганизмов **Алмагамбетова Каиртая Хамитовича** внесшего значительный вклад в развитие казахстанской науки!

*Материал подготовлен Сармурзиной З.С.,
Темирхановым А.Ж., с использованием
данных Алмагамбетова К.Х.*

МАЗМҰНЫ

Ануарбекова С.С., Ермаханова А.Б., Сабырхан А.Ж. Адгезия как составляющая потенциала пробиотических культур микроорганизмов	8	Ануарбекова С.С., Ермаханова А.Б., Сабырхан А.Ж. Адгезия микроорганизмдердің пробиотикалық культураларының әлеуетін құраушы ретінде
Балтабаева А.К., Койшебаева К.Б., Алтаева М.Т., Сейкенова А.Б., Волкова Г.С., Жазыхбаева Д.М., Рахметова Н.Б. Микробиоценоз кишечника при дерматитах	11	Балтабаева А.К., Қойшыбаева Қ.Б., Алтаева М.Т., Сейкенова А.Б., Волкова Г.С., Жазықбаева Д.М., Рахметова Н.Б. Дерматиттегі ішек микробиоценозы
Дусмагамбетова А.М., Дусмагамбетов М.У., Жунусов Д.К., Абиева Д.Б. Анализ многолетней высеваемости грамотрицательных микроорганизмов при бессимптомной бактериурии беременных	15	Досмағамбетова А.М., Досмағамбетов М.У., Жунісов Д.К., Абиева Д.Б. Жүкті әйелдер симптомсыз бактериурия кезінде грамтеріс микроорганизмдердің көпжылдық бөліп алуынын талдауы
Нургазиев М.А., Сергазы Ш.Д., Чуленбаева Л.Е., Нургожина А.Ф., Гуляев А.Е., Қожахметов С.С., Кушугулова А.Р. Антибиотики, ішек микробиомы және иммундық жүйе	20	Нургазиев М.А., Сергазы Ш.Д., Чуленбаева Л.Е., Нургожина А.Ф., Гуляев А.Е., Қожахметов С.С., Кушугулова А.Р. Антибиотики, кишечный микробиом и иммунная система
Қожахметова С.С., Жолдыбаева Е.В., Тарлыков П.В., Атавлиева С.Ш., Сыздықов Т.А., Хасенов Р.Е., Мухтарова К.Е., Раманкулов Е.М. Профили чувствительности и гены устойчивости к антибиотикам широкого спектра действия у <i>Bacteroides Fragilis</i> , изолированных из больниц г. Нур-Султан	29	Қожахметова С.С., Жолдыбаева Э.В., Тарлыков П.В., Атавлиева С.Ш., Сыздықов Т.А., Хасенов Р.Е., Мұхтарова Қ.Е., Раманқұлов Э.М. Нур-Султан емханаларынан оқшауланған <i>Bacteroides Fragilis</i> антибиотиктерге төзімділігі мен қарсылық гендері
Волкова Г.С., Алтаева М.Т., Жазыхбаева Д.М., Сейкенова А.Б., Койшебаева К.Б., Балтабаева А.К., Рахметова Н.Б. Высеваемость менингококков среди детей за 2015-2019 гг., по данным бактериологической лаборатории городской детской инфекционной больницы	33	Волкова Г.С., Алтаева М.Т., Жазықбаева Д.М., Сейкенова А.Б., Қойшыбаева Қ.Б., Балтабаева А.К., Рахметова Н.Б. Қалалық балалар жұқпалы аурухананың бактериологиялық зертхана деректері бойынша 2015-2019 жылдарда балалар арасында менингококктардың бөлінуі
Бисенова Н.М., Ергалиева А.С. 10-летний мониторинг антибиотико-резистентности в отделении детской кардиохирургии	37	Бисенова Н.М., Ергалиева А.С. Балалар кардиохирургиялық бөліміндегі 10 жылдың бактериялардың тұрақтылығы
Бисенова Н.М., Ергалиева А.С. Динамика резистентности грамотрицательных бактерий в отделении реанимации	44	Бисенова Н.М., Ергалиева А.С. Жансақтау бөліміндегі грамтеріс бактериялардың тұрақтылығы динамикасы
Нагуманова Г.С., Увашов А.О., Каримова А.А., Исакова А.Н. Микробиологические испытания лекарственных средств и медицинских изделий при оценке безопасности и качества: их преимущества и недостатки	50	Нагуманова Г.С., Увашов А.О., Каримова А.А., Исакова А.Н. Қауіпсіздік пен сапаны бағалау кезінде дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды микробиологиялық сынау: олардың артықшылықтары мен кемшіліктері

Калина Н.В., Бисимбаева С.К., Шакетаева Н.Б., Атыгаева С.К. Медициналық қызметкерлер арасында алтын түсті стафилококк тасымалдаушыларды анықтау жиілігі	57	Калина Н.В., Бисимбаева С.К., Шакетаева Н.Б., Атыгаева С.К. Частота выявления носительства золотистого стафилококка среди медицинского персонала
Аушахметова З.Т., Тунгушбаев Т.К., Жасанова А.Н., Хегай О.В., Каусова И.А., Қожасметов С.С., Рахметова Н.Б. Формы менингококковой инфекции и их последствия. Этиологические агенты заболеваний менингококковой инфекции в республике казахстан за 2017-2019 годы	60	Аушахметова З.Т., Тұңғышбаев Т.Қ., Жасанова А.Н., Хегай О.В., Каусова И.А., Қожасметов С.С., Рахметова Н.Б. Менингококтық инфекциялардың формалары және олардың асқынулары. 2017-2019 жылдар аралығында қазақстан республикасында менингококктық инфекция ауруларының этиологиялық агенттері
Нағызбекқызы Э., Сембаева Д.Ж., Сарсенова А., Данлыбаева Г.А., Молдагулова Н.Б. Технология получения биойогурта на основе верблюжьего молока	63	Нағызбекқызы Е., Сембаева Д.Ж., Сарсенова А., Данлыбаева Г.А., Молдагулова Н.Б. Түйе сүтіне негізделген биойогуртты алу технологиясы
Калина Н.В., Бисимбаева С.К., Асимова Г.Д., Атыгаева С.К. Жұқпалы емес ауруханадан бөлінген алтын түсті стафилококктардың антибиотиктерге сезімталдығы	68	Калина Н.В., Бисимбаева С.К., Асимова Г.Д., Атыгаева С.К. Чувствительность к антибиотикам <i>Staphylococcus Aureus</i> , выделенных из неинфекционной больницы
Хасенбекова Ж.Р., Гуляев А.Е., Сергазы Ш.Д., Қожасметов С.С., Қушугулова А.Р. Антимикробная активность меда с Казахстанских регионов	72	Хасенбекова Ж.Р., Гуляев А.Е., Сергазы Ш.Д., Қожасметов С.С., Қушугулова А.Р. Қазақстан аймақтарындағы балдың микробқа қарсы белсенділігі
Мухаммад Ахтер И.К., Абилхадиров А.С., Шайхин С.М. Плазминогендік активатор жүйесінің қызметін зерттеу	77	Мухаммад Ахтер И.К., Абилхадиров А.С., Шайхин С.М. Изучение системы активатора плазминогена
Қожасметов С.С., Бабенко Д.Б., Туякова А.К., Нұрғазиев М.А., Нұрғожина А.Ф., Мұханбетжанов Н.А., Чуленбаева Л.Е., Сергазы Ш.Д., Гуляев А.Е., Қушугул А.Р. Модуляция кишечной микробиоты после дисбиоза вызванного декстран сульфатом натрия	82	Қожасметов С.С., Бабенко Д.Б., Тұяқова А.Қ., Нұрғазиев М.А., Нұрғожина А.Ф., Мұханбетжанов Н.А., Чуленбаева Л.Е., Сергазы Ш.Д., Гуляев А.Е., Қушугула А.Р. Натрий декстран сульфатымен туындаған дисбиоздан кейін ішек микробиотының модуляциясы
Садуахасова С.А., Оспанқұлова Г.Х., Шайменова Б.С., Ермеков Е.Е., Мурат Л.А. Изучение кислотообразующей активности штаммов-продуцентов лимонной кислоты <i>A. Niger</i> , полученных в результате мутагенеза	90	Сәдуақасова С.А., Оспанқұлова Г.Х., Шайменова Б.С., Ермеков Е.Е., Мұрат Л.А. Мутагенез нәтижесінде алынған <i>A. Niger</i> лимон қышқылының продуцентінің қышқыл түзу активтілігін зерттеу
Сармурзина З.С., Текебаева Ж.Б., Бисенова Г.Н., Уразова М.С., Досова А.Д. Изучение микрофлоры рыб при использовании пробиотического препарата в отношении <i>Lactococcus garvieae</i>	94	Сармурзина З.С., Текебаева Ж.Б., Бисенова Г.Н., Уразова М.С., Досова А.Д. Пробиотикалық препаратқа қатысты <i>Lactococcus garvieae</i> бойынша балық микробиотасын зерттеу

АДГЕЗИЯ КАК СОСТАВЛЯЮЩАЯ ПОТЕНЦИАЛА ПРОБИОТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

С.С. Ануарбекова, А.Б. Ермаханова, А.Ж. Сабырхан

ТОО «Экостандарт.kz», Нур-Султан, Казахстан

В данной статье представлены результаты оценки адгезивной активности молочнокислых бактерий, выделенные из кисломолочных продуктов домашнего приготовления, овощей и биотопов человека. Основную массу составляют культуры, обладающие высокой степенью прилипания к эритроцитам. В частности, преобладают культуры, выделенные из молочнокислых продуктов домашнего приготовления и биотопов человека.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, культура, адгезия, пробиотики.

ADHESION AS A COMPONENT OF THE POTENTIAL OF PROBIOTIC CULTURES OF MICROORGANISMS

S. Anuarbekova, A. Yermakhanova, A. Sabyrkhan

«Ecostandart.kz» LLP, Nur-Sultan city, Kazakhstan

This article presents the results of evaluating the adhesive activity of lactic acid bacteria isolated from homemade lactic acid products, vegetables, and human biotopes. The bulk is cultures with a high degree of adherence to red blood cells. In particular, cultures isolated from home-made lactic products and human biotopes predominate.

Keywords: Lactic acid bacteria, culture, adhesion, probiotics.

АДГЕЗИЯ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІН ПРОБИОТИКАЛЫҚ КУЛЬТУРАЛАРЫНЫҢ ӘЛЕУЕТІН ҚҰРАУШЫ РЕТІНДЕ

С.С. Ануарбекова, А.Б. Ермаханова, А.Ж. Сабырхан

«Экостандарт.kz» ЖШС, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Бұл мақалада үй жағдайында дайындалатын сүт қышқылы өнімдерінен, көкөністерден және адам биотоптарынан бөлініп алынған сүт қышқылы бактерияларының адгезиялық белсенділігін бағалау нәтижелері келтірілген. Негізгі бөлігі - бұл эритроциттерге жоғары дәрежеде бейімделген культуралар. Атап айтқанда, үй жағдайында дайындалатын сүт қышқылы өнімдерінен және адам биотоптарынан оқшауланған культуралар басым.

Кілт сөздер: үт қышқылы бактериялары, культура, адгезия, пробиотиктер.

Введение

Способность микроорганизмов связываться с клетками человека (энтероцитами, эритроцитами, тромбоцитами и др.), то есть проявление адгезивных свойств, принято рассматривать в качестве одного из наиболее важных физиологических свойств аутофлоры человека, поскольку позволяет ей надолго сохраняться в составе микробиоценозов. Одним из ведущих механизмов колонизационного потенциала является способность прикрепляться к клеткам эпителия. Защитные функции пробиотиков реализуются благодаря адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам кишечника, конкуренции за рецепторы связывания и блокады адгезии и колонизации слизистых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами.

Вступая в тесный контакт со слизистой оболочкой, культуры-пробиотики предохраняют ее от возможности внедрения патогенных микробов [1,2].

Все эти механизмы в конечном итоге способствуют повышению резистентности эпителия, усиливая его барьерные функции и защиту. Способность к адгезии *in vitro* отличается у разных представителей пробиотиков. Степень адгезии увеличивается при сочетании штаммов, в частности, при совместном применении *L. rhamnosus* и *B. bifidum*. Это подтверждает наличие бактериального синергизма и делает предпочтительным применение препаратов, содержащих симбионтные штаммы пробиотиков [1-3].

Адгезия пробиотиков к кишечному эпителию обеспечивает их взаимодействие с иммунной системой кишечника [4]. В связи с этим, адгезивность пробиотических бактерий является одним из важных свойств наряду с такими свойствами как антагонистическая активность в отношении энтеропатогенов, иммуномодуляция и др.

Цель

Изучить адгезию молочнокислых бактерий, перспективных в качестве пробиотиков.

Материалы и методы

Объектами исследований являются 102 культуры молочнокислых бактерий (МКБ), выделенные из молочнокислых продуктов питания домашнего и заводского приготовления, биотопов человека (кал, моча) и растительного сырья.

Адгезивность МКБ изучали на формализированных эритроцитах человека 0 (1) (Rh+) по методике В. Брилиса [5]. Использовали 18-ти часовые культуры микроорганизмов, выращенные на среде МРС при температуре 37 °С.

Для постановки опыта на предметное стекло наносили 1 каплю фосфатно-буферного раствора, куда вносили по одной посевной петле взвесей эритроцитов и бактерий (непосредственно из питательной среды). На одном предметном стекле ставили три повторности. Предметное стекло помещали во влажную камеру на 30 минут при 37 °С, затем препарат при той же температуре высушивали, фиксировали смесью Никифорова, окрашивали по Граму и исследовали в иммерсионной системе микроскопа. Определяли количество бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту. Производили подсчет не менее 100 эритроцитов в не менее чем в 5 полях зрения.

Определяли средний показатель адгезии, коэффициент адгезии. Показатель определяли по среднему числу микробов, прикрепившихся к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов.

Адгезивность считают нулевой при показателе от 0 до 1,0, низкой – 1,01-2,0, средней – 2,01-4,01, высокой – свыше 4,0. Из общего числа учитываемых эритроцитов вычисляли процент эритроцитов.

Статистическую обработку данных проводили с использованием среднего показателя, квадратичного отклонения средней, ошибки средней, коэффициента t по Стьюденту, уровень вероятности доверительного интервала p. Результаты считали достоверными, если вероятность ноль-гипотезы не превышала 0,05 ($p < 0,05$) [6].

Результаты и обсуждение

Нами были выделены 102 культуры МКБ из молочнокислых продуктов заводского (35) и домашнего приготовления (50), также биотопов человека (12 образцов).

Молочные продукты питания представлены: кумыс - 8, творог - 13, кефир - 5, йогурт – 5, скисшее молоко - 16, квас пробиотический - 1, сливочное масло - 7, курт - 7, сметана - 12, молозиво - 1, шубат - 4, сыр – 6 образцов. Биотопы человека представлены выделениями как моча и кал детей.

В качестве клеток макроорганизма для исследования адгезии используют эритроциты, так как их легко получить, и они являются отличной моделью, так как на своей поверхности они имеют гликофорин – вещество, идентичное гликокаликсу эпителиальных клеток слизистых внутренних органов, на котором расположены рецепторы для микробных адгезинов.

Нами установлено, что выделенные культуры МКБ обладают способностью к адгезии, степень проявления от низкой до высокой степени. 54% МКБ обладают высокой степенью – 55 культур из 102, средней – 17 культур, 9 – низкоадгезивные, с нулевой степенью проявления – 20. Цифровые значения показателя адгезии и количество активных микроорганизмов представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Численность адгезивно активных МКБ.

Объекты исследования	Высокая степень		Средняя степень		Низкая степень		Нулевая степень	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
Культуры, выделенные из домашних молочных продуктов (79)	42	53±5,6	12	15±4,02	8	10±3,37	17	22±4,7
Культуры, выделенные из заводских молочных продуктов (7)	2	28±16,9	1	14±13,1	-	-	3	4,2±6,4
Культуры, выделенные из биотопов человека (16)	11	69±11,5	4	25±10,8	1	6±5,9	-	-

Таблица 2 – Адгезивная активность МКБ.

Группы объектов	Степень адгезии (M±m)			
	высокая	средняя	низкая	нулевая
Культуры, выделенные из домашних молочных продуктов (79)	8,1±3,57	3,03±0,5 ^{3*}	1,76±0,27	0,23±0,43
Культуры, выделенные из заводских молочных продуктов (7)	5,1	2,3	-	0
Культуры, выделенные из биотопов человека (16)	7,05±1,79	3,3±0,245	2	-
Примечание: ^{3*} - p < 0,05 (сравнение с заводскими культурами)				

Если рассматривать по источникам выделения, то МКБ (79 культур) выделенные из молочнокислых продуктов домашнего приготовления в 100% случаях обладают свойством адгезии: 42 – высокой степенью (53%), цифры прикрепления составляют 8,1±3,57, 12 – средней (15%, 3,03±0,5^{3*}), 8 – низкой (10%) и 17 – нулевой степенью – 22%.

Из 7 заводских молочных культур 6 активны: 2 – с высокой степенью, 1 – средней и 3 – нулевой степенью активности.

Из биотопов человека активны все 16 культур (5,8±2,43), от низкой до высокой степени активности.

На рисунке наглядно показана адгезия лактобацилл.

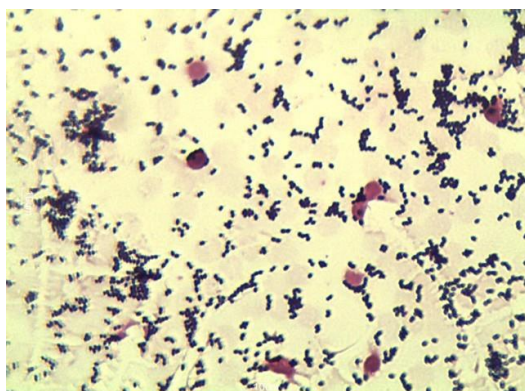


Рисунок - Адгезивная активность культуры МКБ 2LP.

Таким образом, основную массу составили высокоадгезивные культуры лактобацилл.

Заключение

Пробиотические препараты применимы в медицине, в животноводстве, птицеводстве, для получения функциональных продуктов питания.

Адгезивная активность штаммов-пробионтов является ключевым признаком,

обеспечивающим пролонгирование лекарственного действия пробиотика. Высокие показатели адгезии увеличивают возможности при выборе пробиотически активных бактерий.

Высокоадгезивные бактерии в составе биопрепарата, по сравнению с бактериями с низким уровнем адгезии, эффективнее закрепляются на поверхности клеток, уменьшая вероятность прикрепления условно-патогенных микроорганизмов, стимулируя рост кишечной нормофлоры, улучшая пищеварение и перистальтику кишечника. Они эффективнее обеспечивают иммунный ответ и устойчивость к инфекционным агентам.

В нашей работе при изучении адгезии выявлено, что большую часть составили высокоадгезивные культуры лактобацилл, в количестве 55, при этом ее составляют выделенные культуры лактобацилл из кисломолочных продуктов домашнего приготовления и кишечного биотопа человека ($p < 0,001$). Наиболее высокие цифры имеют культуры LB6, LB38, LB42, LB46, LC76, L85, L86, L98, 2LP, 3LP, 8LG, LB8, L91, 3LP, 8LG, 11LR. Они имеют перспективу при отборе пробиотически активных микроорганизмов.

В дальнейшем для разработки пробиотического препарата и закваски с заданными свойствами нами будут учтены и другие свойства, как антагонизм к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, антиоксидантная активность, антикомплементарная активность и др.

Список литературы

1. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации // Журн. микробиол., эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 1. – С. 92-100.

2. Иванова Е.И., Попкова С.М., Шабанова Н.М. Адгезивные свойства микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы организма человека // Биология. Экология. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 25-29.

3. Сэндл Т. Механизмы бактериальной адгезии // Чистые помещения и технологические среды. – 2014. – № 1. – С. 54-58.

4. Нилова Л.Ю., Оришак Е.А., Бойцов А.Г. Адгезивная активность лактобактерий как тест для индивидуального подбора пробиотиков при коррекции дисбактериоза // Профилактическая и клиническая медицина. – 2010. – № 2 (35). – С. 70-72.

5. Методы определения патогенных свойств возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний: методические рекомендации / Бисимбаева С.К., Иманбаева М.И., Калина Н.В. и др. / Под ред. Ш.И. Сарбасовой. – Астана, 2000. – 19 с.

6. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.

Автор для корреспонденции: Ануарбекова С.С. - к.м.н., ВНС ТОО «Экостандарт.kz»; эл. почта: sanuarbekova@rambler.ru, 8 778 684 64 20

МРНТИ 76.03.43+76.29.57

МИКРОБИОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА ПРИ ДЕРМАТИТАХ

А.К. Балтабаева¹, К.Б. Койшебаева¹, М.Т. Алтаева², А.Б. Сейкенова², Г.С. Волкова², Д.М. Жазыхбаева², Н.Б. Рахметова³

¹ГУ «Центральный госпиталь с поликлиникой МВД Республики Казахстан», Нур-Султан, Казахстан

²ГККП на ПХВ «Многопрофильная городская детская больница № 3», Нур-Султан, Казахстан

³НАО «Медицинский университет», Нур-Султан, Казахстан

Исследован видовой и количественный состав микрофлоры кишечника у пациентов с дерматитами. Дисбиотические нарушения регистрируются более чем у 70% обследованных. Снижается содержание лактобактерий, бифидобактерий и увеличивается количество условно патогенных энтеробактерий.

Ключевые слова: микробная экология, бифидобактерии, лактобактерии, дерматиты.

THE INTESTINAL MICROBIOCENOSIS OF THE DERMATITIS

A. Baltabaeva¹, K. Koyshbaeva¹, M. Altaeva², A. Seykenova², G. Volkova², D. Zhazykbayeva², N. Rachmetova³

¹GA «Central Hospital with Polyclinic of the MIA RC», Nur-Sultan city, Kazakhstan

²SSC on the right of EC «Multifunctional city children's hospital N 3», Nur-Sultan city, Kazakhstan

³NcJSC «Astana Medical universiti», Nur-Sultan city, Kazakhstan

The article presents the results of study of species and quantitative composition of intestinal flora in patients with dermatitis. Dysbiotic disorders were registered in more than 70% of examined subjects. The content of lactobacteria, bifidobacteria decreases simultaneously with an increase in the amount of conditional-pathogenic enterobacters.

Keywords: microbial ecology, bifidobacteria, lactobacilli, dermatitis.

ДЕРМАТИТТЕГІ ІШЕК МИКРОБИОЦЕНОЗЫ

А.Қ. Балтабаева¹, Қ.Б. Қойшыбаева¹, М.Т. Алтаева², А.Б. Сейкенова², Г.С. Волкова², Д.М. Жазықбаева², Н.Б. Рахметова³

¹ММ «ҚР ІМ поликлиникасы бар орталық аурухана», Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²МҚКК «№ 3 қалалық көпбейінді балалар ауруханасы», Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

³«Астана Медицина Университеті» КеАҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Дерматитпен ауратын науқастардың ішек микрофлорасының сандық, сапалық құрамы зерттелді. Дисбиотикалық жағдайлар 70 пайыздан жоғары науқастарда тіркелді. Лактобактериялардың, бифидобактериялардың саны азайды, шартты патогенді энтеробактериялардың санының жоғарлауы байқалды.

Кілт сөздер: микробтық экология, бифидобактериялар, лактобактериялар, дерматиттер.

Введение

Кишечная микробиота в последние годы рассматривается как ключевой этиологический фактор развития аллергических и иммунопатологических состояний среди населения, что указывает на необходимость дальнейшего изучения микробного сообщества, в том числе кишечной микрофлоры [1]. К.Г. Гуревич с соавт. [2] полагают, что звеньями нарушения качественного и количественного состава нормальной микрофлоры кишечника является повышение кишечной проницаемости, модуляция иммунной системы стенки кишечника, развитие гиперчувствительности. Известно, что более трети населения планеты страдают аллергическими заболеваниями [3]. В связи с вышеизложенным, на сегодняшний день одно из приоритетных мест в оценке здоровья людей занимает диагностика микробиоценозов при воздействии на организм человека широкого круга факторов, в том числе аллергического характера [4]. Авторами Е.П. Калининой, а также А.Г. Чучалиным с соавт. [5,6] установлено, что у больных с дерматореспираторным синдромом имеют место нарушения микрофлоры кишечника, сопровождающиеся изменениями слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной и толстой кишки. Поскольку биогенным фактором, определяющим состояние макроорганизма является микрофлора толстого кишечника [7], актуальным является определение особенностей микробиоценоза кишечника пациентов с аллергическими проявлениями на коже в виде крапивницы, что позволит клиницистам определить рациональные методы коррекции.

Цель

Изучить микробиоценоз кишечника пациентов с аллергическими дерматитами, обратившихся в ГУ «Центральный госпиталь с поликлиникой МВД РК» в период с VI.2016 г. по VI.2020 г.

Материал и методы

По данным учетно-отчетной документации бактериологической лаборатории проведен ретроспективный анализ 46 образцов испражнений пациентов, обративших в ГУ «Центральный госпиталь с поликлиникой МВД РК» (ГУ «ЦГсП МВД РК») с VI.2016 по VI.2020 гг.

Бактериологическое исследование содержимого толстой кишки проводили согласно методическим указаниям [8,9]. Микроорганизмы после выделения чистой культуры и окраски по Граму, идентифицировали согласно нормативным документам и определителю бактерий Берджи [10,11], а также на автоматическом бактериологическом анализаторе WalkAway 40/96SI. Количество бактерий определяли путем подсчета колониеобразующих единиц на 1 г фекалий (lgKOE/г). Производили расчет средней арифметической ошибки (M), ошибку средней арифметической (m). Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Изучены образцы фекалий у 46 пациентов: 34 (73,9%) мужчин, средний возраст $43,5 \pm 8,5\%$ года и 12 (26,1%) женщин, средний возраст $45,2 \pm 14,4$ года с аллергическими дерматитами 31 (67,4%), нейродермитом 12 (26%), крапивницей 3 (6,5%). Качественный и количественный состав микрофлоры кишечника пациентов с дерматитами приведен в таблице.

Таблица - Качественный (%) и количественный (lg KOE/г) состав микрофлоры кишечника пациентов с аллергическими дерматитами, обратившихся в ГУ «ЦГСП МВД РК» в период с VI.2016 по VI.2020 гг. (M $\pm$ m).

№п /п	Микроорганизм/число выделенных культур	норма	Частота находок		норма	Количество (M $\pm$ m)
		%	абс	%	lgKOE/г	lgKOE/г
1	<i>Bifidumbacterium ssp.</i>	100	17	36,9	8-9	8,8 $\pm$ 0,1
2	<i>Lactobacterium ssp.</i>	90-100	13	28,3	7-8	6,9 $\pm$ 0,33
3	<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	100	45	97,8	7-8	6,9 $\pm$ 0,62
4	<i>E.coli</i> со сниженной ферментативной активностью	15-20	4	8,7	6-7	7,09 $\pm$ 0,57
5	<i>E. coli</i> лактозонегативная	10	10	21,7	$\leq$ 5	6,9 $\pm$ 1,1
6	<i>E. coli</i> гемолитически активная	2	4	8,7	<4	6,9 $\pm$ 1,6
7	УПЭБ	8,3-33,3	8	17,4	$\leq$ 5	6,5 $\pm$ 0,51
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	14,3-71,4	1	2,2	$\leq$ 3	5,0 $\pm$ 0
9	Другие стафилококки <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i>	14,3-71,4	3	6,5	$\leq$ 4	4,6 $\pm$ 0,13
10	<i>Enterococcus ssp.</i>	80-100	27	58,7	5-6	5,3 $\pm$ 0,12
11	<i>Clostridium ssp.</i>	25-35	3	6,5	$\leq$ 5	5,0 $\pm$ 0
12	<i>Candida ssp.</i>	4,4-82,6	5	10,9	$\leq$ 5	5,05 $\pm$ 0,4

Из данных таблицы следует, что частым и характерным для микробиоценоза толстой кишки пациентов с дерматитами было значительное уменьшение основных бактериальных симбионтов-бифидобактерий и молочнокислых палочек. Популяционный уровень бифидобактерий в количестве $8,8 \pm 0,1$ lgKOE/г выявлен лишь у 17 (36,9%) лиц. Дефицит бифидобактерий-6lg и менее обнаружен у 63,04% обследованных. Общее количество лактобактерий составило $6,9 \pm 0,33$ lgKOE/г у 13 (28,3%) пациентов. Снижение лактобактерий до 5lg KOE/г и менее зарегистрирован в 71,7% случаев. Выявленные качественные снижения бифидобактерий и молочнокислых бактерий кишечника при аллергических дерматитах соответствует данным О.Н. Зейнуллиной с соавт. [1], установившим снижение количества бифидобактерий, лактобактерий при атопических дерматитах среди детей. На фоне качественного дефицита микробов-эубионтов наблюдались изменения со стороны энтеробактерий. Типичные эшерихий выявлены у 45 (97,8%) обследованных, их среднее количество достигало $6,9 \pm 0,33$ lg KOE/г. Наряду с типичными из содержимого толстой кишки обследованных выделялись эшерихий с измененными биологическими свойствами: не ферментирующие лактозу (lac⁻) у 10 (21,7%) пациентов составили $6,9 \pm 1,1$ lg KOE/г, *E.coli* гемолитически активная у 4 (8,7%) достигли $6,9 \pm 1,6$ lg KOE/г, что на два порядка превышает

нормативные величины. Условно патогенные энтеробактерии высевались у 8 (17,4%) обследованных в количестве $6,5 \pm 0,51$ IgKOE/г. В 3 (6,5%) случаях обнаружены *Enterobacter aerogenes* в пределах $6,5 \pm 2,3$ IgKOE/г, двухкратно (4,3%) обнаружены *Klebsiella pneumoniae*, в единичных случаях зарегистрированы *Citrobacter freundii*, *Kluyvera ascorbata*, *Raoultella planticola*. Со стороны кокковой флоры в количестве $15,0 \pm 0$ однократно изолирован *Staphylococcus aureus*, в 3-х (6,5%) случаях в пределах $4,6 \pm 0,13$ IgKOE/г выделены коагулазонегативные стафилококки. Фекальные стрептококки из содержимого толстой кишки выделялись у 27 (58,7%) пациентов при количестве $5,3 \pm 0,12$ IgKOE/г. В 41,3% случаев энтерококки встречались в пределах выше либо ниже нормальных показателей 10^6-7 КОЕ/г. Дрожжеподобные грибы рода *Candida* изолированы у 5 (10,9%) лиц в количестве $5,05 \pm 0,4$ IgKOE/г, двухкратно обнаружены нитчатые грибы.

Результаты исследования микробиоценоза кишечника пациентов с аллергическими дерматитами выявили в наблюдаемых образцах испражнений качественный дефицит лактобактерий, бифидобактерий, частота обнаружения которых составила 28,3%, 36,9% случаев соответственно. Популяционный уровень бифидобактерий соответствует норме. Уровень лактобактерий, обладающих антагонистической активностью к грибам, эшерихиям, протеем, стафилококкам, псевдомонадам [12,13] имело тенденцию к снижению и находилось на нижней границе нормативных показателей $6,9 \lg$ КОЕ/г. На фоне дефицита лактобактерий отмечается повышенный рост со стороны факультативной микрофлоры. Выявлено увеличение в 2,2 раза лактозонегативных эшерихий, в 4,3 раза эшерихий с гемолитической активностью. Условно патогенные энтеробактерии в кишечном микробиоценозе обследованных высевались в 17,4% случаев, дрожжеподобные грибы рода *Candida* встречались среди 5 (10,9%) лиц при количестве $5,05 \pm 0,4 \lg$, уровень энтерококков соответствовал значениям нормы у 58,7% пациентов. Полученные результаты дисбиотических изменений в составе микрофлоры кишечника пациентов с аллергическими дерматитами согласуются с данными авторов [14], обнаруживших связь между развитием дисбиотических изменений микроэкологии толстой кишки с нарушениями состояния иммунной системы, в частности с гиперчувствительностью (аллергией). Таким образом, оптимизация микробиоценозов является основой профилактического возникновения и развития донозологических и патологических состояний.

Заключение

При изучении микрофлоры кишечника пациентов с аллергическими дерматитами в период с VI.2016 по VI.2020 гг. выявлены микрoэкологические изменения в кишечнике в виде снижения числа облигатных представителей нормальной микрофлоры - бифидобактерий, лактобактерий в 2,7-3,2 раза и повышение в 2,2 раза лактозонегативных эшерихий, в 4,3 раза гемолитически активных кишечных палочек в сравнении с нормальными величинами, появление на порядок выше условно патогенных энтеробактерий и незначительное превышение количества нормальных показателей грибов рода *Candida*.

Выявленный в микрофлоре кишечника пациентов с аллергическими дерматитами дефицит нормофлоры диктует необходимость проведения микробиологического мониторинга для оценки состояния микробиоценоза кишечника при аллергических дерматитах с целью предупреждения и коррекции дисбиотических изменений, возникающих под воздействием различных экзогенных факторов внешней среды, в частности аллергических на человека.

Список литературы

1. Зейнуллина О.Н., Пескуров Д.В., Хисматуллина З.Р. Особенности микробиоценоза кишечника и его роль при атопическом дерматите у детей //Мед. вестник Башкортостана. - 2017. - Т. 12, № 4 (70). – С. 109-115.
2. Применение пробиотиков в составе комплексной терапии дисбиотических нарушений при некоторых заболеваниях человека/ Гуревич К.Г., Никонов Е.Л., Заборова В.А. и др.//Вопросы питания. - 2019. - Т. 88, № 1. - С. 77-83.
3. Сидорович О.И., Глушкова Е.Ф., Лусс Л.В. Аллергия и микробиоценоз кишечника //Астма и аллергия. - 2016. - № 2. - С. 7-10.
4. Гриневич В.Б., Добрынин В.М., Захарченко В.М. Проблема диагностики дисбиоза под влиянием факторов окружающей среды. //Гигиена и санитария. – 2003.- № 6. – С. 74-76.

5. Состояние микробной экологии и патоморфологические особенности слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у больных с аллергическими заболеваниями органов дыхания и кожи/ Чучалин А.Г., Грачева Н.М. и др. // Рос.гастроэнтерол. журн. – 1996. - № 1. – С. 3-11.

6. О сочетанном поражении слизистых оболочек бронхов и желудочно-кишечного тракта при atopическом синдроме и крапивнице/Калинина Е.П., Калганова Н.А. и др.//Пульмонология. – 1994. - № 1. – С. 2-7.

7. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier/Xiao-Zhong Huang, Li-Bin Zhu, Zhong-Hong Li, Jing Lin//Develop. World J.Clin.Pediatr. – 2013. – V. 4. – P. 46-53.

8. МУ «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» № 10.05.044.03. - Алматы, 2003. - 39 с.

9. МУ «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» МУК № 10.05.044.03. – Астана, 2004. – 8 с.

10. Приказ № 535 МЗ СССР от 22 апреля 1985 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в КДЛ ЛПУ. -М., 1985.-126 с.

11. Bergey S. Manual of Determinatif Systematic Bacteriology // 9-th edition/- Baltimore Williams A. & Wilkins. - 1997. (Определитель бактерий Бердэжи) Т 1-2. - М.: Мир, 1997. - 365 с.

12. Magnusson J., Schnurer J. Lactobacillus coryniformis subsp. Coryneformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. //Appl. Environ. Microbiol. -2001. – V. 1(67). – P. 1-5.

13. Osset J., Bartolome R.M., Garsia E.A. Assessment of the capacity of Lactobacillus to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells// J.Infect. Dis. – 2001. – V. 183(2). – P. 330-335.

14. Дисбактериозы-актуальная проблема медицины/Воробьев А.А., Абрамов Н.А. и др. //Вестн. РАМН. - 1997. - № 3. –С. 3-7.

Автор для корреспонденции: Балтабаева А.К. - к.м.н., Заведующая бактериологической лаборатории ГУ «ЦГсП МВД РК»; эл. почта: asem611@gmail.com, 8 777 957 77 17.

МРНТИ 76.03.43+76.29.48

УДК 618.3:616.6 б

АНАЛИЗ МНОГОЛЕТНЕЙ ВЫСЕВАЕМОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ БЕССИМПТОМНОЙ БАКТЕРИУРИИ БЕРЕМЕННЫХ

А.М. Дусмагамбетова^{1,2}, М.У. Дусмагамбетов², Д.К. Жунусов¹, Д.Б. Абиева²

¹ГКП на ПХВ «Городская поликлиника № 5», Нур-Султан, Казахстан

²НАО «Медицинский университет Астана», Нур-Султан, Казахстан

Инфекции мочевых путей у беременных являются актуальной и сложной проблемой в связи с их распространенностью, суженным набором средств диагностики и терапии, а также наличием дополнительных рисков со стороны матери и ребенка. В статье представлены материалы бактериологических исследований при бессимптомной бактериурии беременных, анализ этиологической значимости различных групп микроорганизмов в развитии названной патологии, показана динамика чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам.

Ключевые слова: бессимптомная бактериурия, грамотрицательные микроорганизмы, антибиотикорезистентность.

ANALYSIS OF LONG-TERM SELECTION OF GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS AT ASYMPTOMATIC BACTERIURIA OF PREGNANT

A. Dusmagambetova^{1,2}, M. Dusmagambetov², D. Zhunusov¹, D. Abieva²

¹«City polyclinic №5», Nur-Sultan city, Kazakhstan

²NcJSC «Astana medical university», Nur-Sultan city, Kazakhstan

Urinary tract infections in pregnant women are an urgent and complex problem due to their prevalence, a narrow range of diagnostic and therapeutic tools, as well as the presence of additional risks from the mother and child. The article presents the materials of bacteriological studies in asymptomatic bacteriuria of pregnant women, analysis of the etiological significance of various groups of microorganisms in the development of this pathology, shows the dynamics of the sensitivity of the isolated strains to antibiotics.

Keywords: asymptomatic bacteria in urine, gram-negative microorganisms, stability to the antibiotics.

ЖҮКТІ ӘЙЕЛДЕР СИМПТОМСЫЗ БАКТЕРИУРИЯ КЕЗІНДЕ ГРАМТЕРІС МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ КӨПЖЫЛДЫҚ БӨЛІП АЛУЫНЫҢ ТАЛДАУЫ

А.М. Досмағамбетова^{1,2}, М.У. Досмағамбетов², Д.К. Жүнісов¹, Д.Б. Абиева²

¹ШЖК «№ 5 Қалалық емхана» МКК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²«Астана медицина университеті» ҚеАҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Жүкті әйелдерде кездесетін несеп жолдарының жұқпалары өзекті және күрделі мәселе болып табылады. себебі диагностика және терапия құралдар жиынтығы шектелген болуымен, сондай-ақ ана мен бала үшін қосымша тәуекелдер болуы мүмкін. Мақалада жүкті әйелдер симптомсыз бактериурия кезінде жүргізілген бактериологиялық зерттеудің нәтижелері ұсынылған. Сонымен қатар аталған патология дамытудағы микроорганизмдер әртүрлі топтарының этиологиялық маңыздылығы талдау мен бөлінген штамдарының антибиотиктерге сезімталдық динамикасы көрсетілді.

Түйін сөздер: симптомсыз бактериурия, грамтеріс микроорганизмдер, антибиотикрезистенттілік.

Введение

Проблема инфекции мочевыводящих путей остается одной из ведущих в акушерской практике. Это обусловлено высокой частотой встречаемости среди беременных, которая может достигать 8%, особенностью клинического течения, диагностики и терапии инфекций мочевого тракта во время беременности [1].

Бессимптомная бактериурия (ББ) встречается у 2,5–15 % беременных и при отсутствии лечения часто осложняется развитием акушерской, урологической и перинатальной патологии [2].

ББ, являясь доклинической формой целого ряда заболеваний мочевой системы, характеризуется упорным рецидивирующим течением с низким процентом самоизлечения, высоким риском развития осложнений со стороны матери, плода и новорожденного и высокой вероятностью манифестации в симптоматическую форму инфекции мочевого тракта [3].

В.А. Капительный [4] в 2008 г. диагностировав ББ у 120 беременных, представил структуру возбудителей: *Escherichia coli* (55,9%); грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (12,5%); грамположительные стрепто-, стафилококки (26,6%); другие микроорганизмы, не вошедшие в первые две группы: *Pseudomonas spp.*, *Corynebacterium stratum*, *Candida spp.* и пр. (5,0%).

Цель

Изучить роль грамотрицательной микрофлоры в этиологии бессимптомной бактериурии у беременных. Анализ чувствительности грамотрицательных этиопатогенов к антибактериальным препаратам.

Материалы и методы

Было проведено бактериологическое исследование биоматериала (мочи) беременных женщин: в 2013 г. – 4 572 пробы, 2014 г. – 10 857 проб, 2015 г. – 11 451 проба, 2016 г. – 10 490 проб, 2017 г. – 15 579 проб. Все обследуемые женщины состояли на диспансерном учете по беременности у гинекологов организаций первичной медико-санитарной помощи г. Нур-Султан, не имели в анамнезе заболеваний мочевыделительной системы. Перед сдачей биоматериала (мочи) на исследование пациенты были проинформированы о целях, задачах исследования, возможных результатах и их значимости в адекватном ведении беременности. Всеми обследуемыми подписано информированное согласие. Весь поступивший в лабораторию биоматериал зарегистрирован в соответствующий лабораторный журнал с присвоением регистрационного (лабораторного) номера которые использовались в дальнейшем движении биопробы. Исследование проводилось классическим бактериологическим методом. После пробоподготовки (центрифугирование мочи в течение 15 мин при 2000 об/мин) проводили посев осадка мочи на следующие питательные среды: по методу Голд на кровяной агар и методом штриха на чашки со средами Эндо и желточно-солевым агаром (ЖСА). Инкубировали посе́вы в термостате при 37 °С, а ЖСА дополнительно ещё сутки при 22 °С. За истинную бактериурию принимали выделение инфекционного агента в концентрации $\leq 10^5$ КОЕ/мл и более. Идентификацию выделенных штаммов микроорганизмов проводили по тинкториальным,

морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам (согласно действующим нормативно-правовым актам классическим бактериологическим методом). Определение чувствительности выделенных штаммов микроорганизмов к антибактериальным препаратам проводили методом бумажных дисков. Вместе с тем, для идентификации и определения антибиотикограммы выделенных штаммов микроорганизмов применяли автоматический бактериологический анализатор Becton Dickinson BD Phoenix 100.

Результаты и их обсуждение

Распространенность ББ среди беременных по литературным данным представлена в весьма широком диапазоне: от 2,5 до 16%. Систематические данные по России отсутствуют, отдельные исследования указывают, что частота встречаемости в России может превышать таковую за рубежом и достигать 16%. Риск возникновения ББ у беременных зависит от ряда факторов. Так, при повторной беременности ББ развивается в 6,0% случаев, в то время как среди первобеременных - только в 3,2%. В развивающихся странах ББ встречается наиболее часто у беременных из низшего социального класса - в 6,5% случаев, среди среднего класса существенно реже - в 2,5%. Следует отметить, что женщины с пороками развития почек и мочевых путей, мочекаменной болезнью, воспалительными заболеваниями половых органов, сахарным диабетом, ВИЧ-инфицированные и пациенты с мочевыми катетерами относятся к группе высокого риска по развитию инфекций мочевыводящих путей (как симптоматической, так и бессимптомной) [5,6].

При анализе данных бактериологических исследований мочи за 2013 г. получено, что скрытая бактериурия отмечается у 16,9% из 4 572 беременных, обследованных бактериологическим методом. В 2014 году из 10 857 проб мочи беременных в 12,2% выделена микробная флора; в 2015 году скрытая бактериурия выявлена у 12,3% обследованных беременных, в 2016 году этот показатель был равен 13,0%, в 2017 году – 11,9%. Таким образом, в период 2013 – 2017 гг. отмечается постепенное снижение количества случаев бессимптомной бактериурии у беременных (с 16,9% в 2013г до 11,9% в 2017г).

Из таблицы 1 видно, что более 50% возбудителей бессимптомной бактериурии беременных (от 79,7% в 2013 г. до 65,5% в 2017 г.) относятся к грамотрицательным микроорганизмам семейства *Enterobacteriaceae*.

Таблица 1 - Микробный пейзаж возбудителей ББ за период 2013 – 2017 гг. (%).

№	Вид микроорганизма	2013	2014	2015	2016	2017
1	<i>Escherichia coli</i>	70,9	68,2	63,1	63,3	62,0
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5	0,5	0,4	0,4	0
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2,7	2,8	3	1,4
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,7	2,6	1,8	1,7	0,8
5	<i>Proteus mirabilis</i>	1,5	1,3	1,4	1,6	0,4
6	<i>Proteus vulgaris</i>	0,8	0,8	0,6	0,7	0,8
7	<i>Acinetobacter spp.</i>	0,3	0,1	0,2	0,2	0,1
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	6,7	4,4	3,3	0,2
9	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,1	4,4	0,4	0,3	0
10	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4,7	0	4,5	5,5	13,1
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	7,8	8,7	7,4	7	1,6
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	3,9	3,7	7,8	9,3	15,2
13	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,8	0,3	5,2	3,7	4,5

Кроме того, наблюдается постепенное снижение этиологической значимости грамотрицательных бактерий при бессимптомной бактериурии на фоне повышения частоты выделения грамположительных кокков, в частности энтерококков и стрептококков.

В соответствии с целью исследования был проведен анализ частоты высеваемости грамотрицательных микроорганизмов при бессимптомной бактериурии. Несмотря на значительное увеличение объемов исследований мочи беременных отмечается уменьшение роли грамотрицательной флоры в изучаемой патологии (табл. 2).

Таблица 2 - Частота выделения грамотрицательной флоры при бессимптомной бактериурии.

Год	Всего исследований	Выделение грамотрицательной флоры	
		Абс.	%
2013	4 572	598	13,1
2014	10 857	951	8,76
2015	11 451	968	8,45
2016	10 490	952	9,08
2017	15 579	1 215	

Грамотрицательная флора, явившаяся этиологическим агентом скрытой бактериурии представлена микроорганизмами двух семейств: *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*. Как видно из рисунка 1, на первом месте по частоте выделения представители рода *Escherichia*, затем рода *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Proteus*. В единичных случаях выделялись *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*

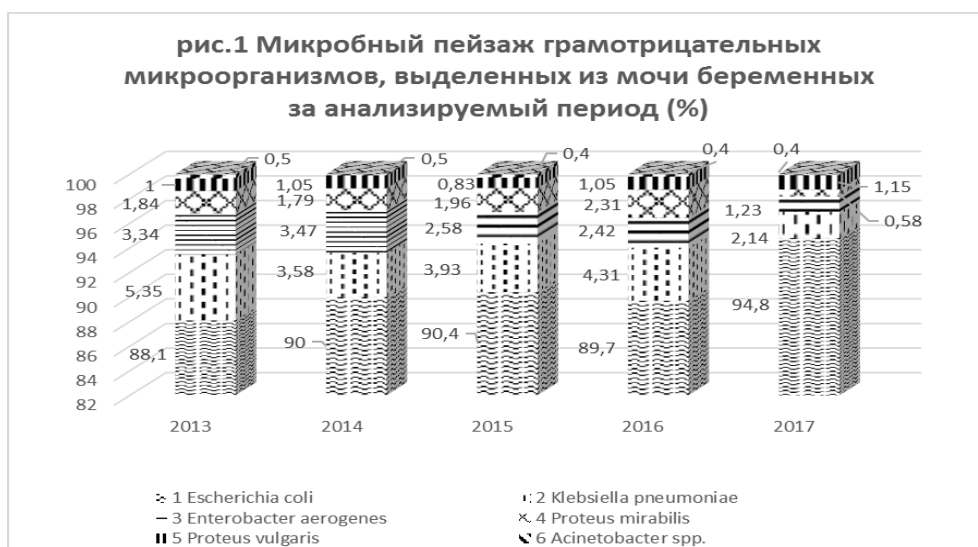


Рисунок 1 – Микробный пейзаж грамотрицательных микроорганизмов, выделенных из мочи беременных за анализируемый период (%).

Кроме того, на фоне постепенного снижения количества случаев бессимптомной бактериурии, отмечается увеличение этиологической роли *Escherichia coli* (с 88,1% в 2013 году до 94,8% в 2017 г.) и *Proteus vulgaris* (с 1,0% до 1,2% соответственно). Вместе с тем, в два раза уменьшилась частота выделения *Klebsiella pneumoniae*, почти в три раза – выделение *Enterobacter aerogenes* (с 3,3% в 2013 году до 1,2% в 2017 г.), *Proteus mirabilis* (с 1,8% в 2013 году до 0,6% в 2017 г.). Этиологическая значимость представителей семейства *Pseudomonadaceae* практически не изменилась.

Основными возбудителями инфекций мочевых путей беременных по литературным данным (как и у небеременных женщин) являются представители кишечной группы микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и др. Так, в исследовании S. Celen et al. [7] у 171 беременной с бессимптомной бактериурией чаще всего высеивались *Escherichia coli* (76,6%) и *Klebsiella pneumoniae* (14,6%) [7,8].

Устойчивость к антимикробным препаратам представляет собой глобальную угрозу здоровью и развитию, которая продолжает нарастать во всем мире, как это подчеркивается в недавнем докладе Международной координационной группы по устойчивости к противомикробным препаратам. В настоящее время считается, что более 50% антибиотиков во многих странах используются ненадлежащим образом, например, для лечения вирусов, когда они лечат только бактериальные инфекции или используют неправильный (более широкого спектра) антибиотик, тем самым способствуя распространению устойчивости к противомикробным препаратам [9].

Наряду с изучением микробного пейзажа грамотрицательных микроорганизмов – этиопатогенов бессимптомной бактериурии был проведен анализ чувствительности этих возбудителей к антибактериальным препаратам, который показал снижение чувствительности грамотрицательных микроорганизмов ко всем группам антибактериальных средств (рис. 2). Так, чувствительность к аминогликозидам, цефалоспорином и фторхинолонам снизилась в среднем в 1,5 раза, карбапенемам и макролидам – в 1,3 раза, а к пенициллинам – в 2,3 раза.

По данным отечественных и зарубежных источников, с целью лечения неосложненных ИМП, в том числе и ББ, у беременных, наиболее применяемые следующие группы антибиотиков: пенициллины (ампициллин, амоксициллин, амоксициллин/клавуланат); цефалоспорины (I-II-III-поколения); нитрофураны (нитрофурантоин); триметопримсульфаметоксазол; фосфомицин [10].



Рисунок 2 – Динамика чувствительности к антибиотикам грамотрицательных микроорганизмов (%).

Из препаратов, которые используются для лечения беременных с ИМВП, к категории В относятся пенициллины, цефалоспорины, фосфомицин и нитрофурантоин. Помимо безопасности, лекарственное средство должно обладать высокой эффективностью. Данные отечественной литературы демонстрируют следующую резистентность *E. coli*, как основного уропатогена у беременных с ББ, к антибиотикам: фосфомицин трометамол - 0% резистентных штаммов, нитрофурантоин 2,9-4,3%, котримоксазол 14,5-18,4 %, цефазолин 4,5%, цефуроксим 3,4%, цефотаксим 1,7%, амоксициллин/клавуланат 3,4%, ампициллин (амоксициллин) 31,6-33,3 % [11-13].

Распространение резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам является одной из самых острых проблем современности. Антибиотикорезистентность снижает эффективность мероприятий по профилактике и лечению инфекционных заболеваний, приводит к увеличению тяжести и длительности течения этих заболеваний, в результате чего повышается смертность и ухудшается качество жизни населения [14].

Выводы

1. Более 50% возбудителей бессимптомной бактериурии беременных (от 79,7% в 2013г до 65,5% в 2017г) относятся к грамотрицательным микроорганизмам семейства *Enterobacteriaceae*.
2. На первом месте по частоте выделения представители рода *Escherichia*, затем рода *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Proteus*. В единичных случаях выделялись *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*
3. Отмечается увеличение этиологической роли *Escherichia coli* (с 88,1% в 2013 году до 94,8% в 2017 г.) и *Proteus vulgaris* (с 1,0% до 1,2% соответственно). В два раза уменьшилась частота выделения *Klebsiella pneumoniae*, почти в три раза – выделение *Enterobacter aerogenes* (с 3,3% в 2013 году до 1,2% в 2017 г.), *Proteus mirabilis* (с 1,8% в 2013 году до 0,6% в 2017 г.).

4. Прослеживается снижение чувствительности грамотрицательных микроорганизмов ко всем группам антибактериальных средств, так чувствительность к аминогликозидам, цефалоспорином и фторхинолонам снизилась в среднем в 1,5 раза, карбапенемам и макролидам – в 1,3 раза, а к пенициллинам – в 2,3 раза.

Список литературы

1. Delzell J.E., Lefevre M.L. Urinary tract infections during pregnancy // *Am. Fam. Physician.* – 2000. – Vol. 61, N 3. – P. 713–721
 2. Бессимптомная бактериурия у беременных Ю.В. Козырев, Т.А. Густоварова//*Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* – 2011. - № 4. - С.36-42.
 3. Частота бактериурии у беременных и антибиотикочувствительность возбудителей/ Дусмагамбетов М.У., Дусмагамбетова А.М., Ахметова Д.Ж., Жунусов Д.К. //Материалы I Съезда урологов стран СНГ и XIV Конференции молодых ученых-медиков стран СНГ, посвященные 25-летию независимости РК и АО «Научный центр урологии им.академика Б.У. Джарбусынова». – С. 120-122.
 4. Капительный В. А. Течение и исходы беременности у пациенток с бессимптомной бактериурией: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008.
 5. Fatima N., Ishrat S. Frequency and risk factors of asymptomatic bacteriuria during pregnancy // *J. Coll. Physicians. Surg. Pak.* – 2006. – Vol. 16, N 4. – P. 273–275.
 6. Risk factors related to asymptomatic bacteriuria in pregnant women/ Guinto V.T., De Guia B., Festin M.R. et al. // *J. Med. Assoc. Thai.* – 2009. – Vol. 92. – P. 606–610.
 7. Asymptomatic bacteriuria and antibacterial susceptibility patterns in an obstetric population/Celen S., Oruç A.S., Karayalçın R. et al.// *ISRN Obstet. Gynecol.* - 2011. - Vol. 2011. - ID 721872.,
 8. Локиш К.Л. Актуальные вопросы диагностики и лечения бессимптомной бактериурии и острых циститов у беременных// *Эффективная фармакотерапия.* – 2014. – Т. 32. –С. 32 – 34. *Казахстанский фармацевтический вестник*, 21.06.2019г
 9. Антибактериальная терапия инфекций мочевыводящих путей у беременных: Пособие для врачей Кулаков В.И., Анкирская А.С., Страчунский Л.С. и др.//*Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерап.* – 2004. – Т. 6, № 3. – С. 218-223.
 10. Гуменюк Е. Г. Современные подходы к профилактике и лечению инфекций мочевыводящих путей во время беременности. //Журн. акуш. жен. болезн. – 2005. – № 4. – С. 1-4,
 11. Современные подходы к антибактериальной терапии инфекций мочевыводящих путей у беременных./Рафальский В.В., Чилова Р.А., Остроумова М.В., Саврацкий А.А.//*Акушерство и гинекология.* – 2009. – № 4. – С. 55–58.
 12. Синякова Л. А. Инфекция мочевых путей у беременных. // *Эффектив. фармакотерапия в акушерстве и гинекологии.* – 2008. – № 3. – С. 2-7.
 13. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 год: Распоряжение Правительства РФ от 25.09.2017 № 2045-р.
- Автор для корреспонденции:** Дусмагамбетова А.М. - заведующая лабораторным отделением ГКП на ПХВ «Городская поликлиника № 5» акимата г. Нур-Султан, к.м.н.; эл. почта: aigul_micra@mail.ru, 8-701-295-27-93.

FTAMB 76.03.43+76.31.29+76.03.55

АНТИБИОТИКТЕР, ІШЕК МИКРОБИОМЫ ЖӘНЕ ИММУНДЫҚ ЖҮЙЕ

М.А. Нургазиев^{1,2}, Ш.Д. Серғазы^{1,2}, Л.Е. Чуленбаева^{1,2}, А.Ф. Нургожина^{1,2}, А.Е. Гуляев^{1,2}, С.С. Қожахметов^{1,2}, А.Р. Кушугулова^{1,2}

¹Адам микробиомасы және ұзақ өмір сүру зертханасы, Өмір туралы ғылымдар орталығы, «National Laboratory Astana» жеке мекемесі, Назарбаев Университет, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²Қазақстандық адам микробиомын зерттеушілерінің бірлестігі, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Антибиотиктердің адам микробиомына және иммундық жүйесіне әсері қоғамдық денсаулық сақтаудың проблемаларының бірі. Бұл проблема соңғы онжылдықта бүкіл әлемде, әсіресе дамушы елдерде белсенді талқыланды. Антибиотиктердің бастапқы міндеті бактериялардың бақыланбайтын өсуін тоқтату, иммундық жүйеге оны ағадан алып тастауды аяқтау. Сондықтан бактериостатикалық сипаттамаларды зерттеумен қатар бактерияға қарсы препараттардың адамның иммундық жүйесіне әсерін бақылау маңызды. Алайда, бүгінгі күні антибиотиктерді қолдану антибиотиктерге тұрақтылық, адам ішегінің микробиомының өзгеруі және қожайынның қорғау жүйесінің басылуы сияқты бірқатар жағымсыз салдарларға алып келеді. Бұл әдеби шолуда антибиотиктерді

қолдану мен олардың ересектер мен балалардың ішек микробиомасына әсері, ішек микробиотасының метаболикалық өзара әрекеттесуі арасындағы байланыс және адам ішек микробиомы мен иммундық жүйе арасындағы байланыстары қарастырылады.

Кілт сөздер: антибиотиктер, микробиом, иммундық жүйе, антибиотиктерге төзімділік, β-лактамы антибиотиктер.

ANTIBIOTICS, GUT MICROBIOME AND IMMUNE SYSTEM

M. Nurgazyev^{1, 2}, S. Sergazy^{1, 2}, Y. Chulenbayeva^{1, 2}, A. Nurgozhina^{1, 2}, A. Gulyayev^{1, 2}, S. Kozhakhmetov^{1, 2}, A. Kushugulova^{1, 2}

¹Laboratory of Human Microbiome and Longevity, Center for Life Sciences, Private Institution “National Laboratory Astana”, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Kazakhstan

²Kazakhstan Association of Researchers of the Human Microbiome, Nur-Sultan, city Kazakhstan

The impact of antibiotics on the human microbiome and immune system is a public health issue. This problem has been actively discussed around the world over the past decade, especially in developing countries. The initial goal of antibiotics was to stop the uncontrolled growth of bacteria to allow the immune system to complete its removal from the body. Therefore, along with the study of bacteriostatic characteristics, it is important to monitor the effect of antibacterial drugs on the human immune system. However, today, the use of antibiotics leads to a number of adverse effects, such as antibiotic resistance, changes in the human gut microbiome, and suppression of the host's defense system. This review focuses on the association between antibiotics use and its impact on gut microbiome of adults and children, gut microbiota metabolic interactions and presents the current understanding of the link between human gut microbiome and immune system.

Keywords: antibiotics, microbiome, immune system, antibiotic resistance, β-lactam antibiotics.

АНТИБИОТИКИ, КИШЕЧНЫЙ МИКРОБИОМ И ИММУННАЯ СИСТЕМА

М.А. Нургазиев^{1,2}, Ш.Д. Серғазы^{1,2}, Л.Е. Чуленбаева^{1,2}, А.Ф. Нургожина^{1,2}, А.Е. Гуляев^{1,2}, С.С. Қожахметов^{1,2}, А.Р. Кушугулова^{1,2}

¹Лаборатория микробиома человека и долголетия, Центр наук о жизни, Частное учреждение «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет, Нур-Султан, Казахстан

²Казахстанское объединение исследователей микробиома человека, Нур-Султан, Казахстан

Влияние антибиотиков на микробиом человека и иммунную систему является одной из проблем общественного здравоохранения. Эта проблема активно обсуждается во всем мире за последнее десятилетие, особенно в развивающихся странах. Первоначальной задачей антибиотиков состояла в том, чтобы остановить неконтролируемый рост бактерий, чтобы позволить иммунной системе завершить его удаление из организма. Поэтому наряду с изучением бактериостатических характеристик важно контролировать влияние антибактериальных препаратов на иммунную систему человека. Однако на сегодняшний день применение антибиотиков приводит к ряду неблагоприятных последствий, таких как устойчивость к антибиотикам, изменение микробиома кишечника человека и подавление защитной системы хозяина. В этом обзоре рассматривается связь между использованием антибиотиков и их влиянием на кишечный микробиом взрослых и детей, метаболическими взаимодействиями кишечной микробиоты и представлено современное понимание связи между микробиомом кишечника человека и иммунной системой.

Ключевые слова: антибиотики, микробиом, иммунная система, устойчивость к антибиотикам, β-лактамы антибиотиков.

Кіріспе

1928 жылы антибиотиктің алғашқы коммерциялық ашылуынан бастап, оның бастапқы міндеті бактериялардың бақылаусыз өсуін тоқтату және иммундық жүйеге оны ағзадан алып тастауды аяқтауға мүмкіндік беру болды. Сондықтан, бактериостатикалық сипаттамаларды зерттеумен қатар, антибиотиктердің адамның иммундық жүйесіне әсерін бақылау маңызды. Алайда, бүгінгі күнде антибиотиктерді қолдану адам ішек микробиомының өзгеруі, антибиотиктерге төзімділік және иммундық жүйенің басылуы сияқты бірқатар жағымсыз салдарларға әкеледі.

Ішек микробиомы туралы біздің білімдеріміз ұзақ уақыт бойы шектеулі еді, себебі бактерия түрлерінің көпшілігі дәстүрлі әдістермен анықтау мүмкін болмады. Алайда, ішек микробиомасының құрамы мен қызметін анықтайтын секвенирлеу, метагеномика және

метапротеомика сияқты заманауи әдістерін пайдалана отырып, оларды анықтау оңай және қол жетімді болды. Микробиоманы талдаудың ең көп таралған әдісі 16S рибосомалық РНҚ (рРНҚ) генінің ампликондық талдауы болып табылады. Рави Рандджан мен оның әріптестері екі секвенирлеу әдісін салыстырды және бөлшектегіштің бүкіл геномын секвенирлеудің 16s ампликон әдісімен салыстырғанда көптеген артықшылықтары бар екенін анықтады, оның ішінде бактериялардың түрлерін анықтау, әртүрлілікті және гендерді болжау [1].

Ішек микробиомасын құрайтын бактериялардың көпшілігі белгілі болды, олар: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* және *Verrucomicrobia*, бұл бактериялар жалпы популяцияның 90% құрайды [2]. Адам ішегінде өмір сүретін осы және басқа бактериялар витаминдер мен аминқышқылдарының синтезі, энергияны пайдалану, энтерогенді патогендерден қорғау, шырышты қабаттың тұтастығы және иммундық жүйенің дамуы сияқты физиологиялық процестерде маңызды рөл атқарады [2]. Антибиотиктерді қолдану ішек микробиомының құрамы мен функциясының бұзылуына әкелуі мүмкін екенін растайтын бірқатар жарияланымдар бар. Кең спектрлі антибиотиктер ішек микрофлорасының таксономиялық әртүрлілігін едәуір азайтып, ішек қауымдастығындағы 30% бактериялардың құрамына әсер ету мүмкіндігіне ие [3].

Материалдар мен әдістер

Деректерді іздеу әдістері

Ақпарат келесі дерекқорларда ізделінді: NCBI PubMed, Medline, Web of Science және Google Scholar. Бұл әдеби шолу үшін 2015 жылдан бастап 2020 жылдың шілде айына дейін жарияланған басылымдар пайдаланылды. Іздеу үшін келесі түйінді сөздер мен сөз тіркестері қолданылды: ішек микробиомы, антибиотиктермен емдеу, антибиотиктерге төзімділігі, баланың ішек микробиомы. Ғылыми журналдардың ресми сайттарынан табылған мақалалар қосымша ақпараттық ресурс ретінде қолданылды.

Деректер абстракциясы

Шолу барысында барлық тиісті зерттеулер жүргізіліп, келесі мәліметтер алынды: мақала атауы, жарияланған жылы, зерттелген әдістер, пациенттер қабылдайтын антибиотиктердің түрлері, зерттеу нәтижелері.

Антибиотиктермен емдеуден кейін жаңа туған нәрестелерде ішек микробиотасының дамуы

Балалар ішек микробиомы өмірінің алғашқы екі жылында елеулі өзгерістерге ұшырайды. Антибиотиктермен емдеу балалардағы ішек микробиомының дамуына айтарлықтай әсер ететін ең маңызды факторлардың бірі болып саналады. Fiona Fouhy мен әріптестері антибиотиктермен парентеральды ем алған тоғыз баланың ішек микробиомын салыстыру үшін жоғары өнімді секвенирлеуді және сандық ПТР (сандық ПТР) пайдалана отырып зерттеу жүргізілді [4]. Антибиотиктердің тағайындалған курсы туғаннан кейін екі күннен кейін басталды, ал нәжістің үлгілері емдеу аяқталғаннан кейін 4 және 8 аптадан кейін алынды. Бақылау тобын 9 дені сау бала құрады. Зерттеу нәтижелері антибиотиктер алатын балалардың ішек микробиомасында елеулі өзгерістер көрсетті. Емдеуді тоқтатқаннан кейін 4 аптадан кейін алынған үлгілерде *Proteobacteria* ($p = 0,0049$) ұлғаюы және *Actinobacteria* ($p = 0,00001$) (және *Bifidobacterium* [$p = 0,0132$]) санының едәуір төмендеуі, сондай-ақ бақылау тобымен салыстырғанда *Lactobacillus* ($p = 0,0182$) түрінің төмендеуі байқалды. *Proteobacteria* деңгейі 8 аптада антибиотиктер ($p = 0,0049$) алған балаларда айтарлықтай жоғары болды. Алайда *Actinobacteria*, *Bifidobacterium* және *Lactobacillus* деңгейлері 8 аптада алынған үлгілерде қалпына келтірілді және бақылау тобындағы үлгілермен бірдей болды. Бұл зерттеу жаңа туған нәрестелер ампициллин мен гентамицинді бірге пайдалану олардың ішек микробиомының дамуына айтарлықтай әсер етуі мүмкін екенін көрсетті [4].

Кюсю университетінің ғалымдар тобы жүргізген зерттеу антибиотиктерді қолдану балалардағы ішек микробиомының дамуына қалай әсер ететінін көрсетті. Бұл зерттеуде антибиотикотерапия қабылдаған балалардың ішек микробиомы талданды. Ішек микробтары алғашқы 5 күн ішінде күн сайын және алғашқы 2 ай ішінде ай сайын талданды. Бұл зерттеуде өте ұқсас нәтижелер байқалды. Антибиотиктерді енгізу *Bifidobacterium* түрін азайтуға және *Proteobacteria* санын артуына әкелді. Бұдан басқа, антибиотикотерапияны алмаған, бірақ аналары

босанғанға дейін антибиотиктерді қабылдаған балалардың микробиомы антибиотикотерапияны қабылдаған балалардың микробиомы сияқты ұқсас өзгерістерді көрсетті [5].

Антибиотиктермен емдеу шала туған балалар арасында да кең таралған. Антибиотиктер олардың иммундық жүйесінде және ішек микробиомасында елеулі өзгерістер тудырады. Бұдан басқа, олар кеш сепсиске, некротикалық энтерколиттің патогенезіне және денсаулыққа басқа да қолайсыз салдарға әкелуі мүмкін екені анықталды [6]. Andrew J. Gasparrini және оның әріптестері антибиотиктердің әсеріне ұшыраған шала туған балалардың ішек микробиотасын зерттеу үшін секвенирлеуді орындады және нәтижелерді антибиотиктер алмаған дені сау нәрестелердің үлгілерінен алынған нәтижелермен салыстырды. Зерттеу нәтижелері ерте жастағы балаларды антибиотиктермен емдеу түрлік байлықтың және әртүрліліктің төмендеуіне, ішектің төзімділігінің артуына және MDR Enterobacteriaceae тұрақты тасымалына әкелуі мүмкін екенін көрсетті [7].

Бір немесе аралас антибиотикалық терапияға байланысты адамның ішек микробиомасының өзгеруі

Кесте - Антибиотиктермен емдеу нәтижесінде адам ішек микробиомының өзгеруі.

Авторлар	Жыл	Әдістері	Пациенттер	Қолданылған антибиотиктер	Мемлекет	Нәтижелер/қорытындылар	Сілтеме
Esaiaasen E, et al.	2018	7 және 28 күн және 4 ай аралығында жиналған нәжіс үлгілерінде антибиотиктерге (резисторға) тұрақтылық гендерінің таксономиялық құрамы және жиыны ұсақтаушы метабеномының секвенирленуі арқылы талданды.	76 сәби	Ampicillin or penicillin + gentamicin	Норвегия	Lactobacillus ▼ Veillonella ▼ Bifidobacterium ▼ Escherichia ▲	[8]
Doan T, et al.	2017	Нәжіс үлгілері 16s рРНК генін секвенирлеуге жиналды. α-әртүрлілігі (α-әртүрлілікті Симпсон кері индексі), ал кейінгі β және γ-айырым Симпсон және Шеннон индексі	80 сәби	Azithromycin	Нигер	Lactobacillus ▼ Clostridium □	[13]
Anne Vrieze, et al	2014	Нәжіс микробиотының құрамы (адамның ішек жолы микросхемасының филогенетикалық микрочипі), Нәжіс және плазмалық өт қышқылдарының концентрациясы, сондай-ақ инсулинге сезімталдық (гиперинсулинсулиялық эугликемиялық қысқаш [6,6-2h2] - глюкозалық индикаторды пайдалану арқылы) өлшенді.	Семіздік бар 20 ер адам	Vancomycin	Нидерланды	Firmicutes ▼ Proteobacteria ▲ Primary bile acids ▲ Secondary bile acids ▼ Peripheral insulin sensitivity ▼	[14]
Jean de	2017	Жалпы ДНҚ SOLiD5500 Wildfire	46 ер және	Moxifloxacin (MXF)	Франция	Alistipes, Bilophila,	[10]

Gunzburg, et al.		(Life Technologies) көмегімен бөлініп, секвенирленді, бұл $67,2 = 19,8$ м (орташа = стандартты ауытқу) 35-ұзын бір жақты оқу тізбектерін әкелді.	әйел адам			Butyriromonas, Coprobacillus, Fecalibacterium, Odoribacter, Oscillibacter, Parasutterella, Roseburia, Sutterella ▼ Bacteroides, Paraprevotella □ Lachnoclostridium □	
Kristian H. Mikkelson, et al.	2015	Нәжіс үлгілеріндегі бактерияларды есептеу пластиналарды есептеу әдісімен жүргізілді. Нәжіс үлгілеріндегі Ванкомицин мен Гентамициннің концентрациясы хемилюминесцентті имуноталдау көмегімен анықталды, ал меропенемнің концентрациясы Петри аяқшасындағы агар – агар талдауды пайдалана отырып өлшенді.	12 ер адам	Antibiotic cocktail (Vancomycin, Gentamycin, Meropenem)	Дания	Bifidobacterium ▼ Enterococci ▼ Coliform ▼ Peptide YY secretion ▲	[9]
Katri Korpele, et al.	2016	Бактериялық құрамды V4 – V6 генінің 16s rRNA аймағын секвенирлеу арқылы зерттеді. Illumina HiSeq 2000 платформасында ұсақтағышты метагеномды секвенирлеу жүргізілді.	236 бала	Macrolide	Финляндия	Actinobacteria ▼ Bacteroidetes ▲ Proteobacteria ▲ Bile-salt hydrolase ▼ Macrolide resistance ▼	[15]
Mamun-Ur Rashid, et al.	2015	V5-V7 гені гипервариабельді аймақтан штрих-коды бар ампликондар кітапханалары рибосомалық РНК кіші суббірлігі генерациялап, біріктіріп, секвенирленді	30 сау еріктілер	Ciprofloxacin and clindamycin	Швеция	Ciprofloxacin Bacteroides ▲ Faecalibacterium ▼ Alistipes ▼ Ruminococcaceae ▼ Clindamycin Coprococcus ▼ Roseburia, Lachospira ▼	[11]

Әр түрлі антибиотиктерді қабылдау немесе олардың комбинациялары әр түрлі әсер етуі және микробиоманың өзгеруіне әкелетіні белгілі. Мысалы, ванкомицин микробтардың әртүрлілігін және нәжістегі грам+ бактериялардың абсолютті санын, атап айтқанда *Firmicutes* санын азайтады, ал амоксициллиннің ішек микробиомасына әсері аздап өзгеше болады. Құрамында ампициллин, гентамицин, метронидазол, неомицин және ванкомицин бар антибиотиктер жиынтығы бактериялардың жалпы санын азайтып қана қоймайды, сонымен қатар микробиоманың таксономиялық құрамын айтарлықтай өзгертеді [2]. Кестеде біз антибиотиктердің ішек микробиомасына әсері туралы әртүрлі мақалаларды таңдадық. Мақалалардағы пациенттер белгілі бір антибиотиктерді немесе олардың комбинациясын

қабылдады. Норвегиялық есеп ампициллин мен гентамицинді біріктіріп тұтыну *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* және *Veillonella* деңгейінің төмендеуіне және *Escherichia* ұлғаюына алып келгенін көрсетті [8].

Антибиотиктер коктейльдерінің (Ванкомицин, гентамицин және меропенем комбинациясы) микробиомға әсерін зерттеген Дат тобының есебі *Bifidobacterium*, *Enterococci* және *Coliform* деңгейлердің айтарлықтай төмендеуін көрсетті [9]. Егер әр түрлі антибиотиктердің бактериялардың бір тобына әсерін салыстырсақ, ципрофлоксацин класындағы антибиотиктерді қабылдау емделушілерде *Bacteroides* санын айтарлықтай төмендетеді, бірақ моксифлоксацин *Bacteroides* санын бастапқы деңгейде қалдырады [10].

Антибиотиктермен емдеудің ішек микробиомына ұзақ мерзімді әсері

Антибиотиктерді қабылдаудың қауіпті салдары бүгінгі күні жиі талқыланады. Белгілі болғандай, олар адам ішек микробиомына қысқа мерзімді және ұзақ мерзімді әсер етеді. Мысалы, ципрофлоксацин мен клиндамициннің сау адамдар тобының ішек микробиотасына 1 жыл бойы әсерін зерттеген мақалада осы антибиотиктерді қабылдағаннан кейін ішек микробиотасын қалыпқа келтіру үшін 1 айдан 12 айға дейін талап етілгені анықталды. Ципрофлоксацин мен клиндамицинді қабылдау ішектің микробтық құрамын өзгертті. Бұл өзгерістер 12 айға дейін сақталды [11]. Антибиотиктерді қолдану микробтық қоғамдастықтың ұзақ өзгеруіне немесе тіпті кейбір түрлердің тұрақты өлуіне әкелуі мүмкін. Falk Hildebrand және оның әріптестері цефалоспоринді антибиотиктермен емдегеннен кейін ішек микробиомы өзгерістері туралы деректерді жинап талдады. Ген деңгейіндегі метагеномдық талдау нәтижелері тоғыз комменсалды бактерияның өлімін және ұзақ өзгерістерді көрсетті [12].

Антибиотиктерге төзімділіктің таралуы

Адамның кейбір әрекеттері антибиотиктерге төзімділіктің таралуын тездетеді, соның ішінде антибиотиктерді дұрыс пайдаланбау, денсаулық сақтау және сапар жүйесінде нашар бақылау. Саяхат адам ішегінде өмір сүретін бактериялардың антибиотиктеріне төзімділік құрылымын, әсіресе Enterobacteriaceae түрлерін өзгертетіні белгілі [13]. Соңғы жылдары Үнді түбегі елдеріне (Үндістан, Пәкістан және Бангладеш бөлігі) баратын саяхатшылардан табылған Enterobacteriaceae бактерияларының штамдары кеңейтілген спектрдегі бета-лактамазаны (ESBL) шығаратын цефалоспоринді антибиотиктерге төзімділігін көрсетті. Антибиотиктерді қабылдау және Үнді түбегінің елдеріне сапар сияқты белгілі бір қауіп факторлары, автордың пікірінше, резистенттілікті алу қаупін арттырады [13].

Bengtsson-Palme және әріптестер Үнді түбегінде немесе Орталық Африкада алмасу бағдарламасына дейін және кейін 35 Швед студенттерінен нәжіс үлгілерінде 300-ден астам антибиотиктерге төзімді гендерді анықтау үшін метагеномды секвенирлеуді жүргізді [14]. Секвенирлеудің нәтижелері ішек микробиомының жалпы таксономиялық әртүрлілігі субъектілерде тұрақты болып қалғанын көрсетті, бірақ Proteobacteria саны 35 студенттің 25-інде артты. Антибиотиктерге тұрақтылық гендерінің салыстырмалы таралуы, атап айтқанда, сульфонамидке (2,6 есе өсті), триметопримге (7,7 есе) және β -лактамазға (2,6 есе өсті) төзімділікті кодтайтын гендер үшін ұлғайды [14].

Басқа зерттеуде Christian J.H. von Wintersdorff және оның әріптестері Нидерландыдағы 124 сау саяхатшыны тексерді, олар оңтүстік-шығыс Азия, Оңтүстік Африка, Оңтүстік Еуропа, Орталық Америка және Үнді түбегіне саяхат жасаған болатын [18]. Бұл зерттеудің нәтижелері кеңейтілген спектрлі β -лактамазаны кодтайтын blaCTX-M генінің үлгілерінде өсуін анықтады (оның таралуы сапардан кейін 9,0% - дан 33,6% - ға дейін өсті ($p < 0,001$)) [15]. Демек, осы және басқа да зерттеу нәтижелері саяхатшылар континенттер арасында антибиотиктерге төзімді болуы мүмкін екенін дәлелдейді және растайды.

Антибиотиктермен емдеуден кейін ішек микробиомын жанама әсерлерден қорғау

Антибиотиктерді пайдалану диарея, *Clostridium difficile* инфекциясы, псевдомембранозды энтероколит және антибиотиктерге төзімді бактериялардың түрлерінің таралуы сияқты ұзақ мерзімді салдарға келтіреді [10]. Gunzburg және оның әріптестері антибиотиктер туындаған дисбактериоздың алдын алуға арналған "DAV132" деп аталатын терапияны әзірледі. Олар

рандомизацияланған бақыланатын зерттеу жүргізді, онда 46 ерікті екі параллель топтарда моксифлоксацинді ауызша қабылдаудың 5 күндік курсы алды, бірінші топ DAV132 антибиотикпен бірге енгізді, екінші топ тек антибиотик қабылдады. Бұл зерттеуде сапалы метагеномды талдау ішек микробиомының әртүрлілігі мен құрамы моксифлоксацинмен бірге DAV132 қабылдаған пациенттерде сақталғанын көрсетті [10]. Авторлар бұл өнім ішек микробиомының алдын алу және антибиотиктердің жағымсыз әсерінен қорғау үшін тиімді деп санайды. Антибиотиктерден туындаған зақымданудан микробиомды қорғау әдістерінің бірі бета-лактамазды ферменттерді пайдалану болып табылады. Бұл ферменттер ішек микробиомасына теріс әсер етпестен бұрын асқазан-ішек жолдарында қалдық антибиотиктерді жою үшін қолданылады [16]. Ғалымдар тобы әзірлеген P3A Бета-лактамазды ферменттері (SYN004) клиникалық сынақтардың әртүрлі кезеңдерінде (фазаларында) жақсы нәтижелер көрсетті. SYN-004 цефтриаксон антибиотигін ішекте төмен деңгейге дейін ыдырады [17]. Демек, бета-лактамазды ферменттер ішек микробиомын қорғау және қажетсіз жанама әсерлердің алдын алу үшін пайдаланылуы мүмкін.

Бүгінгі күні микробиомада гендік инженерияны пайдалану аз зерттелген салалардың бірі болып табылады. In situ (MAGIC) конъюгация арқылы ішек микробиомының метагеномды өзгеруі - бұл Carlotta Ronda мен әріптестері табиғи мекендеу ортасындағы ішек микробтарын генетикалық түрлендіру үшін мобиломды жасау арқылы енгізген жаңа жүйе [18]. Бұл жүйенің тұжырымдамасы бактериялардың ДНҚ-мен алмасу қабілетіне негізделген және сол арқылы ішек микробиомасындағы таксондарды қажетті генетикалық функциялармен түрлендіруге негізделген [18].

Антибиотиктермен емдеуде метаболиттердің өзгеруі

Антибиотиктер, сондай-ақ ішек микробиомынан берілетін бактериялық метаболиттер мен сигналдарды, атап айтқанда, ішек эпителиальды жасушалар және ішек иммундық жасушалары танылатын сигналдарды өзгертіп, адамның имунитетіне әсер етеді. Sheng Zhang және De-Chang антибиотиктер липидтерге, өт қышқылдарына, аминқышқылдарға және ішектегі аминқышқылдарға байланысты заттарға терең әсер етуі мүмкін деп мәлімдейді. Комменсальды бактериялар антибиотикті енгізгеннен кейін жойылады, бұл 17 Т-Хелпер деңгейін және 17 реттеуші Т-жасушаларын төмендетуге және қысқа тізбекті май қышқылын өндіруді төмендетуге және ішектің қабынуын арттырады [2].

Антибиотиктерді қабылдау ішекте *C. difficile* өсуі үшін метаболикалық ортаны жасайды және жасушаларды зақымдайтын TcdA және TcdB токсиндерін шығарады. Casey M. Theriot және оның әріптестері тышқандарға in vitro және ex vivo талдау жүргізді. *C. difficile* маннит, фруктоза, сорбит, рафиноз және стахиоз сияқты белгілі бір метаболиттерді және антибиотиктерден кейін ішекте кең таралған өт қышқылының бастапқы таухолаты ретінде пайдалана алатыны көрсетілді [19].

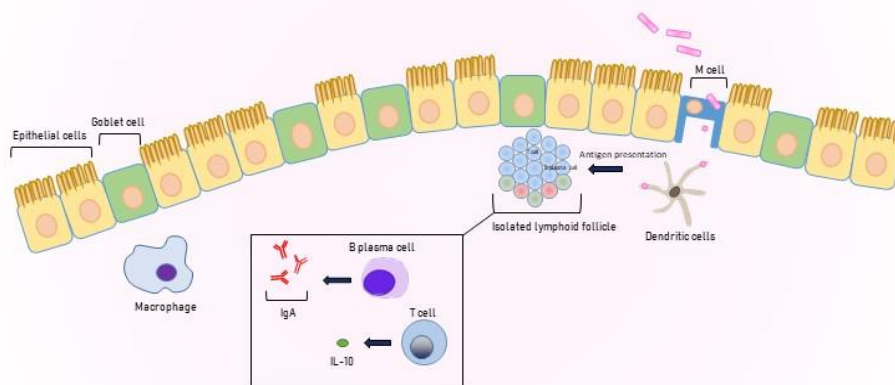
Иммундық жүйе

Иммундық жүйе ішек биоценозының балансын реттейді, яғни микробиотаның өзін-өзі реттеу механизмдері жергілікті ішек имунитетімен бақыланады. Ішек микробиотының бұзылуы иммунологиялық дисфункцияның және гуморальды имунитеттің салдары болып табылады. Осылайша, микробиом иммундық мәртебенің нысаны мен сапасына қатты әсер етеді және микробтардың құрамы мен орналасуын қалыптастырады. Микробиом мен адам ағзасы арасындағы байланысты терең түсіну әртүрлі аурулардың пайда болуын түсінуге әкеледі [20,21].

Шырышты қабаттың иммундық жүйесі өз лимфоидты аппараты мен иммунокомпетентті жасушалардың болуына байланысты қорғаныш кедергісін құрайды [22–24]. Ішек микробы ағзадағы ең үлкен иммундық жүйемен - шырышты қабықтың иммундық төзімділігін тудыратын ішек лимфоидты тінімен өзара байланысты. Қорғаудың бірінші сатысында эпителиальді жасушалар антимикробтық жасушалар мен лизоцимдерді секретациялайды, содан кейін иммуноглобулиндер шығарылады, ал қорғаудың соңғы кезеңінде лимфоидты жасушалар, дендрит жасушалары сияқты туа біткен және бейімделген жасушалардың дамуы орын алады. Өз кезегінде лимфоидты қорғау цитокиндер (IL-6, IL-17, IL-22, TNF) және Т-лимфоциттер өнімдерімен байланысты [25].

Патогенді және шартты-патогенді флораның және олардың токсиндерінің әсерінен ағзадағы иммундық статус пен жасушалық иммунитеттің өзгеруі байқалады. Бірқатар авторлар бұл өзгерістер қорғаныш болып табылады және иммунокомпетентті жасушалар мен олардың медиаторларының белсенділігін төмендетеді деп санайды [26–28].

Ішектің дисбактериозы бар ағзада лимфоидты органдардың дамуы бұзылады, бұл жасушалық иммунитетті басады. CD4 + және CD8 + ішек Т-жасушаларының ішкі жиындарының төмендеуі байқалады, ал Т-жасушалық рецепторлардың (TCR) экспрессиясы төмендейді. Сондай-ақ, Т-helper 2-ге қатысты Th1 және Th2 жасушаларының дисбалансы бар, бұл Th1 және Th2 типті аурулар сияқты кеш иммуноорталық аурулардың дамуына ықпал етеді. Дисбиозбен қатар аутоиммундық аурулардың даму немесе өршу қаупі бар, ең алдымен асқазан-ішек жолдарында иммунопатологиялық үдерістің оқшаулануы. Кейбір бактериялық популяциялар Th17 жасушасының, интлейкиннің қуатты көзі-17 (IL-17), ол шырышты қабықтың тұтастығын сақтау және патогенді микроорганизмдерді жоюда маңызды рөл атқарады. Т-жасушалары (Treg-жасушалары) IL-10 негізгі көзі болып табылады және ішек микробиотасына төзімділікті қолдайтын комменсалдан алынған антигендерді тануға қабілетті (сурет) [29–31].



Сурет - Адам ішектеріндегі лимфоидты микроортасы

Эксперименттік жасушалардың дисбактериозының жылдамдығы IgA және IgG антиденелерінің жетіспеушілігімен байланысты. Жүйелі инфекцияларда шағын микробиом, IgG дұрыс индукциясынан туындаған бактериялық бактериялардың симбиозы. IgG концентрациясы төмен деңгейде бұл инфекцияның ағым жылдамдығын арттырады [32,33]. Белгілі болғандай, IgA шырышты бактериялық қауымдастықты отарлау үшін қажет, өз кезегінде, В-жасушалардың сарқылуы және IgA жетіспеушілігі колонизацияның төмендеуіне және қоғамдастықтың иммуномодуляциялық түрлерін жоғалтуға ықпал етеді. Donaldson G. және бірлескен авторлар IgA микробтық қауымдастыққа қатысты амбивалентті, белсенді және сау ағзада пайдалы микробиотаны колонизациялауды ынталандырады, ал патогендерге реакциялар тудырады деп ойлайды [34].

Қорытынды

Осы шолуда ұсынылған негізгі нәтижелер белгілі бір антибиотиктер немесе антибиотиктер комбинациясы бактериялардың белгілі бір топтарының деңгейін азайту немесе арттыру арқылы микробтық қауымдастыққа ұқсас әсер ететінін көрсетті. Бұл шолу ішек микробиомының иммунитетпен, метаболмен өзара әрекеттесуі туралы және ішек микробиомын қорғау үшін қолданылатын әдістер туралы жаңартылған ақпаратты берді. Антибиотиктер микробиотаның құрамын өзгертеді және инфекцияларға сезімталдықты арттырады. Дегенмен, антибиотиктердің қоршаған ортаның өзгермелі комменсалдарына қосқан үлесіне жалпылама әсері түсініксіз болып қалады. Антибиотиктерді қабылдаудың дұрыс әдістерін анықтау үшін

одан әрі зерттеулер қажет, бұл антибиотиктердің ішек микробиомасына және иммундық жүйеге жағымсыз әсерін азайтуға мүмкіндік ашады.

Алғыс білдіру

Авторлар осы зерттеу жұмысын қаржыландырғаны үшін Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігіне алғыс білдіреді (AP05135073, AP05134659).

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1. Benjamin M. Davis, Glen F. Rall, M.J.S. 乳鼠心肌提取 //HHS Public Access. *Physiol. Behav.* - 2017. - V. 176. - P. 139–148.
2. Zhang S. Chen, D.C. Che, L.M. Facing a new challenge: The adverse effects of antibiotics on gut microbiota and host immunity.//*Chin. Med. J. (Engl).* - 2019. -V. 132. - P. 1135–1138.
3. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing.// Huse S.M., Dethlefsen L., Hube, J.A. et al.// *PLoS Genet.* - 2008. - V. 4.
4. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin.//Fouh, F., Guinane C.M., Hussey S. et al.//*Antimicrob. Agents Chemother.* - 2012. - V. 56. - P. 5811–5820.
5. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota.// Tanaka S., Kobayashi T., Songjinda P. et al.//*FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 2009. - V., 56. -P. 80–87.
6. Antibiotic perturbation of the preterm infant gut microbiome and resistome.// Gasparrini A.J., Crofts T.S., Gibson M.K. et al.//*Gut Microbes.* - 2016. - V. 7. - P. 443–449.
7. Gasparrini A.J., Wang B., Sun X. et al. //HHS Public Access. - 2020. - V. 4. - P. 2285–2297.
8. Effects of Probiotic Supplementation on the Gut Microbiota and Antibiotic Resistome Development in Preterm Infants.// Pedersen T., Klingenberg C., Hjerde E. et al.// *Front. Pediatr.* - 2018. - V. 6.
9. Effect of antibiotics on gut microbiota, gut hormones and glucose metabolism.// Mikkelsen K.H., Frost M., Bahl M.I. et al.// *PLoS One.* - 2015. - V. 10. - P. 1–14.
10. Protection of the human gut microbiome from antibiotics.//De Gunzburg J., Ghazlane A., Ducher A. et al.// *J. Infect. Dis.* - 2018. - V. 217. - P. 628–636.
11. Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods.// Rashid M.U., Zaura E., Buijs M.J. et al.// *Clin. Infect. Dis.* - 2015. - V. 60. - S77–S84.
12. Antibiotics-induced monodominance of a novel gut bacterial order.// Hildebrand F., Moitinho-Silva L., Blasche S. et al.// *Gut.* - 2019. - V. 68. - P. 1781–1790.
13. Travel-associated faecal colonization with ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: incidence and risk factors/ Ta M., Nilsson M., Nilsson L.E., Ha A. - 2013. - P. 2144–2153.
14. Johansson A. The human gut microbiome as a transporter of antibiotic resistance genes between continents. 2015.
15. High rates of antimicrobial drug resistance gene acquisition after international travel, the Netherlands.//von Wintersdorff C.J.H., Penders J., Stobberingh E.E. et al.//*Emerg. Infect. Dis.* - 2014. - V. 20. - P. 649–657.
16. Development of SYN-004, an oral beta-lactamase treatment to protect the gut microbiome from antibiotic-mediated damage and prevent *Clostridium difficile* infection.// Kaleko M., Bristol J.A., Hubert S. et al.//*Anaerobe.* - 2016. - V. 41. - P. 58–67.
17. Syn- T.O., Kokai-kun J.F., Roberts T. et al. *crossm Clinical Studies.* - 2017. - V. 61. - P. 14–16.
18. Metagenomic engineering of the mammalian gut microbiome in situ.// Ronda C., Chen S.P., Cabral V. et al.//*Nat. Methods.* - 201. - V. 16. - P. 167–170.
19. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection.//Theriot C.M., Koenigsnecht M.J., Carlson P.E. et al.// *Nat. Commun.* - 2014. - V. 5.
20. Taylor S.L., Wesselingh S., Rogers G.B. Host-microbiome interactions in acute and chronic respiratory infections.// *Cell. Microbiol.* - 2016. - V. 18. - P. 652–662.
21. Grigg J., Sonnenber, G. Host-Microbiota Interactions Shape Local and Systemic Inflammatory Diseases.// *J. Immunol.* - 2017. - V. 198. - P. 564–571.
22. Schoultz I., Keita Å. *Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease—Focusing on Intestinal Barrier Function.*//*Cells.* - 2019. - V. 8. - P. 193.
23. Satokari R. Contentious host-microbiota relationship in inflammatory bowel disease-can foes become friends again?// *Scand. J. Gastroenterol.* - 2014. - V. 5. -P. 34–42.
24. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur. Rev. / Viggiano D., Ianiro G., Vanella G. et al. //Med. Pharmacol. Sci.* - 2015. - V. 1. - P., 1077–85.
25. Burcelin R. Gut microbiota and immune crosstalk in metabolic disease.// *Mol. Metab.* - 2016. - V. 5. - P. 771–781.
26. McDermott A.J., Klein B.S. Helper T-cell responses and pulmonary fungal infections.// *Immunology.* - 2018. - V. 155. - P. 155–163.
27. The Microbiome Activates CD4 T-cell-mediated Immunity to Compensate for Increased Intestinal Permeability.//Edelblum K.L., Sharon G., Singh G. et al.// *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* - 2017. - V. 4. - P. 285–297.
28. Smolinska S., O'Mahony L. Microbiome-Host Immune System Interactions.// *Seminars in Liver Disease.* - 2016. - V. 36. - P. 317–326.
29. Francino M.P. Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances.// *Front. Microbiol.* - 2016. - V. 6. - P. 1–11.
30. Kim S., Covington A., Pamer E.G. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens.// *Immunol. Rev.* - 2017. - V. 279. - P. 90–105.

31. Pamer E.G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens.// *Science* (80-.). - 2016. - V. 352. - P. 535–538.
32. Gut Microbiota-Induced Immunoglobulin G Controls Systemic Infection by Symbiotic Bacteria and Pathogens./ Zeng M.Y., Cisalpino D., Varadarajan S. et al.// *Immunity*. - 2016. - V. 44. - P. 647–658.
33. Intestinal Microbial Diversity during Early-Life Colonization Shapes Long-Term IgE Levels./ Cahenzli J., Köller Y., Wyss, M. et al.// *Cell Host Microbe*. - 2013. - V. 14. -P. 559–570.
34. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization./ Donaldson G.P., Ladinsky M.S, Yu K.B. et al.// *Science*. - 2018. - V. 360. - P. 795–800.

Корреспондент-автор: Нургазиев М.А. - кіші ғылыми қызметкер адам микробиомасы және ұзақ өмір сүру зертханалары, «Ұлттық зертханалық Астана» ШБ, Назарбаев Университеті; электрондық пошта пошта: Madiyar.nurgaziyev@nu.edu.kz, 8 707 201 56 06

МРНТИ 76.03.43+34.27.21

ПРОФИЛИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ У *BACTEROIDES FRAGILIS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ БОЛЬНИЦ Г. НУР-СУЛТАН

С.С. Кожакметова¹, Е.В. Жолдыбаева¹, П.В. Тарлыков¹, С.Ш. Атавлиева¹, Т.А. Сыздыков², Р.Е. Хасенов^{3,4}, К.Е. Мухтарова¹, Е.М. Раманкулов¹

¹РГП «Национальный центр биотехнологии», Нур-Султан, Казахстан

²ГКП на ПХВ «Городская больница № 1», Нур-Султан, Казахстан

³ГКП на ПХВ «Многопрофильная областная больница № 2», Нур-Султан, Казахстан

⁴НАО «Медицинский Университет Астана», Нур-Султан, Казахстан

В настоящей статье представлены результаты изучения чувствительности *Bacteroidesfragilis* к наиболее часто применяемым для лечения интраабдоминальных инфекций антибиотикам: метронидазолу, меропенему, ципрофлоксацину и клиндамицину. На платформе MiSeqIllumina, проведено полногеномное секвенирование выделенных штаммов. Поиск генов резистентности к антибиотикам проводили с помощью базы данных устойчивости к антибиотикам CARD. В результате полногеномного секвенирования установлено, что 8,3% изученных штаммов несут *cfiA* и *Mef* гены; 92% штаммов несут *cepA* ген; 58% штаммов несут *tetQ* ген и 100% штаммов несут *adeF* ген.

Ключевые слова: *Bacteroidesfragilis*, перитонит, антибиотикочувствительность, гены резистентности, антимикробные препараты.

PROFILES OF SENSITIVITY AND GENES OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS OF A WIDE SPECTRUM OF ACTION IN *BACTEROIDES FRAGILIS* ISOLATED FROM HOSPITALS OF NUR-SULTAN

S. Kozhakhmetova¹, Y. Zholdybayeva¹, P. Tarlykov¹, S. Atavliyeva¹, T. Syzdykov², R. Khassenov^{3,4}, K. Mukhtarova¹, Y. Ramankulov¹

¹RSE «National Center for Biotechnology», Nur-Sultan city, Kazakhstan

²SOE «№ 1 City Hospital», Nur-Sultan city, Kazakhstan

³SOE «Multidisciplinary Regional Hospital № 2», Nur-Sultan city, Kazakhstan

⁴NcJSC «Astana medical university», Nur-Sultan city, Kazakhstan

This article presents the results of a study of the sensitivity of *Bacteroidesfragilis* to antibiotics most commonly used to treat intraabdominal infections: metronidazole, meropenem, ciprofloxacin and clindamycin. On the MiSeq Illumina platform, genome-wide sequencing of the isolated strains was performed. Antibiotic resistance genes were searched using the CARD antibiotic resistance database. As a result of genome-wide sequencing, it was found that 8.3% of the studied strains carry *cfiA* and *Mef* genes; 92% of the strains carry the *cepA* gene; 58% of the strains carry the *tetQ* gene and 100% of the strains carry the *adeF* gene.

Key words: *Bacteroidesfragilis*, peritonitis, antibiotic sensitivity, resistance genes, antimicrobial agents.

НҰР-СУЛТАН ЕМХАНАЛАРЫНАН ОҚШАУЛАНҒАН *BACTEROIDES FRAGILIS* АНТИБИОТИКТЕРГЕ ТӨЗІМДІЛІГІ МЕН ҚАРСЫЛЫҚ ГЕНДЕРІ

С.С. Қожахметова¹, Э.В. Жолдыбаева¹, П.В. Тарлыков¹, С.Ш. Атавлиева¹, Т.А. Сыздықов², Р.Е. Хасенов^{3,4}, Қ.Е. Мұхтарова¹, Э.М. Раманқұлов¹

¹«Ұлттық биотехнология орталығы» РМК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²«№ 1 қалалық аурухана» ШЖҚ бойынша МКК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

³«Облыстық көп салалы № 2 ауруханасы» ШЖҚ бойынша МКК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

⁴«Астана медицина университеті» КеАҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Осы мақалада интраабдоминалдық инфекцияларды емдеу үшін ең жиі қолданылатын антибиотиктерге: метронидазолға, меропенемаға, цiproфлoксацинге және клиндамицинге *Bacteroides fragilis* сезімталдығын зерттеу нәтижелері берілген. MiSeq Illumina платформасында бөлінген штаммдардың толық геномдық секвенирленуі жүргізілді. Антибиотиктерге төзімділік гендерін іздеу CARD антибиотиктеріне тұрақтылық дерекқорының көмегімен жүргізілді. Толық геномдық секвенирлеудің нәтижесінде зерттелген штаммдардың 8,3% - ы *sfIA* және *Mef* гендерін алып жүргені анықталды; штаммдардың 92% - ы *serA* генін алып жүргені анықталды; 58% штаммдар *tetQ* ген және штаммдарының 100% *adeF* гені алып жүргені анықталды.

Түйінді сөздер: *Bacteroides fragilis*, перитонит, антибиотиктерге сезімталдық, төзімділік гендері, микробқа қарсы агенттер.

Введение

Bacteroides fragilis представляет собой один из наиболее важных анаэробных патогенов человека, который часто выделяется при различных клинических инфекциях. В настоящее время, все больше появляется информации о развитии устойчивости у бaктерoидов к широко применяемым антимикробным препаратам [1].

Меропенем (группа препаратов **карбапенемов**) наиболее часто используемый для лечения пациентов с анаэробными инфекциями и сепсисом. Тем не менее, в мире, появляются сведения о проявлении резистентности и к нему. Например, в исследовании, проведенной в Дании, было показано, что 5% исследованных культур *B. Fragilis* были резистентны к меропенему [2]. Аналогично, в мире, регистрируют повышение резистентности к метронидазолу, еще одному препарату, хорошо зарекомендовавшего себя при лечении анаэробных инфекций, вызываемых видами *B. fragilis*. Так, в Пакистане обнаружено увеличение устойчивости к метронидазолу с 12,3% в 2010–2011 годах до 17,5% в 2019 году [3].

Актуальным препаратом при лечении анаэробных инфекции является клиндамицин. К которому, также было показано появление и повышение резистентности у изолятов *B. fragilis*. Так, если в работах одних авторов обнаружено появление до 20% устойчивых изолятов бaктерoидов [4], то в работах других авторов отмечено уже 31,6% таких изолятов [1].

В последнее время внимание исследователей привлечено к изучению детерминант устойчивости у бaктерoидов [5]. У *B. fragilis* были описаны гены, связанные с резистентностью к различным антимикробным препаратам, например, ген *serA*, связанный с устойчивостью к пенициллину, цефалоспорины, ген *ermF* - клиндамицину, ген *nim* - метронидазолу, ген *tetQ* – тетрациклину и т.д. Но больший интерес для исследователей представляет ген *sfIA*, связанный с резистентностью к карбапенемам [6].

Основу современной терапии анаэробных инфекций, вызванных бaктерoидами составляет эмпирическая антимикробная терапия, при которой, в виду отсутствия или ограниченного тестирования на чувствительность к назначаемым антибиотикам, не учитываются локальные данные антибиотикорезистентности потенциальных патогенов.

Цель

Изучить профиль восприимчивости *B. fragilis* к наиболее распространенным антианаэробным препаратам на локальном уровне. Обнаружение генов, связанных с резистентностью к данным антибиотикам.

Материалы и методы

Выделение и идентификация бaктерoидов

12 штаммов *B. fragilis*, исследованные в настоящей работе, были собраны в 2018-2020 гг. из больниц г. Нур-Султан («Городская больница № 1» и «Многопрофильная областная больница № 2»). Все штаммы были клиническими изолятами, высеянные из образцов гноя, отобранных от пациентов с перитонитом.

Информированное согласие и анкеты согласованы с Локальным Этическим комитетом РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК (Выписка из протокола № 4 от 29.08.2017). После получения информированного согласия на участие в исследовании, участнику предложено анкетирование по специально разработанному опроснику. На основании, которого были собраны следующие анкетные данные пациента: возраст, пол, сведения о болезнях желудочно-кишечного тракта, курс и продолжительность лечения антибиотиками широкого спектра. Данные о приеме лекарственных препаратов и их концентрации заполнялись лечащим врачом.

Идентификацию изолятов проводили методом масс-спектрометрии MALDI-TOFMS (BrukerDaltonics, BremenGermany) и методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента 16SrRNA гена с использованием автоматического генетического анализатора 3730xlDNA Analyzer (Applied Biosystems) с последующей идентификацией в GeneBank по алгоритму BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Бактериальную культуру хранили в 30% глицерине при -70°C

Определение чувствительности к антибиотикам

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) антибиотиков (меропенем, метронидазол, клиндамицин) определяли с помощью стрипов-полосок M.I.C. Evaluator (Oxoid, Англия), пропитанных антибиотиком в диапазоне от 256 до 0,015 мкг/мл для метронидазола и от 32 до 0,015 мкг/мл для меропенема, а также с использованием дисков для клиндамицина, с концентрацией антибиотика 2 мкг/мл и 10 мкг/мл. В работе использовали бактериальную суспензию McFarland 1, чашки инкубировали при 37 °C в анаэробной среде в течение 48 часов. Результаты интерпретировали в соответствии с контрольными точками EUCAST MIC для грамотрицательных анаэробов (<http://www.eucast.org/>).

Полногеномное секвенирование

Выделение ДНК проводили стандартным принятым в лабораторной практике методом [7]. Очистку ДНК проводили с помощью набора QIAamp® DNA MiniKit. Концентрацию ДНК измеряли с помощью набора Qubit® dsDNA HS AssayKit (Invitrogen) на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen). Для подготовки геномных библиотек использовали набор реагентов Nextera DNA FlexLibraryPrep (Illumina) согласно инструкции производителя. Для секвенирования на платформе MiSeq Illumina использовали набор MiSeq Reagent Kit v3. Поиск генов резистентности к антибиотикам проводили с помощью базы данных устойчивости к антибиотикам <https://card.mcmaster.ca/home>.

Результаты и обсуждение

За вышеуказанный период нами было получено 12 изолятов *B. fragilis*. Возрастная группа пациентов в среднем составила 40 лет с преобладанием мужчин (58%).

Изучение антибиотикочувствительности B. fragilis

Устойчивость к антимикробным препаратам среди анаэробных бактерий растет во всем мире, и известно, что *B. Fragilis* проявляют более высокую степень устойчивости к антимикробным препаратам по сравнению с другими анаэробными патогенами.

Метронидазол используется клинически для лечения различных анаэробных инфекций, а также для профилактики перед определенными хирургическими процедурами. В настоящей работе среди 12 изолятов группы *B. Fragilis* устойчивость к метронидазолу наблюдалась только у одного штамма, тогда как остальные штаммы проявили к нему чувствительность (средняя MIC=0,5 мкг/мл). Что свидетельствует о более благоприятном прогнозе применения метронидазола в клинической практике на локальном уровне.

Клиндамицин является полусинтетическим лекарственным средством, широко используемым при лечении анаэробных инфекций. Тем не менее, за последние два десятилетия,

в мире отмечено значительное возрастание у бактероидов устойчивости к этому препарату [8]. Хотя, в нашей работе у исследованных штаммов не было отмечено к нему фенотипической резистентности. Все изученные штаммы были чувствительны к клиндамицину (средняя MIC=1,4 мкг/мл).

Актуальным также было изучение устойчивости бактероидов к меропенему, одному из эффективных антианаэробных препаратов, который широко применяется при эмпирической терапии интраабдоминальных инфекций. Установлено, что все изученные штаммы, также, были чувствительны к меропенему (средняя MIC=0,26 мкг/мл).

Таким образом, метронидазол, клиндамицин и меропенем продолжают оставаться эффективными препаратами выбора на локальном уровне при терапии анаэробных инфекций, вызываемых *B. fragilis*.

Выявление генов резистентности, ответственных за устойчивость к антибиотикам

В результате анализа нуклеотидных последовательностей, полученных после полногеномного секвенирования, штаммов *B. fragilis*, с помощью базы CARD, установлено, что по 8,3% изученных штаммов несут гены *cfiA* и *Mef*, первый связан с резистентностью к карбапенемам, а второй с устойчивостью к макролидам. Также показано, что 92% штаммов несут ген *serA*, обуславливающий резистентность к цефалоспорином, 58% штаммов несут ген *tetQ*, связанный с резистентностью к тетрациклинам и у 100% штаммов обнаружен ген *adeF*, связанный с резистентностью к фторхинолонам и тетрациклину. Полученные результаты коррелируют с данными многих исследователей, указывающих на неэффективность применения тетрациклина, фторхинолонов и цефалоспоринов в терапии анаэробных инфекций из-за высокой степени резистентности, наблюдаемой к ним у *Bacteroides spp.*

Кроме того, установлено, что в результате проведенной работы, у фенотипически резистентного к метронидазолу штамма не был обнаружен *nim* ген. Это коррелирует с данными исследователей, которые отмечают, что резистентность к метронидазолу не всегда зависит от наличия *nim* генов, а связана с другими механизмами резистентности [8].

Выводы

1. Большинство исследованных штаммов чувствительны к антибиотикам, широко применяемым в терапии анаэробных инфекций.

2. Метронидазол, клиндамицин и меропенем остаются эффективными препаратами выбора на локальном уровне при терапии анаэробных инфекций, вызываемых видами *B. fragilis*.

3. Выявление генов резистентности, обуславливающих устойчивость к широко применяемым антимикробным препаратам демонстрируют, что они могут быть переданы бактероидами другим чувствительным кишечным штаммам.

Список литературы

1. Vishwanath S., Shenoy P.A., Chawla K. Antimicrobial Resistance Profile and NimGene Detection among *Bacteroides fragilis* Group Isolates in a University Hospital in South India. // *J Glob Infect Dis.* - 2019. - V. 11 (2). - P. 59- 62.
2. Antimicrobial resistance in the *Bacteroides fragilis* group in faecal samples from patients receiving broad-spectrum antibiotics. // Moller Hansen K.C., Schwensen S.A.F., Henriksen D.P., Sydenham T.V. // *Anaerobe.* - 2017. - V. 47. - P. 79-85.
3. Antimicrobial susceptibility against metronidazole and carbapenem in clinical anaerobic isolates from Pakistan. // Shafquat Y., Jabeen K., Farooqi J. et al. // *Antimicrob Resist Infect Control.* - 2019. - V. 8. - P. 99.
4. Majewska M.A., Mlynarczyk G. Trends and Impact in Antimicrobial Resistance Among *Bacteroides* and *Parabacteroides* Species in 2007–2012 Compared to 2013–2017. // *Published Online.* - 2020.
5. Resistance profile of *Bacteroides fragilis* isolated in Brazil. Do they shelter the *cfiA* gene? // Silva e Souza W. das G., Santos Avelar K.E., Caetano L. et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* - 2000. - V. 45 (4). - P. 475–481.
6. The first characterized carbapenem-resistant *Bacteroides fragilis* strain from Croatia and the case study for it. // Maja B., Perić L., Ördög K. et al. // *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica AMicr.* - 2020. - V. 65 (3). - P. 317-323.
7. Rapley R. *The Nucleic Acid Protocol Handbook.* // Humana Press Totowa, NJ. - 2000. - P. 1002.
8. Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes in intestinal *Bacteroidales* strains. // Nakano V., E Silva A. do N., Castillo Merino V. R. et al. // *Clinics.* - 2011. - V. 66 (4). - P. 543-547.

Автор для корреспонденции: Кожухметова С.С. - к.б.н., ЧСРГП «Национальный центр биотехнологии»; эл. почта: SOOralbaeva@mail.ru, 8 (7172) 70 75 16

ВЫСЕВАЕМОСТЬ МЕНИНГОКОККОВ СРЕДИ ДЕТЕЙ ЗА 2015-2019 ГГ., ПО ДАННЫМ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ГОРОДСКОЙ ДЕТСКОЙ ИНФЕКЦИОННОЙ БОЛЬНИЦЫ

Г.С. Волкова¹, М.Т. Алтаева¹, Д.М. Жазыхбаева¹, А.Б. Сейкенова¹, К.Б. Койшебаева², А.К. Балтабаева², Н.Б. Рахметова³

¹ГККП на ПХВ «Многопрофильная городская детская больница №3» акимата г. Нур-Султан, Казахстан

²ГУ «Центральный госпиталь с поликлиникой МВД Республики Казахстан», Нур-Султан, Казахстан

³НАО «Медицинский университет Астана», Нур-Султан, Казахстан

Проблема менингитов среди детей на современном этапе актуальна. В структуре нейроинфекции менингиты среди детей составляют 55-63%. В работе приведены результаты микробиологического мониторинга микробного пейзажа носоглотки, ликвора и крови детей с менингитами. Ведущим возбудителем является *Neisseria meningitidis* (60,7%).

Ключевые слова: менингококки, дети, ликвор, носоглотка, микрофлора крови.

SOWING RATE OF MENINGOCOCCUS AMONG CHILDREN FOR 2015-2019 ACCORDING TO DATE OF THE BACTERIOLOGICAL LABORATORY OF CHILDREN'S INFECTIOUS DISEASES HOSPITAL IN ASTANA CITY

G. Volkova¹, M. Altaeva¹, D. Zhazykbayeva¹, A. Seykenova¹, K. Koyshbaeva², A. Baltabaeva², N. Rachmetova³

¹SSC on the right of EC «Multifunctional city children's hospital N3» Nur-Sultan city, Kazakhstan

²GA «Central Hospital with Polyclinic of the MIA RC» Nur-Sultan city, Kazakhstan

³NcJSC «Astana medical universiti», Nur-Sultan city, Kazakhstan

The problem of meningitis among children at the present stage is relevant. In the structure of neuroinfection, meningitidis among children is 55-63%. The paper presents the results of microbiological monitoring of the microbial landscape of the nasopharynx, cerebrospinal fluid, blood of children with meningitis. Leading pathogen is *Neisseria meningitidis* (60,7%).

Key words: meningococci, children's, swallow, microflora blood.

ҚАЛАЛЫҚ БАЛАЛАР ЖҰҚПАЛЫ АУРУХАНАНЫҢ БАКТЕРИОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТХАНА ДЕРЕКТЕРІ БОЙЫНША 2015-2019 ЖЫЛДАРДА БАЛАЛАР АРАСЫНДА МЕНИНГОКОККТАРДЫҢ БӨЛІНУЫ.

Г.С. Волкова¹, М.Т. Алтаева¹, Д.М. Жазықбаева¹, А.Б. Сейкенова¹, Қ.Б. Қойшыбаева², А.К. Балтабаева², Н.Б. Рахметова³

¹МҚКК «N3 қалалық көпбейінді балалар ауруханасы» Нұр-Сұлтан қаласы әкімдігі, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²ММ «ҚР ІІМ поликлиникасы бар орталық аурухана», Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

³«Астана медицина университеті» КеАҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Қазіргі кезеңде балалар арасында кездесетін менингит мәселесі актуальды болып саналады. Нейроинфекциялардың ішінде балалардағы менингиттер 55-65 пайыз құрайды. Бұл мақалада менингитпен зақымдалған балалардың мұрын жұтқыншақ, ми жұлын сұйығының, қанның микробтық құрамының нәтижесі келтірілді. Негізгі қоздырғыш болып *Neisseria meningitidis* саналады (60,7 пайыз).

Кілт сөздер: менингококктар, балалар, мұрынжұтқыншақ, қан микрофлорасы.

Введение

На сегодняшний день в связи с повсеместной распространенностью и определенными трудностями эпидемиологического контроля не утратили актуальности менингококковые инфекции [1]. Согласно данным ВОЗ, ежегодно в мире регистрируется до 1,2 млн. случаев

инвазивных форм менингококковой инфекций. Наибольшую эпидемиологическую опасность представляют менингококки и энтеровирусы, способные вызывать не только спорадические случаи заболевания, но и крупные вспышки [2]. Поэтому важным параметром эпидемиологического мониторинга за менингитами является определение этиологической структуры с выявлением наиболее значимых этиологических агентов менингита [3]. Установление этиологии в ранние сроки заболевания определяет как выбор рациональной терапии, так и экстренность организации проведения противоэпидемических мероприятий в окружении пациента [4].

Цель

Изучить высеваемость менингококков среди детей, находившихся на лечении в воздушно-капельном отделении ГККП «Городская детская инфекционная больница» (ГДИБ) г. Астаны в 2015-2019 гг.

Материалы и методы

По данным учетно-отчетной документации бактериологической лаборатории, проведен бактериологический анализ 264 образцов крови от 262 детей, 1 823 проб спинномозговой жидкости (СМЖ) от 1 794 лиц и 2 234 мазков из носоглотки от 1 903 пациентов, находившихся на лечении в воздушно-капельном отделении ГККП «Городская детская инфекционная больница» г. Астаны с 2015-2019 гг. При поступлении детей в стационар родителей информировали о необходимости проведения инвазивных методов исследования, в том числе спинномозговой пункции и получили информированное письменное согласие на проведение процедуры. Бактериологическое исследование спинномозговой жидкости, крови и носоглоточной слизи проведены согласно методической разработке и определителю бактерий Берджи [5,6]. Экспресс метод диагностики ликвора проведен с помощью реакции латекс агглютинации PastorexTM Meningitis. Идентификацию выделенных культур проводили с применением полуавтоматического бактериологического анализатора MiCrOAuTOSCAⁿ⁴ (Сименс) и методом профилирования рибосомальных белков с использованием MALDI-TOF время пролетного масс-спектрометрического анализа и программного комплекса Biotyper Bruker. Полученные данные обработаны методом вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

За 2015-2019 гг. нами из спинномозговой жидкости, крови, слизи с носоглотки выделено 211 видов микроорганизмов, из которых 128 (60,7%) культур составили менингококки и 83 (39,3%) другие возбудители. Доля детей до 1 года составила 17,9% (23 ребенка), от 1-5 лет 53,1% (68 лиц), старше 5 лет 28,9% (37 детей). Среди обследуемых детей 93 мальчика (72,6%), и 35 девочек (27,3%) с диагнозами: менингококкцемия 39,8% (51 ребенок), менингит 45,3% (58 лиц), менингококковая инфекция 14,8% (19 детей).

В течение пяти лет исследовано 264 гемокультур от 262 лиц, у 60 детей (22,9%) выделены менингококки (таблица 1).

Таблица 1 - Частота высеваемости менингококков из крови детей отделения воздушно-капельной инфекции ГККП «ГДИБ» г. Астаны в 2015-2019 гг. (М±m).

Годы	Всего образцов крови/Всего детей		Из них положит. образцы крови/ Всего детей (положит. кровь)	
	абс. кол-во	%	абс. кол-во	%
2015	170/170	64,4±2,9/64,9±2,9	57/56	33,5±3,6/32,9±3,6
2016	53/53	20,1±2,5/20,2±2,5	3/3	5,7±3,2/5,7±3,2
2017	31/29	11,7±1,9/11,1±1,9	2/1	6,45±4,4/3,4±3,3
2018	5/5	1,9±0,8/1,9±0,8	0	0
2019	5/5	1,9±0,8/1,9±0,8	0	0
Всего	264/262	100/100	62/60	23,5±2,6/22,9±2,6

Обращает на себя внимание тот факт, что максимальный удельный вес положительных находок менингококков из крови приходится на 2015 г. (32,9%). В 2016-2017 гг. в сравнении с 2015 г. в 5,7-9,6 раза сократился удельный вес положительных находок возбудителей менингококкцемии, однократно в 2015-2017 гг. из крови изолированы *Streptococcus pneumoniae*

и *Streptococcus pyogenes* в 0,6%-3,2% случаев соответственно. В 2018-2019 гг. микроорганизмы в крови не регистрировались. Полученные данные свидетельствуют о сокращении в динамике удельного веса бактериальных агентов менингококковой природы, ответственных за развитие генерализованных форм менингококковой инфекции.

За пятилетний период изучено 1 823 образцов спинномозговой жидкости (СМЖ) от 1 794 детей, у 20 лиц (1,1%) обнаружены менингококки (таблица 2).

Таблица 2 - Частота высеваемости менингококков из спинномозговой жидкости детей отделения воздушно-капельной инфекции ГККП «ГДИБ» г. Астаны в 2015-2019 гг. ($M \pm m$).

Годы	Всего образцов смж/Всего детей		Из них положит. образцы смж/Всего лиц (положит. СМЖ)	
	абс. кол-во	%	абс. кол-во	%
2015	301/299	16,50,9/16,7 $\pm$ 0,9	11/9	3,61,1/3,0 $\pm$ 0,9
2016	201/194	110,7/10,8 $\pm$ 0,7	6/4	2,9 $\pm$ 1,2/2,1 $\pm$ 1,02
2017	320/319	17,5 $\pm$ 0,9/17,8 $\pm$ 0,9	8/3	2,5 $\pm$ 0,9/0,9 $\pm$ 0,5
2018	353/336	19,4 $\pm$ 0,9/18,7 $\pm$ 0,9	5/2	1,4 $\pm$ 0,6/0,6 $\pm$ 0,4
2019	648/646	35,5 $\pm$ 1,1/36 $\pm$ 1,1	5/2	0,8 $\pm$ 0,3/0,3 $\pm$ 0,2*
Всего	1823/1794	100/100	35/20	1,9 $\pm$ 0,3/1,1 $\pm$ 0,2

Примечание: * $p < 0,01$ в сравнении с 2015 г.

Из таблицы 2 следует, что наибольший удельный вес положительных находок менингококков из СМЖ выявлен в 2015-2016 гг. (3,0%-2,1%). В последующие годы в сравнении с 2015-2016 гг. наблюдается снижение высеваемости менингококков в 3-10 раз (2017 г. до 0,9% случаев, 2018-2019 гг. до 0,6-0,3% соответственно). Уменьшение в динамике высеваемости менингококков является характерным для межэпидемического периода менингитов и соответствуют определению З.И. Сулейменовой [7], что острые менингиты-заболевания, характеризующиеся периодами подъема и спада. Одновременно в 2015-2016 гг. и в 2018-2019 гг. определялись *Streptococcus pneumoniae* (1%-0,3% соответственно). В 2017 г. из СМЖ в 0,3% случаев выделен *Streptococcus pyogenes*. В 2017 г. и в 2019 г. определялся *Staphylococcus aureus* (0,6% и 0,15% соответственно) В 2017-2018 гг. из СМЖ редко высевались *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis* и НГОВ (0,3%). Из общего числа расшифрованных случаев генерализованных форм менингитов 37,9% (80 случаев из 211) составляют менингококки, далее по частоте выделения следовали пневмококки - 3,8% (8 случаев из 211). В группе «прочих» микроорганизмов преобладали золотистые стафилококки - 1,4% (3 случая из 211), доля других возбудителей составила 2,4%.

В течение пяти лет исследовано 2 234 проб носоглоточной слизи от 1 903 ребенка, из числа которых 48(2,5%) оказались положительными на менингококк (таблица 3).

Таблица 3 - Частота высеваемости менингококков из носоглотки детей отделения воздушно-капельной инфекции ГККП «ГДИБ» г. Астаны в 2015-2019 гг. ($M \pm m$).

Годы	Всего проб из носоглотки/Всего детей		Из них положит. пробы из носоглотки/Всего детей (положит.)	
	абс. кол-во	%	абс. кол-во	%
2015	643/375	28,8 $\pm$ 0,9/19,7 $\pm$ 0,9	57/38	8,8 $\pm$ 1,1/10,1 $\pm$ 1,5
2016	309/257	13,8 $\pm$ 0,7/13,5 $\pm$ 0,7	19/9	6,1 $\pm$ 1,4/3,5 $\pm$ 1,1*
2017	306/300	13,7 $\pm$ 0,7/15,8 $\pm$ 0,8	20/0	6,5 $\pm$ 1,4/0
2018	317/313	14,2 $\pm$ 0,7/16,4 $\pm$ 0,8	6/0	1,9 $\pm$ 0,9/0
2019	659/658	29,5 $\pm$ 0,9/34,6 $\pm$ 1,1	12/1	1,8 $\pm$ 0,5/0,15 $\pm$ 0,14
Всего	2234/1903	100/100	114/48	5,1 $\pm$ 0,4/2,5 $\pm$ 0,3

Примечание: * $p < 0,001$ в сравнении с 2015 г.

Из таблицы 3 видно, что за исследуемый период из носоглотки в 2015-2016 гг. в 10,1% - 3,5% случаев обнаруживались менингококки с последующим прекращением их регистрации в динамике. В то же время обращает на себя факт высеваемости из носоглотки других возбудителей, таких как *Streptococcus pneumoniae* 21 случай (1,1%), *Staphylococcus aureus* 34 (1,8%), *Streptococcus pyogenes* 6 (0,3%), *Candida albicans* 3 (0,15%) и однократно *Streptococcus*

mitis и *НГОВ* (0,05%). Среди прочих возбудителей назофарингитов преобладал *Streptococcus pneumoniae* на его долю приходится в 2015 г. 2,13%, в 2017 г. 2%, в последующие годы высеваемость пневмококков сократилась до 0,3-0,8% находок от общего числа выделенных микроорганизмов. Далее следует *Staphylococcus aureus* на его долю приходится в 2015-2016 гг. (1-2,8%), в 2017- 2018 гг. (4-1,6%), в 2019 г. - 0,9%. Из носоглотки в 2015 г. в 1,6% случаев высевался *Streptococcus pyogenes*. В 2015-2016 гг. и в 2019 г. редко определялась *Candida albicans* (0,15-1,3%). Из общего числа исследованных мазков из носоглотки 22,8% (48 случаев из 211) составляют менингококки, 16,1% (34 случая из 211) - золотистые стафилококки, 9,9% (21 случай из 211) - пневмококки. Высеваемость других возбудителей осталось на уровне 5,7%.

При серогрупповом типировании выделенные 128 штаммов нейссерий были объединены в четыре серогруппы с преобладанием в 2015-2016 гг. серовара «А» - 73,4%, ответственного за развитие генерализованных форм менингококковой инфекций, серовара «В» - 15,6%, серовара «С» - 4%. В 2017-2019 гг. менингококки серогруппы «А» не выявлены, доля менингококков серогрупп «В» и «С» составило - 1,6%, на другие серологические варианты, в частности серогруппу W135 приходилось 3,9%, на не типизируемые - 0,8% от числа всех выделенных культур.

Анализ антибиотикорезистентности выделенных культур менингококков показал высокую активность к антибиотикам цефалоспоринового ряда, бензилпенициллину, хлорамфениколу, макролидам, триметоприму, фторхинолонам (более 90%) чувствительных штаммов.

Выводы

На основании полученных данных о динамике высеваемости менингококков среди детей из различных биотопов можно сделать следующие выводы:

1. В этиологической структуре менингитов среди детей по данным бактериологической лаборатории ГККП «ГДИБ» г. Астаны в 2015-2019 гг. доминируют менингококки (60,6%), серогруппы «А» (73,4%) от общего числа выделенных микроорганизмов. Большинство находок выявлено в группе детей от 1-5 лет (53,1%) мужского пола (72,6%). Наибольшая частота высеваемости менингококков имело место в 2015 г., что совпало с подъемом заболеваемости менингококковой инфекцией.

2. За пять лет общий процент высеваемости этиологически значимых возбудителей генерализованных форм менингитов составляет 25%. В динамике высеваемость менингококка из крови снизилась с 32,9% в 2015 г. до 3,4% в 2017 г., из ликвора высеваемость снизилась с 3,0%-2,1% в 2015-2016 гг. до 0,3% в 2019 г. Из общего числа расшифрованных случаев менингококкцемии и бактериальных менингитов 37,9% составляют менингококки, 3,8%-пневмококки, 1,4% золотистый стафилококк, а доля других возбудителей составила 2,4%.

3. За исследуемый период из носоглотки наблюдается сокращение высеваемости нейссерий с 10,1%-3,5% случаев в 2015-2016 гг. до 0,15% случаев в 2019 г. Из общего числа исследованных случаев назофарингитов менингококки составили 22,8%, золотистые стафилококки 16,1%, пневмококки - 9,9%. Высеваемость других возбудителей осталось на уровне 5,7%.

4. Наиболее активными препаратами в отношении *Neisseria meningitidis* являются антибиотики цефалоспоринового ряда, бензилпенициллин, хлорамфеникол, макролиды, триметоприм, фторхинолоны (более 90%) чувствительных штаммов.

5. Повсеместное распространение менингококков, а также вовлечение в эпидемиологический процесс детей раннего возраста диктует необходимость проведения постоянного локального микробиологического мониторинга за возбудителями менингитов и дальнейшего совершенствования методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний.

Список литературы

1. Проблема менингококковых инфекций у детей. Пути решения./ Ратищев А.Ю., Шамшева О.В. и др.//Детские инфекции. - 2009. - № 3. - С. 31-35.

2. Клинико-эпидемиологические особенности гнойных менингитов у детей на современном этапе./Катарбаев А.К., Урикбаева З.Ж. и др. //Вестник КазНМУ. - 2017. - Т. 3. - С. 58-60.
 3. Королева Г.В., Белошицкий Г.В. Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в РФ: десятилетнее эпидемиологическое наблюдение //Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2013. - № 2. - С. 15-20.
 4. The clinical diagnostic significance of cerebrospinal fluid D-lactate for bacterial meningitides/Chen Z., Wang Y., Zend F. et al.//Clinica chimica. Acta. - 2012. - Vol. 413, №19-20. - P. 1512-1515.doc: 10.106/j.cca.2012.06.018.
 5. «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных менингитов» № 288 от 15.12.2015 г.: Методическое руководство.
 6. Bergey S. Manual of Determinatif Systematic Bacteriology // 9-th edition/- Baltimore Williams A. & Wilkina.- 1997. (Определитель бактерий Берджи) Т 1-2. - М.: Мир, 1997. - 365 с.
 7. Острые менингиты: этиология, клиническое течение./ Сулейменова З.И. Ергалиева А.А. и др.//Вестник КазНМУ. - 2013. - Т. 4 (1). - С. 31-33.
- Автор для корреспонденции:** Волкова Г.С. - Заведующая бактериологической лаборатории ГККП на ПХВ «МГДБ № 3» акимата г. Нур-Султан; эл. почта: glavnii_microb@mail.ru, 8 701 530 15 88.

МРНТИ 76.03.43

10-ЛЕТНИЙ МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В ОТДЕЛЕНИИ ДЕТСКОЙ КАРДИОХИРУРГИИ

Н.М. Бисенова, А.С. Ергалиева

АО «Национальный научный медицинский центр», Нур-Султан, Казахстан

Определен микробный пейзаж и антимикробная резистентность часто встречающихся патогенов в отделении детской кардиохирургии в период с 2010 по 2019 годы. За исследуемый период часто встречающимися патогенами были: *Pseudomonas aeruginosa* – 19,7%, *Klebsiella pneumoniae* – 16%, *Staphylococcus aureus* – 13,2%, коагулазоотрицательные стафилококки – 9,2%, *Acinetobacter baumannii* – 8,8%. Данные штаммы показывают тенденцию достоверного увеличения резистентности к цефалоспорином III поколения, карбапенемам, хинолонам и аминогликозидам. Высокий уровень резистентности с нарастающей динамикой штаммов *Ps. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii* в отделении детской кардиохирургии побуждает необходимость создания хорошо разработанной стратегии инфекционного контроля, включающую правильную гигиену медицинского персонала, микробиологический мониторинг и внутрибольничный контроль, что позволит снизить риск возникновения нозокомиальных инфекций.

Ключевые слова: антимикробная резистентность, отделение детской кардиохирургии, микробиологический мониторинг, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

MONITORING OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN PEDIATRIC CARDIAC SURGERY: 10-YAERS EXPERIENCE

N. Bissenova, A. Yergaliyeva

JSC National Scientific Medical Research Center, Nur-Sultan city, Kazakhstan

A retrospective study of antibiotic resistance rate of most frequently pathogens in pediatric cardiac surgery during the period 2010-2019. The percentages of most frequently isolated microorganisms in our Pediatric Cardiac Surgery Department were as follows: *Pseudomonas aeruginosa* 19,7%, *Klebsiella pneumoniae* 16%, *Staphylococcus aureus* 13,2%, coagulase negative staphylococci 9,2%, and *Acinetobacter baumannii* 8,8%. These isolates showed tendency of significant increasing resistance to 3rd generation cephalosporins, carbapenems, quinolones and aminoglycosides. Reporting of dramatically increasing resistance rates of these isolates necessitates a well-designed hospital infection control strategy, including good hygiene, microbiological monitoring, all of this will greatly reduce the risk of nosocomial infection.

Keywords: antimicrobial resistance, pediatric cardiac surgery, microbiological monitoring, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

БАЛАЛАР КАРДИОХИРУРГИЯЛЫҚ БӨЛІМІНДЕГІ 10 ЖЫЛДЫҢ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ТҰРАҚТЫЛЫҒЫ

Н.М. Бисенова, А.С. Ергалиева

«Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Балалар кардиохирургиялық бөліміндегі науқастар арасындағы ауруханаішілік патогендердің спектрін анықталды, жиі кездесетін патогендердің антибактериалдық препенеттарға тұрақтылық деңгейін түйіндеді, олардың жан-жақты таралуының алдын алды. Ең жиі кездесетін *Pseudomonas aeruginosa* – 19,7%, *Klebsiella*

pneumoniae – 16%, *Staphylococcus aureus* – 13,2%, *Acinetobacter baumannii* – 8,8% дақылды бөлінді. Осы дақылдар 3 - ші буын цефалоспориндеріне, карбапенемдерге, хинолондарға және аминогликозидтерге жоғары тұрақтылық көрсетті. Балалар кардиохирургиялық бөлімдерінде антибиотикке тұрақты дақылдардың пайда болуын және таралуын болдырмау мақсатында әрбір жеке емдеу мекемелерінде микробиологиялық бақылау және антибактериалдық препараттарды қолдануда оңтайландыру әдістерін жүргізу қатаң түрде ұсынылады. Сондықтан тұрақтылықты бақылау бағдарламасы науқастарды тиімді емдеу ұсынымдарын әзірлеуде аса құнды болып табылады.

Кілт сөздер: антибиотик тұрақтылығы, балалар кардиохирургиялық жансақтау бөлімі, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, микробиологиялық мониторинг.

Введение

Постоперативные хирургические инфекции являются основной причиной постоперативного заболевания и смертности в кардиохирургии [1,2]. В то время как хирургические инфекции в послеоперативном периоде у пациентов взрослой кардиохирургии достаточно хорошо охарактеризованы и изучены [3-5], в детской кардиохирургии классификация, профилактика и лечение менее изучены, а также существует значительная вариация практики [6-8]. Пациенты с операциями по детской кардиохирургии (врожденные пороки сердца и пороки сердца, которые ребенок получает после рождения) подвергаются высокому риску бактериальных инфекций.

Как известно, дети имеют относительно слабо развитую иммунную систему, поэтому имеется высокий риск развития нозокомиальных инфекций, особенно когда существует необходимость длительного пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии, оперативных вмешательств и инвазивных процедурах [9-11].

Бактериальные инфекции являются основной причиной заболеваемости и смертности в детской кардиохирургии [12]. Дети более подвержены к инфицированию, чем взрослые пациенты, особенно в первые два года жизни. Идентификация и антимикробная резистентность штаммов в отделениях детской кардиохирургии важно для предотвращения дальнейшего их распространения, в виду ограниченного выбора используемых антибиотиков в данном отделении. Одним из факторов развития госпитальных инфекций является антибактериальная терапия. Длительное и не всегда обоснованное использование антибиотиков резерва в качестве эмпирической терапии приводит к селекции вирулентных нозокомиальных штаммов. Например, часто встречающимися патогенами инфекций кровотока являются *Klebsiella pneumoniae*, коагулазоотрицательные стафилококки и *Pseudomonas aeruginosa*. Возбудители внутрибольничных инфекций респираторного тракта нижних дыхательных путей – *Ps. aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* [13].

Все выше перечисленное подтверждает необходимость строго соблюдения мониторинга за резистентностью к антибиотикам штаммов в отделении детской кардиохирургии.

Цель

Определить микробный пейзаж и спектр антибиотикорезистентности часто встречающихся штаммов в отделении детской кардиохирургии в период 2010-2019 годы.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено ретроспективное микробиологическое исследование микробного пейзажа и антибиотикочувствительность штаммов, выделенных от пациентов детской кардиохирургии после проведения кардиохирургических операций (операции на сердце и крупных сосудах) в период с 2010 по 2019 годы. Все пациенты, поступающие на плановое оперативное лечение в АО «ННМЦ», подписывают информированное согласие в соответствии с протоколами диагностики и лечения.

Сбор исследуемого материала

Исследованию подвергался респираторный тракт (мазок из зева и мокрота), кровь на стерильность, жидкость из плевральной полости, содержимое катетера из трахеобронхиального дерева, интубационная трубка, раневое отделяемое, ЦВК, содержимое аспирационного

катетера, трахеостома. Весь клинический материал собирался и транспортировался в микробиологическую лабораторию согласно методическим рекомендациям [14].

Культивирование образцов

Количественный анализ исследуемого материала проводили с использованием питательных сред (кровяной агар, среда Эндо, желточно-солевой агар, Candida агар, Калина агар, шоколадный агар). Посевы культивировали 24 часа при 37°C, чашки с Candida агар культивировали 5 суток при 22°C.

Идентификация изолятов

Согласно методическим рекомендациям, для идентификации изолятов изучались морфологические свойства, окраску по Граму, оксидазный и каталазный тесты, тест на плазмокоагулазу, желчный тест, тест на индолаобразование. Заключительная идентификация выделенных чистых культур микроорганизмов проводилась на микробиологическом анализаторе «Vitek 2 – Compact» (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

Исследование антибиотикочувствительности

Антимикробная активность была исследована к амоксициллин/клавуланату, цефтазидиму, цефтриаксону, цефепиму, меропенему, имипенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, гентамицину, амикацину, тобрамицину методом МИК («Vitek 2 – Compact»).

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью Microsoft Excel, определяли среднюю величину, ошибку средней, динамические изменения определяли методом линейной регрессии. Различия средних значений считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

За исследуемый период с января 2010 по декабрь 2019 получено 2 816 штаммов из 2963 клинических образцов. Наибольшее количество штаммов было выделено из респираторного тракта 51,6% (1 530), далее содержимое катетера из трахеобронхиального дерева 24,3% (721), раневое отделяемое 8% (240) инфекции кровотока 5,4% (161), ЦВК 3,7% (112). Грамположительные кокки составили 27,3% (769) штаммов, грамотрицательные палочки 59,4% (1 673) и дрожжеподобные грибы рода *Candida* 9% (253).

В отделении детской кардиохирургии чаще других высевались: *Ps. aeruginosa* 19,7%, *K. pneumoniae* 16%, и *S. aureus* 13,2%, *A. baumannii* 8,8%. За исследуемый период процент положительных гемокультур увеличился с 1,5% to 22,3% со средним значением 18,8%. Из данных образцов в 19,2% случаях обнаруживалась *K. pneumoniae* и в 16,7% *Burkholderia cepacia* (таблица 1).

Таблица 1 - Микробный пейзаж выделенных культур микроорганизмов отделения детской кардиохирургии за 2010-2019 гг.

Вид микроорганизма	Инфекции и кровотока	ТБД	Респираторный тракт	Раневое отделяемое	ЦВК	ИМП	Другое ¹	Всего
	п (%)	п (%)	п (%)	п (%)	п (%)	п (%)	п (%)	п (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (3,7)	32 (4,4)	300 (19,6)	25 (10,4)	6 (5,3)	0	3 (13,6)	372 (13,2)
KOC ²	25 (15,5)	100 (14,4)	0	88 (36,6)	40 (35,7)	2 (2,6)	0	259 (9,2)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2 (1,2)	30 (4,1)	61 (3,9)	24 (10)	8 (7,1)	7 (23,3)	6 (27,2)	138 (4,9)
<i>Escherichia coli</i>	1 (0,6)	28 (3,8)	129 (8,4)	11 (4,5)	0	4 (13,3)	2 (9)	175 (6,2)
<i>Enterobacter cloacae</i>	5 (3,1)	18 (2,4)	64 (3,5)	8 (3,3)	7 (6,2)	0	0	92 (3,3)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31 (19,2)	107 (14,8)	275 (17,9)	12 (5)	16 (14,2)	5 (16,6)	5 (22,7)	451 (16)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 (9,9)	176 (24,4)	321 (20,9)	27 (11,2)	11 (9,8)	1 (3,3)	2 (9)	554 (19,7)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12 (7,4)	91 (12,6)	123 (8)	17 (7)	4 (3,5)	1 (3,3)	0	248 (8,8)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8 (4,9)	55 (7,6)	31 (2)	4 (1,6)	3 (2,6)	0	2 (9)	103 (3,7)
<i>Burkholderia</i>	27 (16,7)	13 (1,8)	3 (0,9)	3 (1,2)	4 (3,5)			

серасия						0	0	50 (1,8)
Candida albicans	25 (15,5)	49 (6,7)	153 (10)	8 (3,3)	8 (7,1)	8 (26,6)	2 (9)	253 (9)
Другие	3 (1,8)	18 (2,4)	80 (5,2)	13 (5,4)	5 (4,4)	2 (6,6)	0	121 (4,3)
Всего	161	721	1530	240	112	30	22	2816
Примечание: ¹ жидкость из плевральной полости, содержимое аспирационного катетера, трахеостома КОС - коагулазоотрицательные стафилококки ТБД – трахеобронхиальное дерево ЦВК – центральный венозный катетер								

В образцах, полученных с содержимого катетера из трахеобронхиального дерева на первом месте по частоте встречаемости находились *Ps. aeruginosa* (24,4%) и *K. pneumoniae* (14,8%). В раневом отделяемом и ЦВК чаще других обнаруживались коагулазоотрицательные стафилококки (36,6% и 35,7% соответственно); в респираторном тракте более 20% всех выделенных штаммов относились к синегнойной палочке, на втором месте по частоте высеваемости *S. aureus* 19,6%.

За исследуемый период выявлена тенденция увеличения процента обнаружения штаммов *Ps. aeruginosa* с 16,1% до 30,2% ($p=0,048$), *K. pneumoniae* с 7,5% до 19,3% ($p=0,014$), *A.baumannii* с 3,2% до 13,6% ($p=0,059$). В тоже время отмечается снижение частоты выделения *Enterococcus faecalis* с 8,6% в 2010 году до 1,9% в 2019 году ($p=0,007$) и *Candida albicans* с 10,7% до 6,6% ($p=0,002$) соответственно.

Достоверно значимое увеличение высеваемости было определено у синегнойной палочки, штаммов *K. pneumoniae* и *A. baumannii*, которые являются частыми возбудителями нозокомиальных инфекций, поэтому уровень антибиоткорезистентности определяли к данным видам изолятов. В динамике выявлена тенденция увеличения резистентности штаммов *Ps. aeruginosa* к антисинегнойным цефалоспорином (к цефтазидиму с 26,6% до 76,7% $p=0,001$, к цефепиму с 13,3% до 81,1% $p=0,001$), к аминогликозидам (к гентамицину с 6,6% до 63,5% $p=0,0001$, к амикацину с 0% до 64,1% $p=0,002$), а также к карбапенемам (к меропенему с 0% до 67,9% $p=0,0001$ и имипенему с 6,6% до 66,6%) (таблица 2).

Таблица 2 - Антимикробная резистентность штаммов *Pseudomonas aeruginosa* выделенных в отделении детской кардиохирургии за 2010-2019 гг.

Антибиотик	2010 n=15	2011 n=21	2012 n=8	2013 n=12	2014 n=78	2015 n=89	2016 n=69	2017 n=38	2018 n=65	2019 n=159	p- value*
Цефтазидим	4 (26,6)	6 (28,5)	1 (12,5)	1 (8,3)	31 (39,7)	63 (70,7)	46 (66,6)	23 (60,5)	55 (84,6)	122 (76,7)	0,001
Цефепим	2 (13,3)	10 (47,6)	2 (25)	3 (25)	22 (28,2)	49 (55)	50 (72,4)	21 (55,2)	57 (87,6)	129 (81,1)	0,001
Меропенем	0	0	1 (12,5)	3 (25)	29 (31,1)	50 (56,1)	52 (75,3)	26 (68,4)	58 (89,2)	108 (67,9)	0,000
Имипенем	1 (6,6)	1 (4,7)	2 (25)	4 (33,3)	32 (41)	53 (59,5)	53 (76,8)	27 (71)	58 (89,2)	106 (66,6)	0,000
Аикацин	0	6 (28,5)	1 (12,5)	1 (8,3)	14 (17,9)	56 (62,9)	57 (82,6)	23 (60,5)	56 (86,1)	102 (64,1)	0,002
Гентамицин	1 (6,6)	6 (28,5)	1 (12,5)	1 (8,3)	19 (24,3)	47 (52,8)	47 (68,1)	25 (65,7)	57 (87,6)	101 (63,5)	0,000
Ципрофлоксацин	3 (20)	1 (4,7)	1 (12,5)	1 (8,3)	8 (10,2)	15 (16,8)	43 (62,3)	22 (57,8)	56 (86,1)	104 (65,4)	0,002
Левифлоксацин	3 (20)	2 (9,5)	0	1 (8,3)	22 (28,2)	14 (15,7)	43 (62,3)	24 (63,1)	53 (81,5)	103 (64,7)	0,001
Примечание: * Линейная регрессия											

Выделенные штаммы *K. pneumoniae* показали высокий уровень резистентности к цефалоспорином III поколения, а также динамику увеличения (к цефепиму с 28,5% до 78,4% $p=0,0001$ и цефтазидиму с 35,7% до 76,4% $p=0,0001$), достоверное увеличение резистентности выделенные штаммы проявляли и к аминогликозидам (к амикацину с 7,7% до 14,7%, к гентамицину с 7,1% до 65,6%). У штаммов *K. pneumoniae* в отношении хинолонов достоверно значимая тенденция резистентности не доказана. (таблица 3).

Таблица 3 - Антимикробная резистентность штаммов *Klebsiella pneumoniae* выделенных в отделении детской кардиохирургии за 2010-2019 гг.

Антибиотик	2011 n=14	2012 n=12	2013 n=21	2014 n=61	2015 n=88	2016 n=63	2017 n=39	2018 n=44	2019 n=102	p-value*
Амоксициллин /клавуланат	7 (50)	5 (41,6)	9 (42,8)	39 (63,9)	52 (59)	53 (84,1)	35 (89,7)	37 (84)	88 (86,2)	0,001
Цефтазидим	5 (35,7)	4 (33,3)	10 (47,6)	37 (60,6)	63 (71,5)	39 (61,9)	32 (82)	30 (68,1)	78 (76,4)	0,000
Цетриаксон	5 (35,7)	5 (41,6)	12 (57,1)	44 (72,1)	66 (75)	54 (85,7)	32 (82)	29 (65,9)	81 (79,4)	0,011
Цефепим	4 (28,5)	4 (33,3)	11 (52,3)	36 (59)	65 (73,8)	44 (69,8)	31 (79,4)	29 (65,9)	80 (78,4)	0,000
Меропенем	0	0	0	1 (1,6)	2 (2,2)	0	1 (2,5)	1 (2,2)	0	0,172
Амикацин	1 (7,1)	1 (8,3)	2 (9,5)	4 (6,5)	8 (9)	7 (11,1)	5 (12,8)	6 (13,6)	15 (14,7)	0,000
Гентамицин	1 (7,1)	1 (8,3)	11 (52,3)	18 (29,5)	38 (43,1)	29 (46)	23 (58,9)	27 (61,3)	67 (65,6)	0,002
Ципрофлоксацин	2 (14,2)	2 (16,6)	7 (33,3)	18 (29,5)	18 (20,4)	16 (25,3)	11 (28,2)	11 (25)	30 (29,4)	0,364
Левифлоксацин	2 (14,2)	2 (16,6)	6 (28,5)	19 (31,1)	16 (18,1)	14 (22,2)	9 (23)	9 (20,4)	20 (19,6)	0,734

Примечание: * Линейная регрессия

Уровень антибиотикорезистентности штаммов *A. baumannii* отражена в таблице 4. Статистически значимая динамика увеличения резистентности отмечается к карбапенемам, хинолонам а аминогликозидам, за исследуемый период не обнаружено резистентности к колистину.

Таблица 4 - Антимикробная резистентность штаммов *Acinetobacter baumannii* выделенных в отделении детской кардиохирургии.

Антибиотик	2011 n=13	2014 n=39	2015 n=89	2016 n=69	2017 n=38	2018 n=65	2019 n=159	p-value*
Меропенем	0	11 (28,2)	7 (33,3)	9 (34,6)	15 (39,4)	11 (42,3)	45 (62,5)	0,003
Имипенем	0	10 (25,6)	9 (42,8)	10 (38,4)	16 (42,1)	11 (42,3)	46 (63,8)	0,008
Амикацин	0	11 (28,2)	7 (33,3)	9 (34,6)	14 (36,8)	10 (38,4)	34 (47,2)	0,014
Гентамицин	0	4 (10,2)	3 (14,2)	8 (30,7)	14 (36,8)	9 (34,6)	30 (41,6)	0,000
Тобрамицин	0	0	0	2 (7,6)	4 (10,5)	5 (19,2)	22 (30,5)	0,009
Ципрофлоксацин	0	12 (30,7)	7 (33,3)	11 (42,3)	15 (39,4)	12 (46,1)	47 (65,2)	0,004
Левифлоксацин	0	11 (28,2)	8 (38)	9 (34,6)	13 (34,2)	11 (42,3)	48 (66,6)	0,009

Примечание: * Линейная регрессия

Результаты и обсуждение

Изучение бактериальных инфекций в детской кардиохирургии необходимо для определения распространенных патогенных микроорганизмов, а также уровня резистентности для лучшего использования эффективных антибиотиков. Штаммы микроорганизмов, которые влияют на возникновение различных инфекций варьируемы в каждом отдельном лечебном учреждении. Например, в нашем исследовании наиболее распространенными инфекциями в отделении детской кардиохирургии были – инфекции дыхательных путей (54,3%), раневые инфекции (8,5%) и инфекции кровотока (5,7%); наименьшее количество инфекций было связано с использованием ЦВК и уретрального катетера. Результаты других аналогичных исследований указывают на респираторные инфекции и инфекции уретрального тракта [15,16].

Многие авторы в исследованиях микробного спектра в отделениях детской кардиохирургии определили частоту высеваемости следующих микроорганизмы: коагулатоотрицательные стафилококки, далее *K. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa* и *S. aureus* [17,18]. Результаты нашего исследования показывают, что наиболее часто высевались штаммы *Ps. aeruginosa* (19,7%), затем *K. pneumoniae* (16%) и штаммы *S. aureus* (13,2%). Более того, мы отмечаем достоверное увеличение частоты обнаружения данных изолятов, что может являться предиктором этиологического возникновения нозокомиальных инфекций: *Ps. aeruginosa* 16,1%

до 30,2% ($p=0,048$), *K. pneumoniae* с 7,5% до 19,3% ($p=0,014$), *A. baumannii* с 3,2% до 13,6% ($p=0,059$). В аналогичном исследовании, проведенным Bo-Tao Ning et al. [19] часто встречающимися патогенами были штаммы *Acinetobacter baumannii* (25,6%), *Escherichia coli* (20,2%), *S. maltophilia* (20,2%), *K. pneumoniae* (16,2%) и *Ps. aeruginosa* (9,4%).

Некоторые авторы при исследовании инфекций кровотока у детей, после проведения оперативных вмешательств, отмечают что чаще других обнаруживались коагулоазотрицательные стафилококки (24%), *K.pneumoniae* (16%), *Candida sp.* (15%), *Ps. aeruginosa* (7%) и *S. aureus* (6%) [17]. Результаты нашего исследования совпадают с данными других авторов [20,21]. Частота бактериемии в нашем отделении составляет 18,8%, основным патогеном являлись штаммы *K. pneumoniae* (19,2%).

Высокий процент выявления изолятов *Candida sp.* в инфекциях кровотока в детских стационарах отмечают многие авторы: M.R. Vecerra et al. [6] отмечает что кандидемия обнаруживалась у 41% пациентов, в другом исследовании [7] авторы указывают цифру в 30,2% случаях. Факторами риска возникновения кандидемии являются предыдущая колонизация, длительное пребывание в отделении реанимации, наличие у пациентов инвазивных устройств, парентеральное питание, тяжесть заболевания и длительное использование антибиотиков [22]. Все это подтверждается высокой распространенности штаммов *Candida sp.* в нашем исследовании, частота обнаружения составляет 15,5% случаев. Проблема распространения кандидемии имеет важное значение, поскольку связано с высокой смертностью как у взрослых пациентов с сопутствующими заболеваниями [23] и особенно у детей [24].

Трахеобронхиальное дерево и ротоглотка пациентов отделения детской кардиохирургии, находящихся на искусственной вентиляции легких чаще других контаминированы микроорганизмами, однако, связь между колонизацией и легочной инфекцией недостаточно изучены [25]. Грамотрицательные бактерии, в частности *Ps. aeruginosa* является самым распространенным патогеном, колонизирующим трахеобронхиальное дерево [26]. Результаты нашего исследования совпадают с имеющимися данными, штаммы синегнойной палочки составляют 24,4% от всех выделенных микроорганизмов в данном биотопе.

Имеющиеся многочисленные клинические исследования возрастающей резистентности штаммов *Ps. aeruginosa* в отделениях детской кардиохирургии подтверждают факт возникновения нозокомиальных инфекций [27,28]. Эффективное лечение часто встречающихся патогенов имеет первостепенное значение для предотвращения развития резистентности ко многим лекарственным средствам. Wang LG с соав. при исследовании резистентности 126 штаммов *Ps. aeruginosa* более 50% были карбапенемостойчивы, а резистентность к цефтазидиму составила 33,3% [29]. Данные нашего исследования в динамике показывают нарастающую резистентность выделенных штаммов *Ps. aeruginosa* к карбапенемам, антисинегнойным цефалоспорином и аминогликозидам. В частности, резистентность к меропенему возросла с 0% в 2010 году до 67,9% в 2019 году ($p=0,0001$), к цефтазидиму с 26,6% до 76,6% ($p=0,001$), к гентамицину с 6,6% до 63,5% ($p=0,0001$) соответственно. Однако в 2018 году зафиксирована наибольшая резистентность к меропенему и имипенему - 89,2%, к цефтазидиму - 84,6%.

В нашем исследовании мы обнаружили высокий уровень ESBL-продуцирующих изолятов *K. pneumoniae* (72,7%) и статистически достоверное увеличение резистентности к аминогликозидам, но в тоже время в отношении хинолонов достоверно значимая тенденция резистентности не доказана, как и наличие карбапенем резистентных штаммов *K. pneumoniae*.

Как известно, штамм *A. baumannii* является особенно трудным патогеном, потому что широкий уровень антимикробной резистентности данного инфекционного агента вызывает ряд проблем при проведении антимикробной терапии на практике. За исследуемый период высеваемость штаммов *A. baumannii* составил за более чем 8,5% бактериальных инфекций со статистически значимым увеличением частоты ($p=0,059$). Более того, отмечается тенденция увеличения резистентности ко всем протестированным антибиотикам, особенно к меропенему

62,5%, ципрофлоксацину 65,2% и амикацину 47,2%, что совпадает с исследованиями других авторов [30,31].

Заключение

Высокий уровень резистентности с нарастающей динамикой штаммов *A. baumannii*, *Ps. aeruginosa* и *K. pneumoniae* в отделении детской кардиохирургии побуждает необходимость создания хорошо разработанной стратегии инфекционного контроля, включающую правильную гигиену медицинского персонала, микробиологический мониторинг и внутрибольничный контроль, что позволит снизить риск возникновения нозокомиальных инфекций.

Список литературы

1. The frequency and cost of complications associated with coronary artery bypass grafting surgery: results from the United States Medicare program./ Brown P.P., Kugelmass A.D., Cohen D.J. et al./Ann Thorac Surg. – 2008. – V. 85. – P. 1980-1986.
2. Nosocomial infections in pediatric cardiac surgery, Italy./Valera M., Scolfaro C., Cappello N. et al./Infect Control Hosp Epidemiol. – 2001. – V. 22. – P. 771-775.
3. Mediastinitis in pediatric cardiac surgery: treatment and cost-effectiveness in a low-income country./Vida V.L., Leon-Wyss J., Larrazabal A. et al./Pediatr Cardiol. – 2007. – V. 28. – P. 163-166.
4. Case-control study of pediatric cardiothoracic surgical site infections./ Holzmman-Pazgal G., Hopkins-Broyles D., Recktenwald A. et al./Infect Control Hosp Epidemiol. – 2008. – V. 29. – P. 76-79.
5. Risk factors for sternal wound and other infections in pediatric cardiac surgery patients./ Mehta P.A., Cunningham C.K., Colella C.B. et al./Pediatr Infect Dis J. – 2000. – V. 19. – P. 1000-1004.
6. Epidemiologic surveillance of nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country./ Becerra M.R., Tantaleán J.A., Suárez V.J. et al./ BMC Pediatrics. – 2010. – V. 10. – P. 66-71.
7. Singhi S., Rao D.S., Chakrabarti A. Candida colonization and candidemia in a pediatric intensive care unit./ Pediatr Crit Care Med. – 2008. – V. 9. – P. 91-95.
8. Pseudomonas aeruginosa outbreaks in the neonatal intensive care unit – a systematic review of risk factors and environmental sources./Jefferies J.M., Cooper T., Yam T., Clarke S.C./J Med Microbiol. – 2012. – V. 61. – P. 1052-1061.
9. Prospective incidence study of nosocomial infections in a pediatric intensive care unit./ Urrea M., Pons M., Serra M. et al./Pediatr Infect Dis J. – 2003. – V. 22. –P. 490-494.
10. Pediatric Prevention Network. A national point-prevalence survey of pediatric intensive care unit-acquired infections in the United States./Grohskopf L.A., Sinkowitz-Cochran R.L., Garrett D.O. et al./ J Pediatr. – 2002. – V. 140. – P. 432-438.
11. Pediatric Prevention Network. Nosocomial infection rates in US children's hospitals' neonatal and pediatric intensive care units./ Stover B.H., Shulman S.T., Bratcher D.F. et al./Am J Infect Control. – 2001. – V. 29. – P. 52-157.
12. Major infection after pediatric cardiac surgery: at risk estimation model./ Barker G.M., O'Brien S.M., Welke K.F. et al./Ann Thorac Surg. – 2010. – V. 89 (3). –P. 843-850.
13. Rate, risk factors and outcomes of catheter-related bloodstream infection in a pediatric intensive care unit in Saudi Arabia./Almuneef M.A., Memish Z.A., Balkhy H.H. et al./ J Hosp Infect. – 2006. –V. 62. – P. 207-213.
14. Guidelines of standards for microbiologic tests in the laboratory of clinical microbiology. - Astana, 2008. – P. 11-12.
15. Nosocomial infections in a pediatric intensive care unit of a developing country: NHSN surveillance./Porto J.P., Mantese O.C., Arantes A. et al./Rev Soc Bras Med Trop. – 2012. – V. 45. – P. 475-479.
16. Epidemiologic surveillance of nosocomial infections in a Pediatric Intensive Care Unit of a developing country./ Becerra M.R., Tantaleán J.A., Suárez V.J. et al./BMC Pediatr. – 2010. – V. 10. – P. 66-72.
17. Nosocomial bloodstream infections in a pediatric intensive care unit: 3-year survey./ Grisaru-Soen G.I., Sweed Y., Lerner-Geva L. et al./Med Sci Monit. – 2007. – V. 13 (6). – P. 251-257.
18. Nosocomial infections in pediatric intensive care units. / Lodha R.1., Natchu U.C., Nanda M., Kabra S.K. //Indian J Pediatr. – 2001. – V. 68 (11). – P. 1063-1070.
19. Pathogenic analysis of sputum from ventilator-associated pneumonia in a pediatric intensive care unit./ Bo-Tao Ning, Chen-Mei Zhang, Tao Liu Sheng et al./ Experim and Therap Med. – 2013. – V. 5 (1). – P. 367-371.
20. Frequency of nosocomial infections in pediatric intensive care unit at King Abdulaziz Medical City, Riyadh, Saudi Arabia./Alotaibi M.G., Rahman S., Shalaan M.A., Omair A./ J Infect Dis Ther. – 2015. – V. 3 (5). – P. 234-237.
21. Epidemiology of hospital-acquired bloodstream infections in a Tunisian pediatric intensive care unit: A 2-year prospective study./Jaballah N.B., Bouziri A., Mnif K, et al./ Amer J of Infect Control. – 2007. – V. 35 (9). –P. 613-618.
22. Chow J., Golan Y., Ruthazer R. Risk factors for albicans and non-albicans candidemia in the intensive care unit./ Crit Care Med. – 2008. – V. 3. – P. 1993-1998.
23. Marodi L., Johnston R. Invasive Candida species disease in infants and children: occurrence, risk factors, management, and innate host defense mechanisms./ Curr Opin Pediatr. – 2007. – V. 19. – P. 693-697.
24. Risk factors for candidemia in pediatric patients with congenital heart disease./ García L., Cobo J., Martos I. et al./Infect Control Hosp Epidemiol. – 2006. – V. 27. – P. 576-580.
25. Koff M.H. The prevention of ventilator associated pneumonia./NEJM. – 1999. – V. 340. – P. 627-641.

26. Sequential microbiological monitoring of tracheal aspirates in intubated patients admitted to a pediatric intensive care unit./Carvalho C.E., Berezin E.N., Pistelli I.P. et al.//J Pediatr. – 2005. – V. 81 (1). –P. 34-240.
27. Nosocomial colonization due to imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemiologically linked to breast milk feeding in a neonatal intensive care unit./Mamina C., Carlo P.D., Cipolla D. et al.//Acta Pharmacologica Sinica. – 2008. – V. 29. – P. 1486-1492.
28. Microbiologic spectrum and susceptibility pattern of clinical isolates from the pediatric intensive care unit in a single medical center — 6 years' experience./ Lee C.Y., Chen P.Y., Huang F.L., Lin C.F.//J Microbiol Immunol Infect. - 2009. – V. 42. – P. 160-165.
29. Changes of drug-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pediatric intensive care unit./Wang L.J., Sun Y., Song W.L. et al.//Chinese J of Pediatr. – 2012. – V. 50 (9). – P. 657-663.
30. Incidence, microbiological profile of nosocomial infections, and their antibiotic resistance patterns in a high volume cardiac surgical intensive care unit/ Sahu M.K., Siddhart B., Choudhary A. et al.// Annals of Cardiac Anaesthesia. - 2016. – V. 19 (2). – P. 281-287.
31. *Acinetobacter* infections in a tertiary level intensive care unit in northern India: Epidemiology, clinical profiles and outcomes/Mathai A.S., Oberoi A., Madhavan S., Kaur P. // Journal of Infection and Public Health. – 2012. – V. 5. –P. 145-152.

Автор для корреспонденции: Ергалиева А.С. – старший ординатор микробиологической лаборатории АО «Национальный научный медицинский центр»; эл. почта: microb_nmmc@mail.ru, 8 (7172) 57 76 52

МРНТИ 76.03.43

ДИНАМИКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В ОТДЕЛЕНИИ РЕАНИМАЦИИ

Н.М. Бисенова, А.С. Ергалиева

АО «Национальный научный медицинский центр», Нур-Султан, Казахстан

Определен микробный спектр и антибиотикорезистентность часто встречающихся патогенов в отделении реанимации в период с 2015 по 2019 годы. Как показали результаты исследования, 54,5% выделенных штаммов (603) относились к грамотрицательной микрофлоре, среди которых на долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 31,5% изолятов (349), среди которых чаще всего высевался *Acinetobacter baumannii* – 16,4% (182) и *Pseudomonas aeruginosa* – 13,2% штаммов (146). *A. baumannii* показал высокий уровень резистентности к карбапенемам 93%, к хинолонам 95%. Резистентность штаммов синегнойной палочки к карбапенемам составила 70,5%. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*, наибольшая резистентность наблюдалась у штаммов *Klebsiella pneumoniae* – 97% резистентность к цефалоспорином. С целью уменьшения возникновения и распространения резистентных штаммов в ОРИТ, строго рекомендуется проводить микробиологический мониторинг и оптимизацию применения противомикробных препаратов в каждом конкретном лечебном учреждении.

Ключевые слова: антимикробная резистентность, отделение реанимации и интенсивной терапии, микробиологический мониторинг, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

DYNAMICS OF GRAM-NEGATIVE BACILLI RESISTANCE ISOLATED FROM PATIENTS IN ICU

N. Bissenova, A. Yergaliyeva

JSC «National Scientific Medical Research Center», Nur-Sultan city, Kazakhstan

A retrospective microbiologic study of 1105 strains isolated from adult patients in ICU during the period 2015-2019. The results of the study, 54.5% of the isolated strains (603) were Gram-negative, among which the share of non-fermenting Gram-negative bacteria accounted for 31.5% of the isolates (349), most frequently was *Acinetobacter baumannii* – 16.4% (182) and *Pseudomonas aeruginosa* – 13.2% (146). *A. baumannii* showed a high level of resistance to carbapenems at the level of 93%. Resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenems was 70.5%. Among the representatives of the family *Enterobacteriaceae*, the highest resistance was observed in strains of *Klebsiella pneumoniae*, 97% resistance to cephalosporins. In order to reduce the emergence and spread of drug-resistant strains in the ICU, it is strongly recommended to carry out microbiologic monitoring and optimization of the use of antimicrobials in each hospital. Therefore local resistance surveillance programs have the greatest value in the development of appropriate therapeutic recommendations for specific types of patients and infections.

Keywords: antimicrobial resistance, intensive care unit, microbiological monitoring, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

ЖАНСАҚТАУ БӨЛІМІНДЕГІ ГРАМТЕРІС БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ТҰРАҚТЫЛЫҒЫ ДИНАМИКАСЫ

Н.М. Бисенова, А.С. Ерғалиева

«Ұлттық ғылыми медициналық орталық» АҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

2015 және 2019 жылдар аралығында жансақтау бөліміндегі науқастар арасындағы ауруханаішілік патогендердің спектрін анықталды, жиі кездесетін патогендердің антибактериалдық препереттарға тұрақтылық деңгейін түйіндеді. Осы аралықта клиникалық материалдардың 1038 түрі зерттелді, олардың ішінде 1105 дақыл бөлініп алынды. Зерттеу нәтижелері бойынша (603) бөлінген дақылдардың 54,5% грамтеріс бактериялар құрамынан болса, олардың ішінде (349) қышқыл мен газға ыдыратпайтын грамтеріс бактериялардың 31,5% құрады. Яғни, ең жиі кездесетін *Acinetobacter baumannii* – 16,4% (182) және *Pseudomonas aeruginosa* – 13,2% (146) дақылы бөлінді. *Acinetobacter baumannii* карбапенемдерге 93% аса жоғары деңгейде тұрақтылық көрсетті. Көкіріңді таяқшасының карбапенемге тұрақтылығы 70,5% құрады. *Enterobacteriaceae* туыстастығы өкілдерінің ішінде *Klebsiella pneumoniae* 97% тұрақтылық көрсетсе. Жансақтау бөлімдерінде антибиотикке тұрақты дақылдардың пайда болуын және таралуын болдырмау мақсатында әрбір жеке емдеу мекемелерінде микробиологиялық бақылау және антибактериалдық препараттарды қолдануда оңтайландыру әдістерін жүргізу қатаң түрде ұсынылады.

Кілт сөздер: антибактериалдық препереттарға тұрақтылық, микробиологиялық бақылау, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*.

Введение

Пациенты, попадающие в ОРИТ, подвергаются высокому риску контаминации нозокомиальных инфекций. Появление антибиотико-резистентных патогенов в условиях ОРИТ затрудняет лечение этих инфекций, а в некоторых случаях лечение становится невозможным [1-3]. Пациенты отделения реанимации особенно восприимчивы к нозокомиальным инфекциям, что связано с основным заболеванием, сниженным иммунным статусом и частым использованием инвазивных устройств [4-6].

Устойчивость к противомикробным препаратам среди патогенов в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), как правило, увеличивается из года в год, однако изменения существуют между различными странами, и даже регионами, вероятно, вследствие индивидуального использования антимикробных препаратов. В проспективном исследовании 2000 пациентов ОРИТ было показано, что клиническая смертность инфицированных пациентов, получавших несоответствующую антимикробную терапию (без *in vitro* данных антибиотикочувствительности против патогена) была статистически в два раза выше, чем у пациентов, получавших антибиотикотерапию этиологических агентов инфекции [7].

Соответствующая терапия инфекций ОРИТ должна основываться на локальных данных о резистентности, которая может иметь существенное значение, как для пациента, так и для системы инфекционного контроля.

Профилактические и противоэпидемические меры в стационаре должны базироваться на результатах мониторинга циркулирующей микрофлоры.

Цель

Определить спектр патогенов, связанных с нозокомиальными инфекциями среди пациентов ОРИТ, резюмировать уровень резистентности к противомикробным препаратам часто встречающихся патогенов и обеспечить обзор стратегий по предотвращению распространения резистентности.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено ретроспективное микробиологическое исследование микробного пейзажа и антибиотикочувствительность штаммов, выделенных от взрослых пациентов, госпитализированных в ОРИТ в период с 2015 по 2019 годы. Все пациенты, поступающие на плановое оперативное лечение в АО «ННМЦ», подписывают информированное согласие в соответствии с протоколами диагностики и лечения.

Сбор исследуемого материала

Исследованию подвергался респираторный тракт (мазок из зева, мокрота, промывные воды бронхов, жидкость из плевральной полости, содержимое катетера из трахеостомы, интубационная трубка), уретральный тракт (моча, мочевого катетер). Другие виды клинического материала включали: содержимое дренажей, мазок из раны, ЦВК, содержимое санационного, аспирационного, яремного катетеров, мазок из пролежней. Весь клинический материал собирался и транспортировался в микробиологическую лабораторию согласно методическим рекомендациям [8].

Культивирование образцов

Количественный анализ исследуемого материала проводили с использованием питательных сред (кровяной агар, среда Эндо, желточно-солевой агар, Candida агар, Калина агар, шоколадный агар). Посевы культивировали 24 часа при 37°C, чашки с Candida агар культивировали 5 суток при 22°C.

Идентификация изолятов

Согласно методическим рекомендациям, для идентификации изолятов изучались морфологические свойства, окраску по Граму, оксидазный и каталазный тесты, тест на плазмокоагулазу, желчный тест, тест на индолообразование. Заключительная идентификация выделенных чистых культур микроорганизмов проводилась на микробиологическом анализаторе «Vitek 2 – Compact» (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France).

Исследование антибиотикочувствительности

Антимикробная активность была исследована к цефтазидиму, цефепиму, меропенему, имипенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, амикацину, гентамицину, тобрамицину и колистину методом МИК («Vitek 2 – Compact»).

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью Microsoft Excel, определяли среднюю величину, ошибку средней (m), t-критерий Стьюдента, уровень доверительного интервала (p). Различия средних значений считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

За исследуемый период было получено 1 038 образцов клинического материала, из которого выделено 1 105 штамм микроорганизмов. Наибольшее количество штаммов было выделено из респираторного тракта – 34,3% (380), с уретрального тракта - 28,6% (317), раневое отделяемое – 23,9% (265) (таблица 1).

Таблица 1 – Микробный пейзаж условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у пациентов ОРИТ за 2015-2019 гг.

Вид микроорганизма	Респираторный тракт	Раневое отделяемое	Инфекция кровотока	ЦВК	ИМП	Другое ¹	Итого
	п %	п %	п %	п %	п %	п %	п %
<i>Staphylococcus aureus</i>	13 (3,4)	6 (2,2)	4 (8,8)	1 (1,6)	5 (1,5)	2 (5,5)	31 (2,8)
Коагулазоотр стафилококки	27 (7,1)	49 (18,4)	11 (24,4)	26 (41,9)	19 (5,9)	4 (11,1)	136 (12,3)
<i>Enterococcus spp.</i>	25 (6,5)	46 (17,3)	5 (11,1)	5 (8,0)	96 (30,2)	3 (8,3)	180 (16,2)
<i>E.coli</i>	10 (2,6)	32 (12,0)	2 (4,4)	14 (22,5)	38 (11,9)	1 (2,7)	97 (8,7)
<i>Enterobacter spp.</i>	5 (1,3)	6 (2,2)		2 (3,2)	6 (1,8)	2 (5,5)	21 (1,9)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	61 (16,0)	29 (10,9)	8 (17,7)	3 (4,8)	33 (10,4)	2 (5,5)	136 (12,3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69 (18,1)	43 (16,2)	4 (8,8)	2 (3,2)	20 (6,3)	8 (22,2)	146 (13,2)
<i>Acinetobacter</i>	112 (29,4)	32 (12,0)	4 (8,8)	5 (8,0)	26 (8,2)	3 (8,3)	182 (16,4)

<i>baumannii</i>							
<i>Burkholderia cepacia</i>	2 (0,5)	2 (0,7)	1 (2,2)	-	2 (0,6)	2 (5,5)	9 (0,8)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9 (2,3)	2 (0,7)	-	-	1 (0,3)		12 (1,0)
<i>Candida spp.</i>	29 (7,6)	8 (3,0)	3 (6,6)	2 (3,2)	56 (17,6)	3 (8,3)	101 (9,1)
Другие	18 (4,7)	10 (3,7)	3 (6,6)	2 (3,2)	15 (4,7)	6 (16,6)	54 (4,8)
Всего выделено	380	265	45	62	317	36	1105
*кончик санационного катетера, кончик аспирационного катетера, жидкость из плевральной полости							

Как показали результаты исследования, 54,5% выделенных штаммов (603) относились к грамотрицательной микрофлоре, среди которых на долю неферментирующих грамотрицательных бактерий приходилось 31,5% изолятов (349), среди которых чаще всего высевался *Acinetobacter baumannii* – 16,4% (182) от общего количества выделенных штаммов и *Pseudomonas aeruginosa* – 13,2% штаммов (146). Чаще всего из представителей *Enterobacteriaceae* чаще всего высевались *Klebsiella pneumoniae* – 12,3% (136), *Escherichia coli* – 8,7% (97) и *Enterobacter spp.* – 1,9% (21),

Из выделенных грамположительных штаммов 16,2% (180) относились к *Enterococcus spp.*, более 12% (136) относились к коагулазоотрицательным стафилококкам, и только 2,8% (31) являлись *Staphylococcus aureus*.

Наиболее часто встречаемым патогенным респираторного тракта был *A. baumannii* (29,4%) и *P. aeruginosa* (18,1%). Более 37% выделенных изолятов уретрального тракта относились к грамположительной флоре: *Enterococcus spp.* (30,2%) и коагулазоотрицательные стафилококки (5,9%), а также здесь было выделено наибольшее количество *Candida spp.* – 17,6%. В раневом отделяемом чаще других обнаруживались коагулазоотрицательные стафилококки (18,4%) и *Enterococcus spp.* (17,3%) (таблица 1). За исследуемый период бактериемия обуславливалась коагулазоотрицательными стафилококками (24,4%) и *K. pneumoniae* (17,7%).

Исследование резистентности к антимикробным препаратам грамположительной микрофлоры показало отсутствие ванкомицин-резистентных штаммов *Enterococcus spp.*, резистентность штаммов *S. aureus* к оксацилину составила 33,3%.

Неферментирующие грамотрицательные бактерии – часто встречающийся вид нозокомиальных инфекций у пациентов ОРИТ. *A. baumannii* показал высокий уровень резистентности к большинству тестируемым антибиотикам (к карбапенемам - 93,9%, к хинолонам – 95,6%, к аминогликозидам – к гентамицину – 90,1%). Наименьший уровень резистентности отмечен к амикацину – 67,5% и к тобрамицину – 61,5%. За исследуемый период резистентность к колистину не выявлена (таблица 2).

Таблица 2 – Резистентность штаммов неферментирующих грамотрицательных бактерий у пациентов ОРИТ.

Антимикробный препарат	<i>Acinetobacter baumannii</i> n=182	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> n=146	<i>Klebsiella pneumoniae</i> n=136
	n (%)	n (%)	n (%)
Цефтазидим	-	84 (57,5)	133 (97,7)
Цефепим	-	108 (73,9)	133 (97,7)
Меропенем	171 (93,9)	93 (63,6)	0
Имипенем	166 (91,2)	114 (78,0)	0
Ципрофлоксацин	174 (95,6)	89 (60,1)	112 (82,4)
Левифлоксацин	174 (95,6)	102 (69,8)	105 (77,2)
Амикацин	123 (67,5)	37 (25,3)	5 (3,6)
Гентамицин	164 (90,1)	52 (35,6)	82 (60,2)
Тобрамицин	112 (61,5)	56 (38,3)	10 (7,3)
Колистин	0	0	0

Резистентность штаммов синегнойной палочки к антисинегнойным цефалоспорином составила к цефепиму 73,9%, к цефтазидиму 57,5%. К меропенему 63,6%, к имипенему - 78%. Процент резистентности синегнойной палочки к ципрофлоксацину составил 60,1%, к левофлоксацину 69,8%. Наименьшая резистентность отмечается к аминогликозидам, в среднем на уровне 35%. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*, наибольшая резистентность наблюдалась у штаммов *Klebsiella pneumoniae*, 97% резистентность к цефалоспорином (цефепим, цефтазидим), наименьшая резистентность отмечается к амикацину 3,6% и тобрамицину 7,3%; резистентность к карбапенемам не обнаружена.

Известно, что к наиболее проблемным патогенам ОРИТ относятся представители семейства *Enterobacteriaceae*, неферментирующие грамотрицательные бактерии (*P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.*), оксациллин-резистентный *S. aureus* и ванкомицин-резистентные энтерококки [9-11].

Профили резистентности данных патогенов ОРИТ были исследованы как на региональном, так и на международном уровнях, включая такие проекты как ICARE (Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology), MYSTIC (the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program), ISS (the ICU Surveillance Study), SENTRY Program.

По данным исследования SENTRY, среди патогенов ОРИТ часто встречающимися являлись *S. aureus* (24,1%), *P. aeruginosa* (12,2%), *E. coli* (10,1%), *Klebsiella spp.* (8,9%), *Enterococcus spp.* (7,2%), *Enterobacter spp.* (7,0%) и коагулазоотрицательные стафилококки (7,0%) [12].

Данные международного исследования EPIC II (Extended Prevalence of Infection in Intensive Care II) показывают, что наиболее часто встречающимися патогенами являлись *S. aureus* (20%), *P. aeruginosa* (20%) и *E. coli* (16%) [13].

В исследовании MYSTIC (1997-2000) среди патогенов ОРИТ на первом месте по частоте встречаемости обнаруживался *P. aeruginosa* (33%), следующий за ним *A. baumannii* (17,1%), далее *K. pneumoniae* (12,1%), *E. coli* (10,5%), *Enterobacter cloacae* (7,9%) [14].

Наши результаты показывают, что часто встречающимися патогенами нашего ОРИТ являлись неферментирующие грамотрицательные бактерии, а именно *A. baumannii* (16,4%) и *P. aeruginosa* (13,2%). Процент обнаружения *S. aureus* составил всего 2,8%, *E. coli* 8,7%.

Возрастающая распространенность *A. baumannii* ассоциированных инфекций в ОРИТ показана в исследовании EPIC II: исследователи указывают цифру в 15% и более случаев инфекций в ОРИТ были вызваны штаммами *A. baumannii* в странах Восточной Европы, Южной Америки, Африки и Азии [13].

Факторы, влияющие на антимикробную резистентность в ОРИТ включает тяжесть заболевания пациента, предрасположение к нозокомиальным инфекциям, передача патогенами основных инфекционных характеристик отделения интенсивной терапии в больнице, нарушение мембранных и кожных покровов вследствие использования инвазивных устройств, увеличение пребывания в стационаре, широкое использование профилактических и терапевтических антиинфекционных агентов.

Пациенты отделения ОРИТ чаще других инфицируются резистентными штаммами патогенов, вместе с этим, процент антибиотикорезистентности микробов, выделенных от пациентов отделения ОРИТ намного выше, чем в других отделениях стационара.

Полученные результаты многоцентрового исследования MYSTIC (США) показывают, что более 96,6% штаммов семейства *Enterobacteriaceae* были чувствительны к карбапенемам (меропенем, имипенем, эртапенем) [14], в нашем исследовании процент чувствительных штаммов к данным антибиотикам составил 100%. Наибольшую резистентность показали штаммы *K. pneumoniae* - 97% резистентность к цефалоспорином, резистентность к ципрофлоксацину составила 82,4%, к гентамицину 60,4%. Таким образом, для отделения ОРИТ нашего стационара не является проблемой MRSA, ванкомицин-резистентные энтерококки и карбапенем-резистентные штаммы *K. pneumoniae*, актуальность которых отмечается во многих исследованиях [15-17].

A. baumannii является особенно трудным патогеном, потому что широкий уровень антимикробной резистентности данного инфекционного агента вызывает ряд проблем при проведении антимикробной терапии на практике.

Несоответствующая начальная антимикробная терапия при инфекциях, вызванных мультирезистентными штаммами *A. baumannii* является строгим предиктором смертности [18].

Возрастающее появление инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами *A. baumannii* было показано в исследовании Eurofins The Surveillance Network (США) в течение трех периодов, с 2003 по 2012 гг. Это исследование показывает, что в последнее десятилетие наблюдается увеличение резистентности штаммов *A. baumannii* ко многим клинически важным классам антибиотиков: резистентность к карбапенемам увеличилась 21% до 47,9%, к колистину с 2,8% до 6,9%. Появление мультирезистентных штаммов *A. baumannii* увеличилось с 21,4% в 2003 до 35,2% в 2012 году [19]. Другие авторы при исследовании антибиоточувствительности 74 реанимационных штаммов *A. baumannii* выявили 100% резистентность к цефалоспорином III поколения, к карбапенемам 94,6%, к тикарциллину 93,2%, к гентамицину 85,1% [20].

В нашем исследовании наибольшая резистентность среди основных выделенных инфекционных агентов также наблюдается у штаммов *A. baumannii*. Резистентность к карбапенемам на уровне 93%, к фторхинолонам более 95%. Таким образом, анализ результатов антибиотикограмм не позволяет рекомендовать данные препараты как для комбинированной терапии, так и в монорежиме. По результатам нашего исследования наиболее эффективным в отношении штаммов *A. baumannii* являлся тобрамицин (61,5% резистентных изолятов) и колистин. На втором месте по частоте встречаемости патогеном в ОРИТ является *P. aeruginosa*, резистентность которого значительно ниже, чем у штаммов *A. baumannii*. Резистентность штаммов синегнойной палочки к антисинегнойным цефалоспорином находится на уровне 73%, к карбапенемам 70,5%, к фторхинолонам 64,5%, к аминогликозидам 35%.

Таким образом, изучение спектра патогенов ОРИТ выявило широкое распространение и динамику увеличения частоты обнаружения штаммов *A. baumannii*. Выделенные штаммы характеризовались высоким уровнем устойчивости к основным группам антимикробных препаратов, что отражает сложившуюся тенденцию «проблемных» патогенов отделения реанимации в настоящее время.

Заключение

С целью уменьшения возникновения и распространения резистентных штаммов в ОРИТ, строго рекомендуется проводить микробиологический мониторинг и оптимизацию применения противомикробных препаратов в каждом конкретном лечебном учреждении. Поэтому программы наблюдения локальной резистентности имеют наибольшую ценность в разработке соответствующих терапевтических рекомендаций для специфических инфекций и типов пациентов.

Список литературы

1. Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic resistance of bacteria./Russotto V., Cortegiani A., Graziano G. et al.// *Infection and Drug Resistance*. – 2015. – V. 8. – P. 287-296.
2. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit./ Brusselaers N. et al.//*Annals of Intensive Care*. – 2011. – V. 1. – P. 47-55.
3. Epidemiology, associated factors and outcomes of ICU-acquired infections caused by Gram-negative bacteria in critically ill patients: an observational, retrospective study./Chelazzi C., Pettini E., Villa G., Gaudio D.//*BMC Anesthesiology*. – 2015. – V. 15. – P. 125-133.
4. Akhtar N. Hospital Acquired Infections in a Medical Intensive Care Unit.// *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. – 2010. – V. 20 (6). – P. 386-390.
5. A study on antibiotic sensitivity pattern of bacterial isolates in the intensive care unit of a tertiary care hospital in Eastern India./ Pattanayak C., Patanaik S.K., Datta P.P., Panda P.// *Int J Basic Clin Pharmacol*. – 2013. – V. 2 (2). – P. 153-159.
6. Varley A.J., Williams H., Fletcher S. Antibiotic resistance in the intensive care unit.//*Critical Care and Pain*. – 2009. – V. 9 (4). – P. 114-118.
7. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among ill patients./Kollef M.H., Sherman G., Ward S., Fraser V.J.// *Chest*. – V. 115. – P. 462-474.
8. Standarty vzjatija, dostavki i hranenija biomateriala dlja mikrobiologicheskikh issledovanij v laboratorii klinicheskoy mikrobiologii: Metodicheskie instrukcii. – Astana, 2008. – С. 11-12.

9. Efficacy of high-dose nebulized colistin in VAP caused by MDR *P. aeruginosa* and *A. baumannii*./Qin Lu, Rubin Luo, Liliane Bodin et al.//*Anesthesiology*. – 2012. – V. 117. – P. 1335-1347.
10. Improved ICU design reduces acquisition of antibiotic-resistant bacteria: a quasi-experimental observation study./ Phillip D Levin, Mila Golovanovski, Allon E Moses et al.//*Critical Care*. – 2011. – V. 15. – P. 211-220.
11. First multicenter study on multidrug-resistant bacteria carriage in Chinese ICUs./Xiaojun Ma, Yinghong Wu, Liuyi Li et al.//*BMC Infectious Diseases*. – 2015. – V. 15. – P. 358-368.
12. Fluit A.C., Verhoef J. The European SENTRY Participants. Frequency of isolation and antimicrobial resistance of Gram-negative and Gram-positive bacteria from patients in ICUs of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1998.// *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. – 2001. – V. 20. – P. 617-625.
13. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units./Jean Louis Vincent, Jordi Rello, John Marshall et al.//*JAMA*. -2009. – V. 302 (21). – P. 2323-2329.
14. Garcia-Rodriguez J.A. The MYSTIC Programme Study Group, Jones RN. Antimicrobial resistance in Gram-negative isolates from European ICUs: data from MYSTIC Programme.//*J Chemother*. – 2002. – V. 14. –P. 25-32.
15. Paul R. Rhomberg, Ronald N. Jones Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the USA (1999-2008).//*Diagnostic Microbiology and Infection Diseases*. – 2009. – V. 65. – P. 414-426.
16. Antibiotic trends of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* resistance indicators in an ICU of Southern Italy, 2008-2013./Agodi et al.// *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. – 2015. – V. 4. – P. 43.
17. Fraimow H.S., Tsigrelis C. Antimicrobial resistance in the ICU: Mechanisms, Epidemiology, and Management of specific resistant pathogens.// *Crit Care Clin*. – 2011. – V. 27 (1). – P. 163-205.
18. Predictors of hospital mortality among septic ICU patients with *Acinetobacter* spp. bacteremia: a cohort study./Shorr A.F., Zilberberg M.D., Micek S.T., Kollef M.H.//*BMC Infect Dis*. - 2014. – V. 14. – P. 572
19. Zilberberg M.D., Kollef M.H., Shorr A.F. Secular trends in *A. baumannii* resistance in respiratory and blood specimens in the United States, 2003-2012: a survey study.// *J Hosp Med*. - 2015. doi:10.1002/jhm.2477.
20. Aysen Bayram, Iclal Balci Patterns of antimicrobial resistance in a surgical ICU of a university hospital in Turkey.// *BMC Infectious Diseases*. – 2006. – V. 6. – P. 155.
- Автор для корреспонденции:** Ергалиева А.С. – старший ординатор микробиологической лаборатории АО «Национальный научный медицинский центр»; эл. почта: microb_nnmcc@mail.ru, 8 (7172) 57 76 52

МРНТИ 76.03.43

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ ПРИ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ И КАЧЕСТВА: ИХ ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ

Г.С. Нагуманова¹, А.О. Увашов¹, А.А. Каримова¹, А.Н. Искакова^{1,2}

¹РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» ККК и БТУ МЗ РК, Нур-Султан, Казахстан

²РГП на ПХВ «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

На основе Государственной Фармакопеи Республики Казахстан и других фармакопей зарубежных стран осуществляется одна из важных задач, такая, как оценка безопасности и качества лекарственных средств и медицинских изделий, поступающих на рынок страны. Одним из показателей, который влияет на безопасность и качество лекарственных средств, является проверка на содержание бактериальных эндотоксинов. Бактериальные эндотоксины определяют в инъекционных лекарственных средствах, предназначенных для парентерального и интратекального применения, и в субстанциях, используемых для их изготовления. Метод дает возможность проводить постадийный контроль содержания эндотоксинов в процессе производства инъекционных лекарственных средств. Данная статья отражает насколько важно проводить испытания на бактериальные эндотоксины, какими методами проводить исследования и их отличительные особенности.

Ключевые слова: ЛАЛ-тест, МДР, КСЭ, *Limulus amoebocyte lysate*.

MICROBIOLOGICAL TESTING OF MEDICINES AND MEDICAL DEVICES IN THE EXPERTISE OF SAFETY AND QUALITY: THEIR ADVANTAGES AND DISADVANTAGES

G. Nagumanova¹, A. Uvashov¹, A. Karimova¹, A. Iskakova^{1,2}

¹REM "National Center for Expertise of Medicines, Medical Devices and Medical Equipment" of the Ministry of Health of the RK, Nur-Sultan city, Kazakhstan

²RSE "Republican collection microorganisms" SC MES RK, Nur-Sultan city, Kazakhstan

On the basis of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan, and other pharmacopeias of foreign countries, one of the important tasks is carried out, such as assessing the quality of medicines and medical devices entering the country's market. One of the indicators that affects the safety of drug quality is a check for bacterial endotoxin content. Bacterial endotoxins are determined in injectable drugs intended for parenteral and intrathecal use, and in the substances used for their manufacture. The method makes it possible to carry out step-by-step control of the content of endotoxins in the production process of injection drugs. This article reflects how important it is to conduct tests for bacterial endotoxins, what methods to conduct research and their differences.

Key words: LAL test, MVD, KSE, Limulus amebocyte lysate.

ҚАУІПСІЗДІК ПЕН САПАНЫ БАҒАЛАУ КЕЗІНДЕ ДӘРІЛІК ЗАТТАР МЕН МЕДИЦИНАЛЫҚ БҰЙЫМДАРДЫ МИКРОБИОЛОГИЯЛЫҚ СЫНАУ: ОЛАРДЫҢ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ МЕН КЕМШІЛІКТЕРІ

Ғ.С. Нагуманова¹, А.О. Увашов¹, А.А. Каримова¹, А.Н. Искакова^{1,2}

¹ҚР ДСМ Тауарлар мен көрсетілетін қызметтердің сапасы мен қауіпсіздігін бақылау комитетінің «Дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сараптау ұлттық орталығы» ШЖҚ РМК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²МРК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» ҚР БҒМ ҒҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармакопиясының және басқа да шет елдердің фармакопиясының негізінде ел нарығына түсетін дәрілік заттар мен медициналық бұйымдардың сапасын бағалау сияқты маңызды міндеттердің бірі жүзеге асырылады. Дәрілік заттардың сапасына әсер ететін көрсеткіштердің бірі бактериялық эндотоксиннің құрамын тексеру болып табылады. Бактериялық эндотоксиндер парентеральды және интратекальды қолдануға арналған инъекциялық дәрілік заттарда және оларды дайындау үшін пайдаланылатын субстанцияларда айқындалады. Әдіс инъекциялық дәрілік заттарды өндіру процесінде эндотоксиндердің құрамына сатылық кейін бақылау жүргізуге мүмкіндік береді. Бұл мақала бактериялық эндотоксиндерге сынақ жүргізудің қаншалықты маңызды екенін, зерттеу жүргізудің қандай әдістерімен және олардың айрықша ерекшеліктерін көрсетеді.

Кілт сөздер: ЛАЛ-тест, МДР, КСЭ, Limulus amebocyte lysate.

Введение

Обеспечение населения Республики Казахстан качественными и безопасными лекарственными средствами, и медицинскими изделиями является одним из приоритетных задач в сфере обращения лекарственных средств в нашей стране. Все заявленные на реализацию лекарственные средства (ЛС) и медицинские изделия (МИ) подвергаются тщательной проверке с выдачей заключения о безопасности и качестве.

Одними из параметров испытаний являются стерильность, микробиологическая чистота, содержание бактериальных эндотоксинов (далее -БЭ), количественное определение антибиотиков и витаминов, которые проводятся микробиологической лабораторией.

В данной статье хотим показать, насколько важно проводить исследования на БЭ. Токсичность БЭ высвобождается при разрушении стенок бактерий, после чего может проникать в различные жидкие среды организма (кровь, спинномозговую жидкость, мокроту и др.). Попадание в кровь БЭ особенно опасно, и при этом стоит отметить, что у разных видов чувствительность по отношению к БЭ неодинакова [1].

Циркуляция эндотоксина в крови приводит к различным патофизиологическим эффектам, ухудшающим состояние и в значительной мере определяющим тяжесть клинического состояния пациента. Поэтому определение БЭ в циркуляции необходимо для персонализации лечения жизнеугрожающих состояний при сепсисе [2, 3].

Цель

Показать важность испытаний лекарственных средств и медицинских изделий на бактериальные эндотоксины. Рассмотреть используемые при этом методы исследования, и их отличительные особенности.

Материалы и методы

Содержание бактериальных эндотоксинов (БЭ) определяется с помощью реактива, представляющего собой лизат амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив), который при реакции с бактериальными эндотоксинами образует помутнение раствора, осаждение или гель.

Существуют три основных направления проведения теста: гель-тромб-тест, турбидиметрический и хромогенный, также В ГФ РК описаны 5 методов выполнения теста на бактериальные эндотоксины, которые отражены в таблице, сравнение методов между собой, их преимущества и недостатки [4,5]. Имеются также менее чувствительные и редко используемые методы, аналоги ЛАЛ-теста в частности PyroGene™ [6], EndoLisa® и EndoZyme® [7,8]; EAA (Endotoxin activity assay) позволяет проводить анализ активности эндотоксина в крови пациента [9].

Согласно данным, представленным М.Е. Dawson [10], наиболее чувствительным вариантом ЛАЛ-теста является турбидиметрический метод. Наиболее широкий рабочий диапазон имеет кинетический метод с использованием хромогенного пептида. Если в АНД нет указаний метода, используют метод А. АНД устанавливают требования в отношении бактериальных эндотоксинов, выраженные предельной концентрацией эндотоксинов; образец отвечает требованиям, если содержание в нем эндотоксинов не превышает предельной концентрации.

Гель-тромб-тест – это самый простой вариант ЛАЛ-теста, где используется минимальное количество лабораторного оборудования. Если образовался твердый гель-тромб на дне реакционной пробирки, который не разрушается при переворачивании пробирки, то результат считается положительным. Концентрация БЭ в испытуемом образце – это самое высокое полученное разведение, при котором еще наблюдается коагуляция, умноженное на чувствительность ЛАЛ-реактива [11, 12].

Таблица 1 - Сравнение методов ЛАЛ-теста.

Наименование / Тип метода / Характеристика	Применение	Чувствительность	Диапазон эффективности	Преимущества	Недостатки
Метод гелеобразования, качественный метод / Метод А / образование геля в присутствии БЭ.	Если в нормативном документе нет ссылки на другие методы, используют метод А	До 0,03 ЕЭ/мл	Не имеет	• Высокая чувствительность теста; • возможность одновременного испытания нескольких образцов; • короткие сроки выполнения; • низкая себестоимость; • легкая интерпретация результатов • Менее восприимчив к мешающим соединениям.	• Может вызвать факт связывания альбумина с эндотоксинами, в результате чего определение с помощью ЛАЛ-теста становится затруднительным • Не автоматизированный тест, где учет результатов проводят визуально и интерпретируют субъективно; • Невозможно определить точное содержание БЭ; • Наличие значительной погрешности [32].
Полуколичественный метод гелеобразования / Метод В	Применяется, если в нормативном документе	До 0,001 ЕЭ/мл	0,01-0,1 ЕЭ/мл	• Высокая чувствительность позволяет «бороться» с	• Имеются мешающие факторы

	ссылаются на данный метод			мешающими факторами с помощью разведением образцов	
Турбидиметрический кинетический метод / Метод С	Применяется, если в нормативном документе ссылаются на данный метод	До 0,001 ЕЭ/мл	0,001-100 ЕЭ/мл	• Хороший температурный контроль; • индивидуальные контроль каждой лунки; • Возможность добавления в процессе анализа; • Наиболее чувствительный метод.	• Используется самое дорогое оборудование; • Имеются мешающие факторы
Кинетический метод с использованием хромогенного пептида / Метод D	Применяется, если в нормативном документе ссылаются на данный метод	До 0,005 ЕЭ/мл	0,01-0,1 ЕЭ/мл	• Позволяют тестировать образцы, поглащающие при 405 нм.; • Широкий рабочий диапазон;	• Имеются мешающие факторы • Дорогостоящее оборудование
Метод конечной точки с использованием хромогенного пептида / Метод E	Применяется, если в нормативном документе ссылаются на данный метод	До 0,005 ЕЭ/мл	0,005-50 ЕЭ/мл	• Высокая чувствительность позволяет определять мешающие факторы разведением образцов	• Используется самое дорогое оборудование; • Имеются мешающие факторы

Испытания проводят в условиях, исключающих микробное загрязнение.

Гель-тромб-тест на содержание бактериальных эндотоксинов выполняется с применением специальных реактивов и расходных материалов, включающих в себя: КСЭ – контрольный стандарт эндотоксина; ЛАЛ-реактив - *Limulus amoebocyte lysate* - это водный экстракт клеток крови атлантического подковообразного краба; 3) ЛАЛ-вода – вода для инъекций, свободная от бактериальных эндотоксинов; буферные растворы для корректировки pH раствора испытуемого образца, а также апиrogenные расходные материалы для проведения теста. Из оборудования используются весы, мешалка «vortex», термостат или водяная баня.

Перед проведением теста необходимо рассчитать максимально допустимое разведение (МДР), в соответствии с которым готовится испытуемый образец.

При правильном расчете МДР гарантировано получение достоверного результата. В самой первой редакции фармакопейной статьи «Бактериальные эндотоксины» USP ввела определение Maximum Valid Dilution (MVD):

«...Понятие Максимально Допустимого Разведения применимо к Инъекционным лекарственным формам или Растворам для парентерального введения в готовой или разведенной для введения форме...»

В том случае, если в частной статье норма содержания эндотоксина указана в объемных единицах (ЕЭ/мл), для получения значения МДР разделите указанную норму на λ , которая является заявленной чувствительностью лизата, используемого в методе...

...Полученное таким образом значение МДР является предельным значением разведения испытуемого препарата, при котором проводимый тест можно считать достоверным...» [13].

В основном для разведения испытуемого раствора используется вода для ЛАЛ-теста. Основные причины для этого:

- 1) относительно высокая чувствительность ЛАЛ-реактива;
- 2) возможное ингибирование реакции со стороны препарата.

При разведении препарата снижается концентрация действующего вещества и, соответственно, снижается подавляющая способность препарата. При разведении помимо концентрации препарата снижается и концентрация бактериальных эндотоксинов в препарате. Но если они там имеются, то определить их наличие можно благодаря высокой чувствительности ЛАЛ-реактива.

В настоящее время с помощью ЛАЛ-теста можно проверить практически любой лекарственный препарат для парентерального введения. Однако проведение такой проверки в ряде случаев может представлять собой определенные трудности.

Для понимания этих трудностей нужно сначала рассмотреть начальную модель проведения теста, которая является «матрицей» проверки содержания эндотоксина с помощью ЛАЛ-реактива с контрольным стандартом эндотоксина, растворенным в воде. Проще говоря, это реакция, которая происходит с участием только ЛАЛ-реактива и КСЭ. В состав ЛАЛ-реактива входят катионы, являющиеся кофакторами реакции, в реактив может быть добавлен буфер и т.д. Контрольный стандарт эндотоксина представляет собой высокоочищенный липополисахарид грамотрицательных бактерий конкретного штамма. Растворителем для ЛАЛ-реактива и КСЭ является вода для ЛАЛ-теста. Таким образом, реакционная смесь состоит только из двух компонентов: ЛАЛ-реактива и КСЭ, но ЛАЛ-реактив – это смесь белков и различных солей. Для того, чтобы реакция проходила в оптимальных условиях необходимо установить нужное значение pH, а также сбалансировать количество солей. При выполнении всех условий получается результат с достаточно высокой точностью, что является одним из преимуществ ЛАЛ-теста.

Идея метода заключается в том, что фермент фактор С, содержащийся в лизате амёбоцитов мечехвостов *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реагент), реагирует практически только с БЭ, что запускает каскад ферментативных реакций, приводящий к активации свертывающего фермента, который в итоге превращает коагулоген в коагулин, что приводит к образованию геля (гель-тромб и турбидиметрический вариант метода). В случае хромогенной модификации метода вместо коагулогена используется хромогенный субстрат, который гидролизует активированной в присутствии БЭ ферментной системой с образованием окрашенного продукта [14].

При анализе биологических жидкостей методом ЛАЛ-теста важно понимать, что в них могут содержаться компоненты, мешающие проведению реакции с субстратом [15-16]. Во время проведения испытаний следует уделить особое внимание на препараты плазмы крови, в частности, на альбумин.

В связи с тем, что данное связывание носит обратимый характер, содержание БЭ в препаратах альбумина человека при хранении может повышаться, что несет очевидную угрозу здоровью и жизни пациентов. По этой причине в ряде стран все препараты альбумина при выпуске подвергаются двойному контролю на содержание бактериальных эндотоксинов и пирогенов, что позволяет снизить риск повышения БЭ во время хранения [17].

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов – U.S. Food and Drug Administration (FDA) подтвердило, что опубликованные документы USP и Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), регламентирующие методы и способы определения пирогенов, а также допустимые концентрации БЭ, обеспечивают производителей препаратов всей необходимой информацией как на стадиях производства, так и на этапах контроля [18-19].

Результаты и обсуждение

Данный подход позволил внедрить ЛАЛ-тест для контроля производственного процесса на каждой стадии, что дало возможность выявить фактическую пирогенность 45% коммерческих серий препарата альбумина человека, которые считались апиrogenными после

испытаний на кроликах, а также контролировать содержание БЭ в процессе производства с установлением стадий и материалов, наиболее уязвимых для внесения пирогенов.

Несмотря на то, что были разработаны количественные методы определения БЭ как в готовом препарате альбумина, так и на стадиях технологического процесса, имеются определенные сложности при получении достоверных результатов, связанные с ложноположительными и ложноотрицательными результатами [20-23].

Это обусловлено строением молекул эндотоксина, которые связываются с белками альбумина, что приводит к изменению структуры эндотоксина и его активности. При этом считается, что липидные участки молекул эндотоксина, которые участвуют в ЛАЛ-активации, могут соединяться, что в свою очередь приводит к невозможности активирования ЛАЛ-реактива. Появляется обратимое связывание эндотоксина с альбумином, в этом случае в любое время может произойти отсоединение эндотоксина и его преобразование в свободную форму, т.к. во время хранения снижается сорбционная функция альбумина. Стоит отметить, что из всех препаратов крови это свойство присуще только для препаратов альбумина. Это связано с составом молекулы альбумина, в которую входят гомологичные домены, имеющие открытый гидрофобный «карман», посредством которого идет связывание с липидной частью молекулы эндотоксина [24]. Преобразование связанного эндотоксина в свободную форму может являться причиной появления реакции пирогенности, хотя ранее препарат был апиrogenным. Альбумин – это единственная в своем роде молекула, способная связываться с 97–99% любых соединений.

Заключение

Для обеспечения полного перехода эндотоксинов в свободную форму важно тщательное проведение пробоподготовки перед определением эндотоксинов в препарате альбумина. С этой целью предлагаются разные методы, однако, официально разработанной и валидированной методики проведения пробоподготовки препарата альбумина на данный момент не существует. Для проведения пробоподготовки разными авторами предлагается обработка перхлорной кислотой [25], фенольная экстракция [26], метод разведения-нагревания [27]. Однако обычные методы часто оказываются неэффективными либо требуют разведения в 10^6 раз, что является неприемлемым для гель-тромб-теста.

Методы А и В, являются наиболее доступными, для них не требуется считывающего прибора. Кроме того, выполнение гель-тромб теста возможно не только для истинных прозрачных и бесцветных растворов, но и для непрозрачных или окрашенных образцов, а также для суспензий [28]. В кинетических методах (С и D) фотометр измеряет оптическую плотность и определяет ее изменение с меньшей погрешностью измерения по сравнению с гель-тромб тестом. Анализ считается завершенным, когда оптическая плотность достигает наименьшего значения концентрации БЭ на калибровочной кривой [29,30]. Неоспоримым достоинством хромогенного ЛАЛ-теста является возможность точного определения содержания БЭ и значительно более высокая воспроизводимость метода [31].

Таким образом, в качестве преимуществ гель-тромб-теста можно считать: высокую чувствительность теста; возможность одновременного испытания нескольких образцов; короткие сроки выполнения; низкую себестоимость; легкую интерпретацию результатов. Несмотря на большие преимущества метода А и В, гель-тромб тест имеет ограничения, которые указаны в таблице 1 [32].

Но в то же время для гель-тромб-теста характерны следующие недостатки: получение только качественной реакции; использование КСЭ только с подходящим для него ЛАЛ-реактивом, прописанным в сертификате; использование только апиrogenной посуды из щелочного стекла; возможность получения как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов испытаний; перерасход реактивов и расходных материалов из-за неправильно проведенных расчетов МДР.

Список использованной литературы

1. Лиганды для селективного удаления бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий./Копицына М.Н., Морозов А.С., Бессонов И.В. и др.//Журн. микробиол. – 2017. - № 3. – С. 115-126.

2. Сорбенты для экстракорпорального удаления токсических веществ и молекул с нежелательной биологической активностью (обзор). Морозов А.С., Бессонов И.В., Нуржидина А.В., Писарев В.М.// *Общая реаниматология*. – 2010 – Т. 12 (6). – С. 82–107. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-6-82-107.
3. Anisimova N.Yu. Immunological pathogenesis of sepsis and use of hemosorption for treatment of cancer patients with sepsis. - N.Y.: Nova Science Publishers Inc. – 2014. – P. 57–114.
4. Дерябин П.Н. «2.6.14. Бактериальные эндотоксины». Тулегенова А.О. Государственная фармакопея Республики Казахстан. - Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2002. - 592 с.
5. Williams K.L. (ed.). Endotoxins: pyrogens, LAL testing, and depyrogenation. 2nd ed. - N.Y.: Marcel Dekker Inc, 2001.
6. http://bio.lonzac.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_PyroGene_Product_Insert_0005.pdf 14.
7. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection. *Nature methods*.// *Application notes*. – 2011. – V. 3-5. – P. 15.
8. <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection.html> <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection.html> 16.
9. Foster D.M., Derzko A.N., Keffer J.H. Can sepsis be better defined? Contribution of a novel assay for endotoxin.//*Clin. Microbiol. Newslet.* – 2004. – V. 26 (3). – P. 17-21. DOI: 10.1016/S0196-4399(04)90010-4.
10. Dawson M.E. A wealth of options. Choosing an LAL test method. Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hole, Massachusetts // *LAL Update*. - 1995. - V. 13 (3). - P. 1–6.
11. Application of the classic Limulus test and the quantitative kinetic chromogenic LAL method for evaluation of endotoxin concentration in indoor air/ Gorny R.L., Douwes J., Versloot P. et al. // *Ann Agric Environ Med.* - 1999. - V. 6. P. - 45–51.
12. USP XXIV. United States Pharmacopeia Convention, Inc. Rockville, MD. (2000).
13. Особенности контроля препаратов альбумина человека на содержание бактериальных эндотоксинов./ Кукунина Т.В., Исрафилов А.Г., Романенкова М.Л. и др.//*Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2018. – № 2. – С. 100-109.
14. Ситников А.Г. ЛАЛ–тест. Современные подходы к определению пирогенности. - М.: Москва, 1997. - 96 с.
15. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an End-Product Endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.//Rockville MD: US Food and Drug Administration, 1987. – 54 p.
16. Interim guidance for human, veterinary drug products, and biologicals: kinetic lal techniques.//Rockville MD: US Food and Drug Administration, 199. – 10 p.
17. Chapter <85>. Bacterial Endotoxins Test // United States Pharmacopeia 36. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2012. - 90 p.
18. Chapter <161>. Transfusion and Infusion Assemblies and Similar Medical Device // United States Pharmacopeia 36, 2012. - 131 p.
19. ANSI/AAMI ST72:2011 (R) 2016. Bacterial endotoxins – Test methods, routine monitoring, and alternatives to batch testing. Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, VA, 2011.
20. Gardi A., Arpagaus G. The Limulus Amebocyte lysate test, a useful tool for the control of plasma fractions.// *Develop. Biol. Standard.* - 1977. - V. 34. - P. 21–26.
21. Limulus Amebocyte lysate testing in normal serum albumin (human)./ Hochstein H.D., Seligmann E.G., Marquina R.B., Rivera E. *Develop. Biol. Standard.* - 1979. - V. 44. - P. 35–52.
22. Levin J., Tomasulo P.A., Oser R.S. Detection of endotoxemia in human blood and demonstration of an inhibitor.//*J. Lab. Clin. Med.* - 1970. - V. 75. - P. 903–911.
23. Skames R.C., Ann N.Y. The inactivation of endotoxin after interaction with certain proteins of normal serum.//*Acad. Sci.* - 1966. - V. 133. - P. 644–662.
24. David S.A., Balaram P., Mathan V.I. Characterization of the interaction of lipid A and lipopolysaccharide with human serum albumin: implications for an endotoxin carrier function for albumin.//*Journal of Endotoxin Research.* - 1995. - V. 2, № 2. - P. 99–106.
25. Obayashi T. Addition of perchloric acid to blood samples for colorimetric limulus test using chromogenic substrate: comparison with conventional procedures and clinical applications.//*J. Lab. Clin. Med.* - 1984. - V. 104 (3). - P. 321–330.
26. Westphal O., Luderitz O., Blister F. Extraction of bacteria with phenol/ water.//*Naturforsch. B: Anorg. Chem. Org. Chem. Biochem. Biophys. Biol.* - 1952. - V. 7B. - P. 148–155.
27. Roth R.I., Levin F.C., Levin J. Optimization of detection of bacterial endotoxin in plasma with the Limulus test.//*J. Lab. Clin. Med.* - 1990. - V. 116 (2). - P. 153–161.
28. Joiner T.J., Kraus P.F., Kupiec T.C. Comparison of Endotoxin Testing Methods for Pharmaceutical Products.//*International Journal of Pharmaceutical Compounding.* - November/December 2002. - Vol.6, No. 6, - P. 408-409.
29. Williams K.L. Endotoxins Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation third edition, 2007.
30. Bacterial endotoxins – Test methodologies, routine monitoring, and alternatives to batch testing, Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2002/R2010.

31. Методы определения бактериального эндотоксина в медицине критических состояний (обзор)./Копицына М.Н., Морозов А.С., Бессонов И.В., Писарев В.М.//Общая реаниматология. – 2017. – Т. 13, № 5.- С. 109-120.

32. Шаповалова О.В., Неугодова Н.П., Сапожникова Г.А. Выбор метода определения бактериальных эндотоксинов.//Антибиотики и химиотерапия. – 2018.- Т. 63.- С. 5-6.

Автор для корреспонденции: Нагуманова Гульбакыт Смановна - специалист I категории микробиологической лаборатории, магистр естественных наук. РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» Комитета контроля качества и безопасности товаров и услуг МЗ РК; эл.почта: gulbakyt_n@mail.ru, тел: 8 (702) 539 59 48.

ГТАМБ 76.03.43

УДК [616.24-002.7:579]-078

МЕДИЦИНАЛЫҚ ҚЫЗМЕТКЕРЛЕР АРАСЫНДА АЛТЫН ТҮСТІ СТАФИЛОКОКК ТАСЫМАЛДАУШЫЛАРДЫ АНЫҚТАУ ЖИІЛІГІ

Н.В. Калина¹, С.К. Бисимбаева¹, Н.Б. Шакетаева², С.К. Атыгаева³

¹«№ 1 Көпбейінді қалалық ауруханасы» ШЖҚ МҚК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²«№ 2 Көпбейінді қалалық балалар ауруханасы» ШЖҚ МҚК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

³«Көпбейінді медициналық орталық» ШЖҚ МҚК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Мақалада екі жыл ішінде медициналық персоналдағы *Staphylococcus aureus* тасымалдаушының сандық және сапалық сипаттамалары зерттелген.

Түйінді сөздер: *Staphylococcus aureus*, медициналық персонал, *Staphylococcus aureus* тасымалдаушылары.

THE FREQUENCY OF IDENTIFICATION OF CARRIERS OF GOLDEN STAPHYLOKOKK AMONG MEDICAL STAFF

N. Kalina¹, S. Bisimbaeva¹, N. Shaketaeva², S. Atygayeva³

¹State utility company on the right of economic management "Multidisciplinary city hospital № 1", Nur-Sultan city, Kazakhstan

²State utility company on the right of economic management "Multidisciplinary city children's hospital № 2", Nur-Sultan city, Kazakhstan

³State utility company on the right of economic management «Multidisciplinary Medical Center», Nur-Sultan city, Kazakhstan

The article studies the quantitative and qualitative characteristics of *Staphylococcus aureus* carriage in medical personnel for two years.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, medical staff, carriers of *Staphylococcus aureus*.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ НОСИТЕЛЬСТВА ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА СРЕДИ МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА

Н.В. Калина¹, С.К. Бисимбаева¹, Н.Б. Шакетаева², С.К. Атыгаева³

¹ГКП на ПХВ «Многопрофильная городская больница № 1», Нур-Султан, Казахстан

²ГКП на ПХВ «Многопрофильная городская детская больница № 2», Нур-Султан, Казахстан

³ГКП на ПХВ «Многопрофильный медицинский центр», Нур-Султан, Казахстан

В статье изучена количественная и качественная характеристики носительства золотистого стафилококка у медицинского персонала за два года

Ключевые слова: золотистый стафилококка, медицинский персонал, носители золотистого стафилококка.

Кіріспе

Staphylococcus aureus тудыратын стафилококтық инфекциялардың алдын алу мәселесі қазіргі заманғы медицина мен денсаулық сақтауда әлі де өзекті болып отыр. Оңкоагулазды стафилококктықтар - тері мен шырышты қабықтардың мекендеушілері болып табылады. Бір

жағынан, олар дені сау адамдарда - бактерия тасымалдаушыларда кездеседі, екінші жағынан ауыр инфекцияларды тудыруға қабілетті қауіпті микроорганизмдер болып табылады [1]. Бактерия тасымалдауда макроорганизмді қорғау механизмдерін қайта құру орын алғаны белгілі, яғни қоздырғыштың өмір сүруі (персистирлеу) және бактерия тасымалдаушылықтың резиденттік түрінің одан әрі дамуы үшін жағдайлар жасалады.

Резиденттік бактерия тасымалдаушылықтың маңызды клиникалық мәні стафилококктардың сыртқы жабындары мен шырышты қабықтарынан кең спектрлі аурулардың дамуымен ағза иесінің ішкі ортасына тасымалдау процесімен анықталады. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) тасымалдаушылары тыныс алу органдары ауруларын дамыту бойынша "қауіп тобы" болып табылады. Патогенді стафилококктардың тасымалдауы мен жоғарғы тыныс алу жолдарындағы қабыну процестері арасында корреляциялық байланыс орнатылған [1], іріңді гайморит қоздырғыштарының стафилококктарының және науқастардың мұрынның алдыңғы бөлігінің шырышты қабығында вегетациялайтын стафилококктардың ұқсастығы анықталды [2]. *S. aureus* мұрын тасымалдаудағы рөлі науқастарда аутоинфицирлеу арқылы жаралы инфекциялар пайда болғаны дәлелденген.

Стафилококк бактериясының тасымалдаушылығының патогенезі резиденттік бактерия тасымалдаушылардың хирургиялық стационарлардағы емделушілерде стафилококкококк инфекцияларының пайда болуының негізгі көздері болып табылуымен байланысты [1]. Перзентханаларда, перинаталдық орталықтарда бактерия тасымалдаушылар аса қауіп төндіреді, себебі иммундық тапшылық жағдайы бар пациенттер-жаңа туған нәрестелер мен босанған әйелдер жұқтырылады.

Тақырыпты таңдау емдік-алдын алу мекемелерінде ауруханаішілік инфекциялардың таралуының жоғары деңгейіне байланысты болып келеді.

Медицина қызметкерлері арасында стафилококкококк тасымалдаушылығының таралуы және *S. aureus* антибиотикке төзімді штаммдарының бөліну жиілігі бойынша – еуропалық елдерде медицина қызметкерлерінің 50%-ына дейін стафилококкококк тасымалдаушылары болып табылады, бұл ретте бөлінген штаммдардың 25%-ы MRSA-ға (метициллинрезистентті *S. aureus*) тиесілі; РФ-да медицина қызметкерлерінің 35%-ына дейін стафилококк тасымалдаушылары болып табылады және барлық бөлінген штаммдар MRSA ретінде сәйкестендірілді [4,5].

Медициналық персоналда алтын түсті стафилококктарды персистирлеу осы микроорганизмдердің қоршаған ортада таралуына ықпал етеді, сондықтан медициналық персонал арасында алтын түсті стафилококктарды мұрын арқылы тасымалдануына анықталуға және емделуге тиіс, бұл стационарда стафилококктық жайылуын бақылай алады.

Алтын түсті стафилококк тасымалдауы транзиторлы (өтпелі) немесе тұрақты болады, бұл түрдің ерекшеліктеріне, ағзаның жай-күйіне және бәсекелес микрофлораға байланысты болады. Тұрақты тасымалдаушыларда алтын түсті стафилококктың бір түрі бірнеше ай және жыл бойы анықталады. Ұзақ уақыт бақылаулар адамдардың шамамен 20% (12-30%) тұрақты тасымалдаушыларға, 30% (16-70%) - транзиторға жататынын, ал 50% (16-69%) алтын түсті стафилококк анықталмайтынын көрсетеді.

Жұмыстың мақсаты

2018-2019 жж. аралығында медицина қызметкерлерінде алтын стафилококкты тасымалдаушылықтың сандық және сапалық сипаттамаларын анықтау және зерттеу болып табылды.

Материалдар мен әдістер

Стафилококктық бактерия тасымалдаушылыққа микробиологиялық зертханада 8437 дені сау адам тексерілді.

Материалды алу бактериологиялық зертхананың мамандарымен жүзеге асырылды. Бактериологиялық зерттеу және оның нәтижесін есепке алу Қазақстан Республикасы Ұлттық экономика министрлігінің тұтынушылардың құқығын қорғау комитет Төрағасының 5.12.2016 ж. № 191-ОД «Медициналық ұйымдарда санитариялық-профилактикалық және санитариялық-

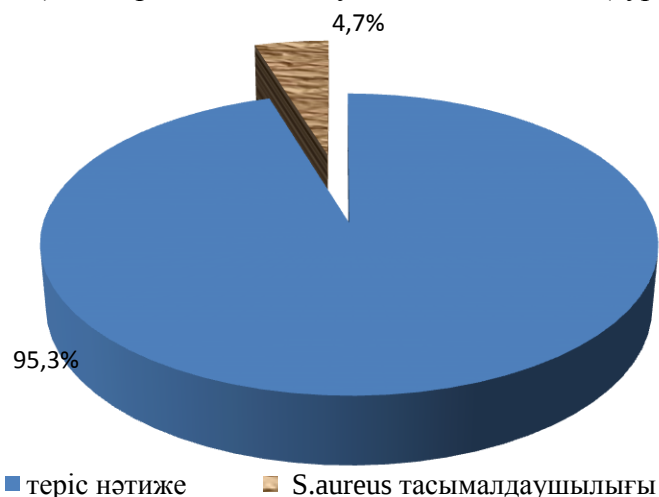
эпидемияға қарсы іс-шараларды жүргізу сапасын зерттеудің бактериологиялық әдістері» әдістемелік ұсынымдарды бекіту туралы бұйрығына сәйкес жүргізіледі.

Жылдың қысқы және көктемгі кезеңінде персоналдың патогенді стафилококк тасымалдаушылығының артуы тән болып табылады.

Бір уақытта хирургиялық бөлімшелерде сыртқы ортадан *S. aureus* бөлінуімен өзара байланыс орнатылды.

Нәтижелер мен талқылаулар

Бактериологиялық тексеру барысында *S. aureus* мұрын тасымалдаушылығына 8 437 адам резиденттік типті 397 (4,7%) бактерия тасымалдаушысы анықталды (сурет).



Сурет - 2018-2019 жж. *S. aureus* мұрын арқылы тасымалдаушылығының оң нәтижелерді анықтау үлесі.

Кестеден көрініп тұрғандай, патогенді стафилококктың тасымалдаушылығын анықтау үшін қызметкерлердің 2018 ж. бастап 2019 ж. зерттеулерін салыстыру кезінде өзгеріссіз қалды. Ал тасымалдаушылыққа тексерілген адамдардың саны 2019 ж. 1,4 есе артты.

Кесте - 2018-2019 жж. кезеңінде стафилококкты тасымалдаушылыққа тексерілген медициналық персоналдың саны.

Зерттеу жылы	Барлығы тексерілді	Теріс нәтиже	<i>S. aureus</i> тасымалдаушылығы
2019 жыл	4966	4732	234
2018 жыл	3471	3308	163
Барлығы	8437	8040	397

Барлық зерттелетін адамдар алтынтүсті стафилококктың симптомсыз тасымалдаушылары болды. Дисбиотикалық жағдайлардың дамуын болдырмау үшін тек резиденттік бактерия тасымалдаушыларды, яғни қоршаған ортаға патогенді стафилококктарды ұзақ және табанды бөліп тұратын тұлғаларды ғана санациялау қажет, ал транзиторлы түрдегі микрофлора ағзадан өлу немесе бактерия бөлу нәтижесінде элиминациялайды және оған қатысты санациялау іс-шараларын жүргізу талап етілмейді [5].

Қорытынды

1. Алынған деректердің орташа статистикалық көрсеткіштерімен салыстырмалы сипаттамасы қорытынды жасауға мүмкіндік береді: алынған зерттеу нәтижелері медициналық қызметкерлер арасында транзиторлық стафилококкты тасымалдаушылықтың таралу дәрежесі бойынша орташа статистикалық деректерге сәйкес келеді, сондай-ақ *S.aureus* штамдарының бөліну жиілігі бойынша әдеби және статистикалық деректерге сәйкес келеді.

2. Медициналық қызметкерлер арасында стафилококкты тасымалдаушыларды ерте анықтау дер кезінде кәсіби кеңес алуға және қажет болған жағдайда тасымалдаушыларды санациялауға мүмкіндік береді.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1. Киргизова С.Б. Опыт применения препарата индуктора интерферона Циклоферон при назальном носительстве *S. aureus* // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 6. - С. 21-27.

2. Исмаилова Н.Ф., Кожевникова Ю.П., Соколова Е.В. Сравнительная характеристика носительства золотистого стафилококка у студенток ООМК специальности «акушерское дело»//Успехи современного естествознания. - 2014. - № 6. - С. 146-147.

3. Perl T.M., Golub J.E. New approaches to reduce *Staphylococcus aureus* nosocomial infection rates: treating *S.aureus* nasal carriage.//Ann Pharmacother. – 1998. – V. 32 (1). – P. 7-16.

4. Hospital staff and nasal carriage. In: Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*./ Frank U., Lenz W., Damrath E. et al.// Ed. J.W.M. van der Meer. Ibid. – P. 15-19.

5. Van der Meer. J.M.M. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*. In: Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*. Ed.: J.W.M. van der Meer. Ibid; 1-2.

Автор для корреспонденции: Калина Н.В. - Заведующая лабораторией микробиологических исследований, к.м.н., доцент, ГКП на ПХВ «Многопрофильная городская больница № 1»; эл. почта: natalya_kalina@mail.ru, 8(701) 554 35 49.

МРНТИ 76.29.50

УДК 616.831.9-002.155

ФОРМЫ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ И ИХ ПОСЛЕДСТВИЯ. ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН ЗА 2017-2019 ГОДЫ

З.Т. Аушахметова¹, Т.К. Тунгушбаев¹, А.Н. Жасанова¹, О.В. Хегай¹, И.А. Каусова¹, С.С. Қожахметов², Н.Б. Рахметова³

¹РГП на ПХВ «НЦЭ» КККБТУ МЗ РК, Нур-Султан, Казахстан

²National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Нур-Султан, Казахстан

³НАО «Медицинский университет Астана», Нур-Султан, Казахстан

Данная статья посвящена изучению динамики заболеваемости менингококковой инфекции в Республике Казахстан за 2017-2019 годы. Дан анализ серогрупповой принадлежности выделенных культур *Neisseria meningitidis* за 2017-2019 годы.

Ключевые слова: менингококковая инфекция, серогруппы.

FORMS OF MENINGOCOCCAL INFECTION AND THEIR CONSEQUENCES. ETIOLOGICAL AGENTS OF MENINGOCOCCAL DISEASES INFECTIONS IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN FOR 2017-2019

Z. Aushakhmetova¹, T. Tungushbaev¹, A. Zhasanova¹, O. Hegay¹, I. Kausova¹, S. Kozhakhmetov², N. Rakhmetova³

¹RSE on the REM "SCE" CQSGS MHRK in Nur-Sultan city, Kazakhstan

² National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Kazakhstan

³NcJSC "Astana Medical University", Nur-Sultan city, Kazakhstan

This article is devoted to the study of the dynamics of the incidence of meningococcal infection in the Republic of Kazakhstan for 2017-2019. The affinity analysis of serogroup of isolated *Neisseria meningitidis* cultures for 2017-2019 was carried out.

Key words: meningococcal infection, serogroups, meningitis, incidence.

МЕНИНГОКОККТЫ ИНФЕКЦИЯЛАРДЫҢ ФОРМАЛАРЫ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ АСҚЫНУЛАРЫ. 2017-2019 ЖЫЛДАР АРАЛЫҒЫНДА ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНДА МЕНИНГОКОККТЫҚ ИНФЕКЦИЯ АУРУЛАРЫНЫҢ ЭТИОЛОГИЯЛЫҚ АГЕНТТЕРІ

З.Т. Аушахметова¹, Т.Қ. Тұңғышбаев¹, А.Н. Жасанова¹, О.В. Хегай¹, И.А. Каусова¹, С.С. Қожахметов², Н.Б. Рахметова³

¹ҚР ДСМ ТҚСҚК «ҒСО» ШЖҚ РМК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

³«Астана медицина университеті» КеАҚ, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Бұл мақала Қазақстан Республикасында 2017-2019 жж аралығында менингококкты инфекциялық аурулардың динамикасын зерттеуге арналған. 2017-2019 жж аралығындағы бөлінген *Neisseria meningitidis* дақылдарының серотоптарына талдау жасалған.

Түйін сөздер: менингококкты инфекция, серотоптар.

Введение

Причины заболеваемости менингококковой инфекции являются предметом пристального внимания науки и практического здравоохранения всего мира. Менингококковая инфекция, хотя не является ведущей нозологией в структуре инфекционной патологии у детей, относится к числу наиболее тяжёлых инфекционных заболеваний детского возраста [1]. В последние годы заболеваемость менингококковой инфекции сохраняется на спорадическом уровне: 2,0-3,0 на 100 тыс. населения, но имеются территории с устойчивым ростом заболеваемости менингококковой инфекции [2,3]. Ежегодно в мире регистрируется более 1,2 миллиона случаев бактериальных менингитов.

Согласно статистическим данным, мониторинг заболеваемости пик заболеваемости общего количества менингитов по Казахстану в целом был отмечен в 2014 г. и составил 5,52%. В последующие годы наметилась тенденция к снижению данного показателя, так, к 2015 году – в 1,2 раза, к 2016 году – в 1,3 раза, по состоянию на конец 2017 года уровень заболеваемости (по сравнению с 2014 г.) уменьшился в 2,5 раза [4,5].

По данным экспертов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, 2015) и ученых других научно исследовательских организаций в развитых странах неврологические осложнения у пациентов с БМ наблюдаются в 15%, а смертность составляет 5% [6]. По данным R. Dwiłow, S. Fanella [7], частота этого заболевания и связанных с ним смертей в развивающихся странах продолжает расти. Поэтому для эффективного управления инфекцией важно диагностировать это заболевание и начать адекватную терапию уже с первых часов болезни, что определяет необходимость выявления современных клинических особенностей течения и адекватной диагностики уже на ранних этапах развития инфекции [8-10].

Цель

Определить этиологические агенты заболевания и провести лабораторный надзор за циркуляцией возбудителей менингита.

Материалы и методы

Материал для анализа был собран со всех регионов Казахстана. Сбор образцов производился в 16-ти филиалах Национального центра экспертизы (далее НЦЭ). Материалом для анализа служили чистые бактериальные культуры, и спинномозговая жидкость (ликвор), носоглоточная слизь, кровь. Чистые культуры были получены высевом на шоколадный агар. Условия культивирования: 18 - 24 ч инкубации при температуре (37±1)°C в атмосфере 5 - 10 % CO₂. Для идентификации возбудителей был использован набор для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени АмплиСенс® *N. meningitidis*/ *H. influenzae*/ *S. pneumoniae*-FL (ЦНИИ эпидемиологии). Серогруппирование *N. meningitidis* осуществлялось с использованием латекс-агглютинации, тест BIO–RADPASTOREX™ MENINGITIS.

Результаты и обсуждение

В общей сложности за период с 2017 по 2019 годы филиалами НЦЭ обследованы с подозрением на менингококковую инфекцию 202 613 человек из которых 190 показали положительный результат (рисунок 1).

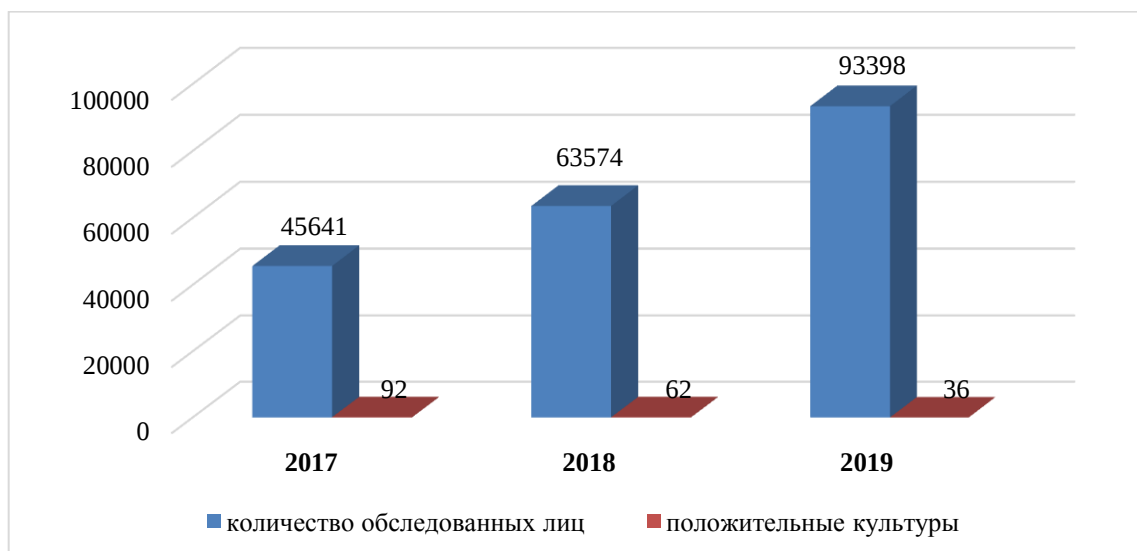


Рисунок 1 - Количество исследований на менингококковую инфекцию в РК за 2017 – 2019 гг. в филиалах «НЦЭ» КККБТУ МЗ РК.

Чаще всего за данный период времени выделяли *N. meningitidis* серогруппы В и С (рисунок 2).

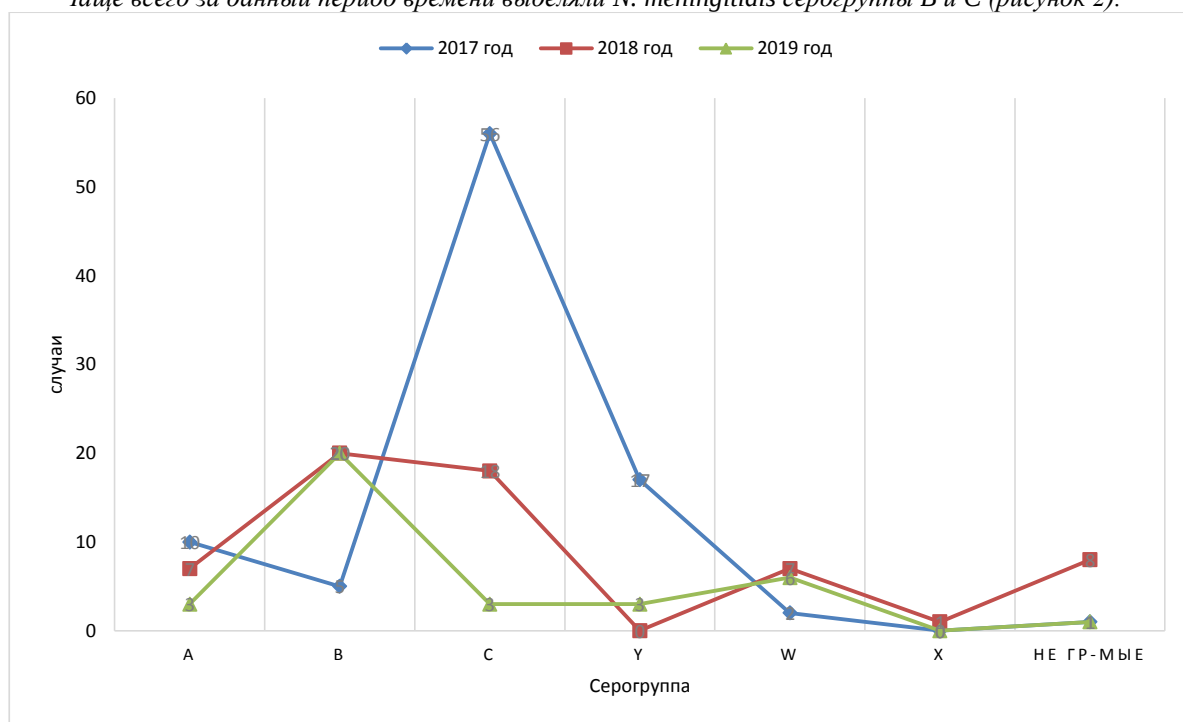


Рисунок 2 - Распределение по серогруппам в РК за 2017-2019 годы.

За 2017 год процентное соотношение по микробному пейзажу составляло: серогруппа «С» - 60,9%, «Y» - 18,5%, «А» - 10,8%, «В» - 5,4%, «W» - 2,2%, «не группируемые» - 1,1%, *S. pneumoniae* – 1,1%. Сравнение полученных данных с опубликованными ВОЗ в 2017 году «Отчет экспертной группы, Женева 2017» показал, что основным этиологическим агентом в менингитном поясе была серогруппа «С» на долю которой приходилось 35% всех вызванных заболеваний [7]. В 2018 году: «В» - 32,2%, «С» - 29,0%, «не группируемые» - 13,0%, «А» - 11,3%, «W» - 11,3%, «X» - 1,6%, *S. pneumoniae* – 1,6%. Процентное соотношение выделенных культур в 2019 году составило: «В» - 55,6%, «W» - 16,7%, «А» - 8,3%, «Y» 8,3%, «С» - 8,3%, «не группируемые» - 2,8%.

Данные эпиднадзора показали, что частота и распространенность различных серогрупп ежегодно меняется, в 2017 году основным возбудителем являлась серогруппы «С, Y», в 2018 серогруппа «В, С», в 2019 серогруппа «В, W». За проанализированный период наблюдается

плавное снижение заболеваемости менингитом вызванных *N. meningitidis*. С 2017 по 2019 год заболеваемость снизилось в три раза.

Выводы

1. Динамическое распределение различных серогрупп в проанализированном периоде подчеркивает необходимость эпиднадзора для своевременного информирования для политики вакцинации.

2. Клиническое значение исследования на менингококковую инфекцию заключается в подтверждении этиологии заболевания, что позволяет назначить наиболее эффективную терапию.

3. Эффективная и точная микробиологическая диагностика бактериальных менингитов служит основанием для определения конкретного набора антибиотиков и других вариантов лечения пациента.

Список литературы

1. Данные исследований и отчетов Национальной референс лаборатории по менингококковой инфекции РГП на ПХВ «НЦЭ» КККБТУ МЗ РК по г. Нур-Султан.
2. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. – Москва, 2002.
3. World Health Organization & Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) (2011). Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by neisseria meningitidis, streptococcus pneumoniae, and haemophilus influenzae: WHO manual, 2nd ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70765>.
4. Здоровье населения Республики Казахстан и деятельность организаций здравоохранения в 2018 году/ Юрченко И.В., Сабыров Г.С., Абдильдина З.Ж. и др.// Сб. стат. – Нур-Султан, 2019. – 324 с.
5. Incidence of meningococcal disease in children in Astana city/ // International Journal of Infectious Diseases /Seidullayeva A.Z., Zhxylykova G.A., Bayesheva D.A et. al.// Prossed. 6th internat. Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2016). – Vienna, 2016. – Vol. 53S. – P. 92.
6. 17-Global burden of disease estimates / World Health Organization // https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/03.01.2017.
7. Dwirow R., Fanella S. Invasive meningococcal disease in the 21st. //Curr Neurol Neurosci Rep. – 2015. – V. 15 (3). –P. 2. doi: 10.1007/s11910-015-0524-6.
8. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник в 2-х томах/Под ред. Академика РАМН В.В. Зверева, профессора М.Н. Бойченко. - Т.2. – М: ГОЭТАР-Медия. – 2011. - 480 с.
9. Ющук Н.Д. Эпидемиология инфекционных болезней: Учебное пособие. – Москва: ГОЭТАР-Медия. – 2016. – 496 с.
10. Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных менингитов: Методические рекомендации № 288 от 15.12.2015 г.
11. Serogroup C in the meningitis belt: What is next? Report of WHO expert group meeting. World Health Organization. - Geneva, Switzerland 2017.

Автор для корреспонденции: Рахметова Н.Б. - доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. Ш.И. Сарбасовой; эл. почта: nurilaberkenovna@gmail.com.

МРНТИ 76.33.35+34.27.39

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЙОГУРТА НА ОСНОВЕ ВЕРБЛЮЖЬЕГО МОЛОКА

Э. Нағызбекқызы, Д.Ж. Сембаева, А. Сарсенова, Г.А. Данлыбаева, Н.Б. Молдагулова
ТОО «Экостандарт.kz», Нур-Султан, Казахстан

Целью данного исследования было приготовление биойогурта из верблюжьего молока. Для определения качества полученного йогурта контрольные и опытные варианты сравнивали между собой, и все параметры были проанализированы в соответствии со стандартными процедурами. Йогурт с приемлемой консистенцией был получен из верблюжьего молока с использованием 4% сухого обезжиренного молока, 3,5% кукурузного крахмала и 2% стартерной культуры, и последующим инкубированием смеси при 38±1°C в течение 10 часов. Пробы йогурта из верблюжьего молока, нормализованного сухим коровьим обезжиренным молоком (далее СОМ) с кукурузным крахмалом были наиболее приемлемыми по сравнению с другими пробами йогурта.

Ключевые слова: биойогурт, технология, верблюжье молоко, кукурузный крахмал, загустители.

TECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF BIO-YOGURT BASED ON CAMEL MILK

E. Nagyzbekkyzy, D. Sembaeva, A. Sarsenova, G. Danlybaeva, N. Moldagulova

«Ecostandart.kz» LLP, Nur-Sultan cit, Kazakhstan

The objective of this study were to prepare bio-yogurt from camel milk. To determine the quality of the yogurt obtained, the control and experimental variants were compared with each other, and all parameters were analyzed in accordance with standard procedures. An acceptable consistency of yogurt was obtained from camel milk using 4% skimmed milk powder, 3.5% corn starch and 2% starter culture, followed by incubation of the mixture at $38 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 hours. Samples of camel milk normalized with dry cow skim milk and corn starch were the most acceptable in comparison with other yogurt samples.

Keywords: bio-yogurt, technology, camel milk, corn starch, thickeners.

ТҮЙЕ СҮТІНЕ НЕГІЗДЕЛГЕН БИОЙОГУРТТЫ АЛУ ТЕХНОЛОГИЯСЫ

Е. Нағызбекқызы, Д.Ж. Сембаева, А. Сарсенова, Г.А. Данлыбаева, Н.Б. Молдағұлова

«Ecostandart.kz» ЖШС, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Бұл зерттеудің мақсаты түйе сүтінен биойогурт дайындау. Алынған йогурттың сапасын анықтау үшін эксперименттік нұсқалар бір-бірімен салыстырылып бақыланды, барлық параметрлер стандартты рәсімдерге сәйкес талданды. Түйе сүтіне 4% майсыздандырылған сүт ұнтағы, 3,5% жүгері крахмалы және 2% стартерлі культура қосу арқылы жәнәсодан кейін қоспаны 10 сағат бойы $38 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада инкубациялау нәтижесінде йогурттың қолайлы консистенциясы алынды. Құрғақ майсыздандырылған сиыр сүті және жүгері крахмалы қосылған қалыпқа келтірілген түйе сүтінен жасалған йогурттың үлгілері басқа йогурттармен салыстырғанда анағұрлым қолайлы болды.

Түйінді сөздер: биойогурт, технология, түйе сүті, жүгері крахмалы, қоюлатқыштар.

Введение

С давних пор человечеству известно об уникальности верблюжьего молока и его положительных свойствах на здоровье человека в целом [1-4].

В последние годы различными исследователями были предприняты попытки сделать йогурт из верблюжьего молока [5-7]. Производство йогурта из верблюжьего молока по той же технологии, предназначенной для коровьего молока, оказалось невозможным из-за присущих верблюжьему молоку характеристик. Для улучшения органолептических свойств ферментированного молочного продукта в верблюжье молоко добавляли сухое обезжиренное молоко [8,9], или стабилизаторы [6], а также микробиологическую транслугтаминазу, изолированную от *Streptovorticillium mobaraense* (MTGase).

Цель

Приготовление биойогурта на основе верблюжьего молока.

Материалы и методы

Свежее верблюжье молоко было собрано из стада социально-предпринимательской корпорации (СПК) «Желмая», Туркестанская обл., село Саналы, Казахстан. Образцы верблюжьего молока сразу после сбора помещали в стерильный контейнер и транспортировали в лабораторию с помощью транспортируемой холодильной камеры, содержащей пакеты ледяных блоков, и до проведения лабораторного анализа хранили при 4°C в холодильнике.

Лиофилизированные культуры молочнокислых бактерий (не менее 10^7 КОЕ/мл) были получены нами в ходе выполнения научного проекта, заказчиком которого является КН МОН РК, Казахстан.

Значения pH образцов йогурта измеряли с использованием цифрового pH-метра со стеклянным электродом (Thermo Orion 3 Star pH meter, Thermo Scientific USA), после его калибровки использовали стандартные буферные растворы с pH 4,01 и 9,18. Измерения были сделаны трижды для каждого образца йогурта. Титруемую кислотность йогурта определяли с использованием метода, описанного [10]. Синерезис (отделение сыворотки) определяли по [11]. Сенсорный анализ образцов йогурта осуществляли в соответствии с методом, описанным [12].

Статистический анализ. Данные были проанализированы с использованием среднего показателя, квадратичного отклонения средней, уровня вероятности доверительного интервала

p. Непрерывные данные были представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD), а категориальные данные - как частота (процент). Результаты считали достоверными, если вероятность ноль-гипотезы не превышала или была равна 0,05 ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Для производства кисломолочных продуктов использовали цельное верблюжье молоко (ВМ), кислотностью $0,193 \pm 0,7$, содержащее не более 500 тысяч соматических клеток в 1 см^3 , первого класса по редуктазной пробе, первой группы чистоты, второго класса по сычужно-бродильной пробе.

Для приготовления биойогурта использовали бактериальную закваску - йогуртная закваска из штаммов МКБ, активность которых составляла не менее 10^7 КОЕ/мл, в количестве 2% от массы смеси. Используемые в этой работе заквасочные культуры были выделены и идентифицированы нами до вида по локусу гена 16 SrRNA в ходе выполнения данной исследовательской работы.

Приготовление йогурта

Свежее верблюжье молоко было нормализовано с помощью добавления СОМ в концентрации 4% (от объема молока). Верблюжье молоко было разделено на четыре партии по 100 мл. Одна партия, которая рассматривалась как контроль, была переработана в йогурт без добавления загустителя (проба - Контроль). В остальные три партии, одновременно с СОМ были добавлены загустители (кукурузный крахмал (КК), к-каррагинан (к-кар) или альгинат (ALG), в концентрациях 3,5; 0,1 или 0,5% соответственно (от объема молока). Пробы были пастеризованы при $(80 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин в термостатически контролируемой водяной бане с последующим охлаждением до $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Подготовка йогуртов проиллюстрирована на блок-схеме ниже. Йогурт был изготовлен в соответствии с протоколом, предложенным А.У. Tamime and R. Robinson [13] в трех повторностях с некоторыми модификациями (рисунок).

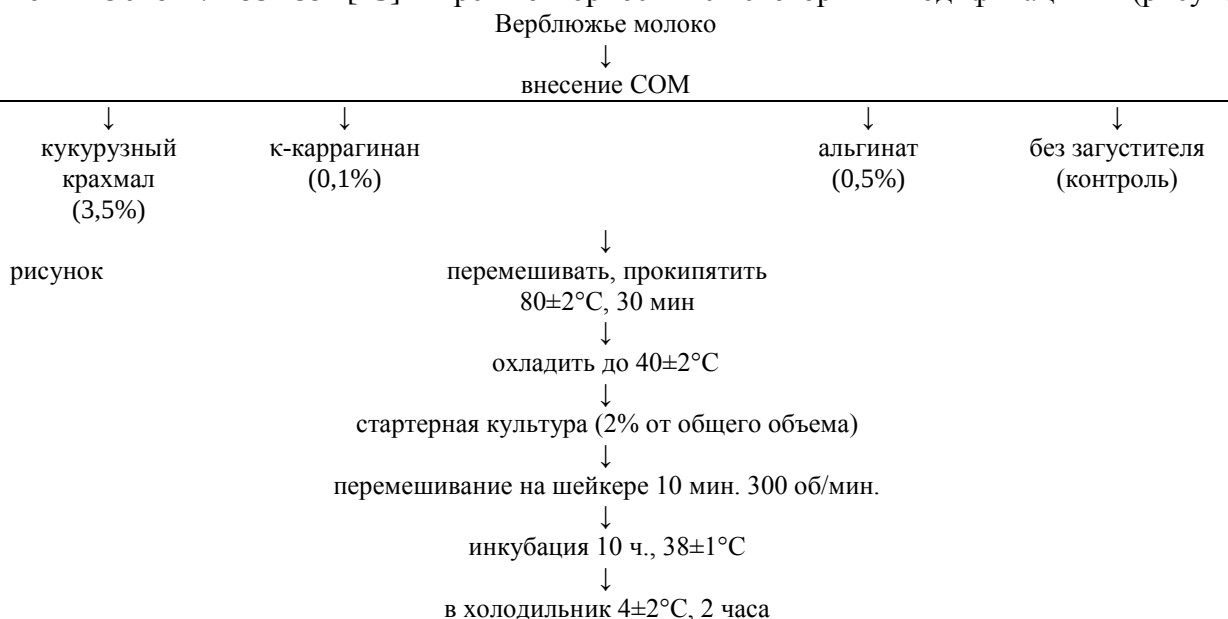


Рисунок - Этапы производства йогурта из верблюжьего молока.

Время и температура ферментации

Было исследовано влияние добавления СОМ, КК, к-кар и ALG на время ферментации образцов йогурта из верблюжьего молока. Время ферментации изучали от 3-4 часов до 18 часов. По данным S.A. Ibrahim and E.M. El ZubeirI. [7], верблюжье молоко коагулируется дольше (17 ч.), чем овечье молоко. В наших экспериментах, время ферментации йогуртов, нормализованных с СОМ, и обогащенных добавлением КК, к-кар или ALG, существенно изменилось по сравнению с контрольной группой (без загустителя). Время, необходимое для достижения свертывания при кислотно-индуцированной коагуляции молока, и получения нужной консистенции йогурта с загустителями-стабилизаторами было зафиксировано между 8

и 10 часами, тогда как в контрольной пробе без загустителя после истечения 18 часов консистенция оставалась жидкой. Дальнейшее увеличение времени не оказывает существенного влияния на густоту йогурта. Изучение температурного режима также показало, что молоко, сквашенное при температурном режиме от 38°C до 42°C не имеет отличительных признаков. В связи с этим было решено убирать йогурт из термостата до 10 ч культивирования при $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

Оценка полученного биойогурта

Нормализация верблюжьего молока СОМ привела к маскировке специфического вкуса, свойственного верблюжьему молоку. С помощью добавления КК в нормализованное СОМ молоко нам удалось получить продукт с необычно приятным вкусом, который оказался лидером по вкусовым качествам среди остальных проб йогурта. С другой стороны, общий балл для к-кар-обогащенного йогурта, а также для контрольной пробы йогурта был зарегистрирован как самый низкий ($7,50 \pm 0,92$ и $7,50 \pm 1,11$ соответственно) среди проб в первый день производства. Некоторые участники, принимающие участие в дегустации йогурта, отметили что структура, и консистенция обогащенного йогурта к-кар или ALG слабые. Что касается показателей кислотности и цвета, были заметные различия между обработанными КК и другими вариантами йогурта. Видимо, образцы йогурта с к-кар, ALG или без загустителей в силу своего состава отдавали йогурту кисловатый вкус, это подтверждается и результатами по кислотности. В этих пробах отмечается высокая кислотность по сравнению с пробами КК.

Таблица – Основные физико-химические свойства ($m \pm SD$) образцов йогурта, нормализованного СОМ.

Показатели	Йогурт с загустителем-стабилизатором			Контроль
	крахмал кукурузный	к-каррагинан	альгинат	
Титруемая кислотность, %	$0,863 \pm 0,015$	$0,880 \pm 0,21$	$0,893 \pm 0,040$	$0,917 \pm 0,032$
Активная кислотность, pH	$4,48 \pm 0,02$	$4,42 \pm 0,03$	$4,33 \pm 0,01$	$4,26 \pm 0,02$
Синерезис, %	$13,2 \pm 0,28$	$19,3 \pm 0,14$	$29,2 \pm 1,03$	$35,1 \pm 2,24$
Значения значительно отличаются при $p \leq 0,05$				

Как видно из таблицы, отмечаются значительные различия ($p \leq 0,05$) в титруемой кислотности среди образцов. I. B. Hashim et al. [5] сообщали о значении pH в диапазоне от 4,3 до 4,5 и титруемой кислотности в диапазоне от 0,98 до 1,16% для йогурта из верблюжьего молока, полученного с добавлением альгинатов, желатина и хлорида кальция. В нашем исследовании контрольная проба без стабилизаторов вызывала самую высокую титруемую кислотность и самый низкий pH йогурта из верблюжьего молока по сравнению с теми, которые содержали стабилизаторы (КК, к-кар или ALG). Йогурт, приготовленный из нормализованного СОМ молока с загустителем КК, имел самую низкую кислотность, в то время как образцы, приготовленные с добавлением загустителей к-кар, ALG или без загустителей-стабилизаторов, титруемая кислотность продукта были самыми высокими. Однако показатели кислотности все же намного ниже по сравнению с результатами других исследователей, которые полагают, что повышенная кислотность образцов йогурта связана с высокой кислотностью молока, используемого в производстве [14]. Наши исследования совпадают с данными N.S. Al-Zoreky et M.M. Al-Otaibi [6], которые указали, что йогурт из верблюжьего молока, содержащий 0,6% альгината + 0,06% CaCl_2 , показал более высокую степень (33,5%) синерезиса (отделения сыворотки) по сравнению с йогуртом из коровьего молока (23,8%), что указывает на более слабую способность удерживать воду.

Заключение

Натуральное верблюжье молоко образует водянистую текстуру при получении термостатного йогурта. Нормализация верблюжьего молока СОМ, а также добавление в него в качестве загустителя-стабилизатора КК с последующей термообработкой и внесением заквасочных культур (не менее 10^7 КОЕ/мл), в концентрации 2%, значительно усилило качества биойогурта, а именно положительно повлияло на физические, органолептические и

текстурные свойства. Загустители-стабилизаторы молока, используемые для обогащения, как ALG или к-кар, улучшили консистенцию йогурта, однако образцы йогурта с добавлением ALG или к-кар уступали по изучаемым характеристикам образцу йогурта с добавлением КК. Показано, что йогурт, нормализованный СОМ с добавлением КК был наиболее органолептически приемлемым продуктом.

Нормализация молока СОМ и внесение КК в объеме 3,5% (от общего объема) сократило время ферментации йогуртов, а также привело к маскировке специфического вкуса, свойственного верблюжьему молоку. Добавление КК значительно уменьшало синерезис, при этом значительно повышая сенсорную приемлемость ($p \leq 0,05$). Внесение КК оказало значительное влияние и на кислотность, а именно вызывало более низкую кислотность и высокое значение рН йогурта из верблюжьего молока по сравнению с контролем. Таким образом, использование таких стабилизаторов и загустителей как СОМ и КК с применением стартерных культур в объеме 2% (от общей массы) может стать потенциальным подходом для получения качественного термостатного био йогурта на основе верблюжьего молока.

Список литературы

1. Al-Haj O.A., Al-Kanhal H.A. *Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk.*//Int Dairy J. – 2010. – V. 20 (12). –P. 811-821. doi:[10.1016/j.idairyj.2010.04.003](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.04.003).
 2. Mullaicharam A.R. *A review on medicinal properties of camel milk.*// World J Pharm Sci. – 2014. – V. 2 (3). – P. 237-242.
 3. Sharma C., Singh C. *Therapeutic value of camel milk - a review.*// Adv J Pharm Life sci Res. – 2014. – V 2 (3). – P. 7-13.
 4. Kaskous S. *Importance of camel milk for human health. Review article.*// Emir J Food Agric. – 2016. –V. 28. – P. 158–163.
 5. Hashim I.B., Khalil A.H., Habib H. *Quality and acceptability of a set-type yogurt made from camel milk.*//J Dairy Sci. – 2009. – V. 92 (3). – P. 857-862. doi:[10.3168/jds.2008-1408](https://doi.org/10.3168/jds.2008-1408).
 6. Al-Zoreky N.S., Al-Otaibi M.M. *Suitability of camel milk for making yogurt.*// Food Sci Biotechnol. – 2015. – V. 24. –P. 601–606.
 7. Ibrahim S.A., El- Zubeir I.E.M. *Processing, composition and sensory characteristic of yoghurt made from camel milk and camel-sheep milk mixtures.*//Small Rumin Res. – 2016. – V. 136. – P. 109-112. doi:[10.1016/j.smallrumres.2016.01.014](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.014).
 8. Salih M.M., Hamid O.I.A. *Effect of fortifying camel's milk with skim milk powder on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of set yoghurt.*//Adv J Food Sci Technol. – 2013. – V. 5. – P. 765–770.
 9. Ahmed M.E.M. *Physio-chemicals characteristics of yoghurt from camel's milk and cow's milk in different ratios.*//M.Sc. Thesis, The College of Agricultural Studies, Sudan University of Science and Technology, 2015. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/8dfa/084e76cf0126e3c754f4df9cbda5b07f2b87.pdf>
 10. Richardson H.G. *Standard methods for the examination of dairy products.*//6th ed. Washington DC.: American Public Health Association, 1985.
 11. Celik S., Bakirci I. *Some properties of yoghurt produced by adding mulberry pekmez (concentrated juice).*//Int. J. Dairy Technol. – 2003. – V. 56 (1). – P. 26-29. doi:[10.1046/j.1471-0307.2003.00070.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00070.x)
 12. *Prediction of consumer acceptability of yogurt by sensory and analytical measures of sweetness and sourness.*/Barnes D.L., Harper S.J., Bodyfelt F.W., Mcdaniel M.R.//J Dairy Sci. – 1991. – V. 74 (11). – P. 3746-3754. doi:[10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78566-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78566-4).
 13. Tamime A.Y., Robinson R.K. *Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology.*// 3rd ed. Woodhead Publishing Limited, Sawston, 2007. – 808 p.
 14. Abou-Soliman N.H.I., Sakr S.S., Awad S. *Physico-chemical, microstructural and rheological properties of camel-milk yogurt as enhanced by microbial transglutaminase.*//J Food Sci Technol. – 2017. – V. 54 (6). – P. 1616–1627.
- Автор для корреспонденции:** Нағызбекқызы Э. - Ведущий научный сотрудник, PhD,ТОО «Экостандарт.kz»; эл. почта: elvira_29.04@mail.ru, 8 701 623 31 51.

ЖҰҚПАЛЫ ЕМЕС АУРУХАНАДАН БӨЛІНГЕН АЛТЫН ТҮСТІ СТАФИЛОКОКТАРДЫҢ АНТИБИОТИКТЕРГЕ СЕЗІМТАЛДЫҒЫ

Н.В. Калина¹, С.К. Бисимбаева¹, Г.Д. Асемова², С.К. Атыгаева³

¹«№ 1 Көпбейінді қалалық ауруханасы» ШЖҚ МКК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²«№ 2 Көпбейінді қалалық балалар ауруханасы» ШЖҚ МКК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

³«Көпбейінді медициналық орталық» ШЖҚ МКК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Бұл мақалада жұқпалы емес ауруханадан (АРИТБ, ЖХБ және КДСО с ЦАК) 2019 жылы бөлінген *Staphylococcus aureus*-тің антибиотиктерге сезімталдығы зерттелген. Алтын түсті стафилококктың жұқпалы емес аурулардың этиологиялық құрылымында жиі кездесуі және антибиотиктерге төзімді MRSA штамдарының соңғы кезде жиі бөлінуі анықталған.

Түйінді сөздер: *Staphylococcus aureus*, антибиотиктерге сезімталдық, инфекциялық емес аурухана.

SENSITIVITY TO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ANTIBIOTICS ISOLATED FROM A NONCOMMUNICABLE HOSPITAL

N. Kalina¹, S. Bisimbaeva¹, G. Asemova², S. Atygaeva³

¹State utility company on the right of economic management "Multidisciplinary city hospital № 1", Nur-Sultan city, Kazakhstan

²State utility company on the right of economic management "Multidisciplinary city children's hospital № 2", Nur-Sultan city, Kazakhstan

³State utility company on the right of economic management «Multidisciplinary Medical Center», Nur-Sultan city, Kazakhstan

In this article, the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolated from patients from a non-infectious hospital (Department of Anesthesiology and Intensive Care, General Surgical Infection and the Admission and Diagnostic Department with the Center for Outpatient Coloproctology) for 2019 is studied. It has been established that *Staphylococcus aureus* is more common in the etiological structure of noncommunicable diseases, and it has also been shown that antibiotic-resistant MRSA strains have been more often released in recent times.

Key words: *Staphylococcus aureus*, antibiotic sensitivity, non-infectious hospital.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НЕИНФЕКЦИОННОЙ БОЛЬНИЦЫ

Н.В. Калина¹, С.К. Бисимбаева¹, Г.Д. Асемова², С.К. Атыгаева³

¹ГКП на ПХВ «Многопрофильная городская больница № 1», Нур-Султан, Казахстан

²ГКП на ПХВ «Многопрофильная городская детская больница № 2», Нур-Султан, Казахстан

³ГКП на ПХВ «Многопрофильный медицинский центр», Нур-Султан, Казахстан

В данной статье изучены антибиотикочувствительности *Staphylococcus aureus*, выделенных из больных неинфекционной больницы (ОАРИТ, ОХИ и КДСО с ЦАК) за 2019 год. Установлено, что золотистый стафилококк чаще встречается в этиологической структуре неинфекционных заболеваний, а также показано, что в последние время чаще выделяется штаммы MRSA устойчивых к антибиотикам.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, чувствительность к антибиотикам, неинфекционной больницы.

Кіріспе

Стафилококктар туындатқан инфекциялар өзектілігі бүкіл әлемде өсу үстінде. Стафилококктық бактерия тасымалдаушылықтың кең таралуы, әртүрлі салалық ауруханаларда, әсіресе босану және хирургиялық, реанимация және интенсивті терапия бөлімшелерінде осы бактериямен ауруханаішілік инфекциялардың пайда болу қаупі бұл мәселенің маңыздылығын көрсетеді, сонымен қатар мемлекетке ауқымды материалдық шығын әкеледі және адамның денсаулығына зиян келтіреді. Этиологиясы стафилококктар болып табылатын аурулардың үздіксіз артуы микроорганизмдерге қатысты антибактериялық препараттардың белсенділігінің төмендеуімен және қоздырғыштар қасиеттерінің өзгеруімен, техногенді прессинг жағдайында макроорганизм иммунитетінің нашарлауымен түсіндіріледі [1,2].

Стафилококкты инфекциялар практикалық денсаулық сақтау жүйесінде кең тарала отырып айтарлықтай әлеуметтік-экономикалық зияндылық тигізуде. Әсіресе, соңғы кезде MRSA артуы бүкіл әлемде этиологиялық фактор ретінде тіркелген. Клиникада стафилококктардың ішінде анағұрлым вируленттісі *S. aureus* болып табалады [3,4].

Staphylococcus aureus-тің беталақтамды антибиотиктерге төзімділігі негізгі мәселе болып саналады. Бұрынырақ MRSA нозокомиальды патоген ғана болып саналған, алайда соңғы жылдары ауруханадан тыс науқастардан, әсіресе терісі мен жұмсақ тіндерден көптеп бөліне бастаған. MRSA туындатқан ауруханаішілік инфекциялар үлесі де артуда. Соңғы жылдары ауруханалық инфекциялар қоздырғыштарының антибиотиктерге төзімділіктері туралы мәселелер әлемнің барлық елінде тіркелуде. Бұл дәстүрлі түрде тағайындалатын көптеген антибактериялық препараттардың тиімділігінің нашарлауына алып келген. Осылардың бәрі ауруханадағы әртүрлі бөлімшелердегі, әсіресе реаниматология және интенсивті терапия бөлімшелерінде нозокомиальды патогендердің бөліну динамикасына және олардың антибиотиктерге резистенттілік деңгейлеріне тұрақты түрде мониторинг жасауды қажет етеді [1,3,5].

Осындай үлкен өзектілікке ие алтын түсті стафилококктың антибиотиктерге сезімталдығын немесе төзімділігін зерттеу маңызды болып саналады.

Зерттеу мақсаты

Жұқпалы емес ауруханада әртүрлі бөлімшелерден бөлінген алтын түсті стафилококктардың антибиотиктерге сезімталдығын зерттеу.

Материалдар және әдістері

Материалдар ШЖҚ МҚК «№ 1 көпбейінді қалалық аурухананың» әртүрлі бөлімшелерінде 2019 жылы емделген 68 науқастан алынған. Бөлімшелер бойынша жиынтық мәліметтер негізінде микроорганизмдер құрамы мен антибиотиктерге сезімталдығы анықталды.

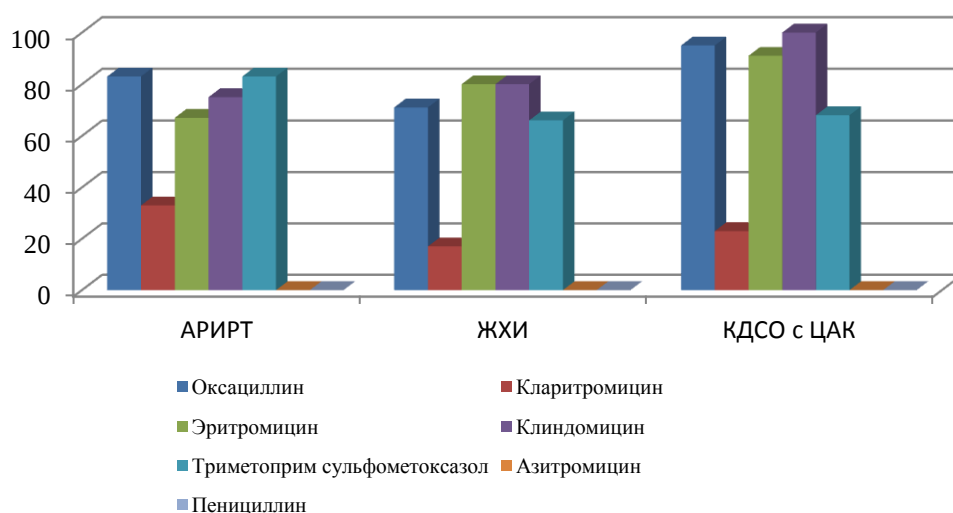
Бөлінген жара бөлінділеріне аурухананың бактериологиялық зертханасында микробиологиялық зерттеулер жүргізілді. Патологиялық материалдар зертханаға тасымалдайтын ортасы бар пробиркаға салып жеткізілген. Классикалық бактериологиялық әдіспен қоректік орталарда өскен бактериялардың идентификациясы жасалынды және бөлінген штамдардың антибиотикке сезімталдығы стандартты диффузды диск әдісі бойынша "Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков" нұсқауына сәйкес анықталды [6].

Нәтижелер мен талқылаулар

Аурухана бөлімшелеріндегі науқастардан бөлінген *Staphylococcus aureus* штаммының антибиоотикограммасы емдеуде қолданылатын үш қатардағы антибиотиктер бойынша анықталды. Бірінші қатардағы препараттар: пенициллин, оксациллин, кларитромицин, эритромицин, азитромицин, клиндомицин, триметоприм сульфаметоксазол.

Ең алдымен *S.aureus* штаммдары жиі бөлінген бөлімшелер туралы қарастырсақ. Анестезиология, реаниматология интенсивті терапия бөлімшесінен (АРИТБ) барлығы 12 науқастан материал алынған, бірінші қатардағы антибиотиктердің ішінде ең сезімталы оксациллин мен триметоприм сульфаметоксазол болған, 10 науқастан бөлінген алтын түсті стафилококктар сезімталдық көрсеткен (83%). Резистенттілік көрсеткен 2 штамм MRSA-ға жатады. Клиндомицин және эритромицинге сәйкесінше 75 және 67% науқастардан бөлінген алтын түсті стафилококк сезімталдық көрсеткен. Кларитромицин 4 науқастан бөлінген штамм ғана сезімтал болған (33%) (сурет 1).

Жалпы хирургиялық инфекциялар (ЖХИ) бөлімшесінен патологиялық материалдар 34 науқастан алынған, эритромицинге және клиндомицинге 80% жағдайда 28 науқастан бөлінген стафилококк штаммдары сезімтал болған. Екінші орынды сезімталдық бойынша оксациллин (71%) мен триметоприм сульфаметоксазол (66%) өзара бөліскен. 9 науқастан бөлінген штаммдар оксациллинге резистентті (MRSA). Кларитромицинге 6 науқастан бөлінген штаммдар сезімталдық көрсеткен (17%).

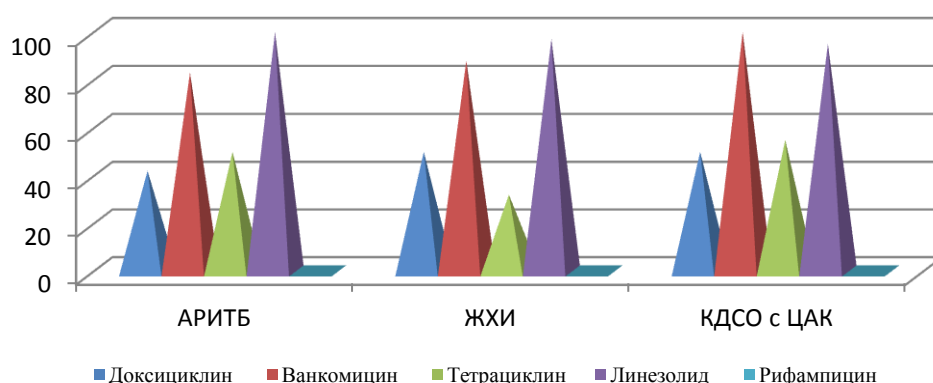


Сурет 1 - *S. aureus* штамдарының бірінші қатар антибиотиктеріне сезімталдығы.

Амбулаторлық колопроктология орталығымен қабылдау-диагностикалық бөлімшесінде (ҚДСО с ЦАК) – 22 науқастан *S. aureus* бөлінген. Бұл штамдар клиндомицинге ең жоғары сезімталдық көрсеткен (100%). Бөлінген алтын түсті стафилококктар штамдары оксациллинге (95%), эритромицинге (91%) және триметоприм сульфаметоксазолға (68%) сезімтал болған. Кларитромицинге 5 науқастан бөлінген штамдар ғана сезімталдық көрсеткен (23%). Аталған бөлімшелерден бөлінген барлық штамдар пенициллин мен азитромицинге 100% төзімділік көрсеткен.

Емдеуге алынған екінші қатардағы препараттар: доксициклин, ванкомицин, тетрациклин, рифампицин, линезолид, левофлоксацин, хлорамфеникол (2 сурет).

2-ші суреттен көргеніміздей үш бөлімшеден бөлінген алтын түсті стафилококктардың штамдары линезолидке жоғары сезімталдық көрсеткен. Атап айтқанда, АРИТБ бөлімшесінде бөлінген штамдар 100%, ЖХИ бөлімшесіндегі 34 штамның 33 штамы сезімталдық көрсеткен (97%), амбулаторлық колопроктология орталығымен қабылдау-диагностикалық бөлімшесіндегі науқастардан бөлінген 21 штамм линезолидке 95% көрсеткішпен сезімтал болған. Осы бөлімшедегі науқастардан бөлінген штамдар ванкомицинге 100% сезімталдық көрсеткен. *S.aureus* ванкоминцинге АРИТБ 83% және ЖХИ бөлімшелерінде 88% сезімтал болған.

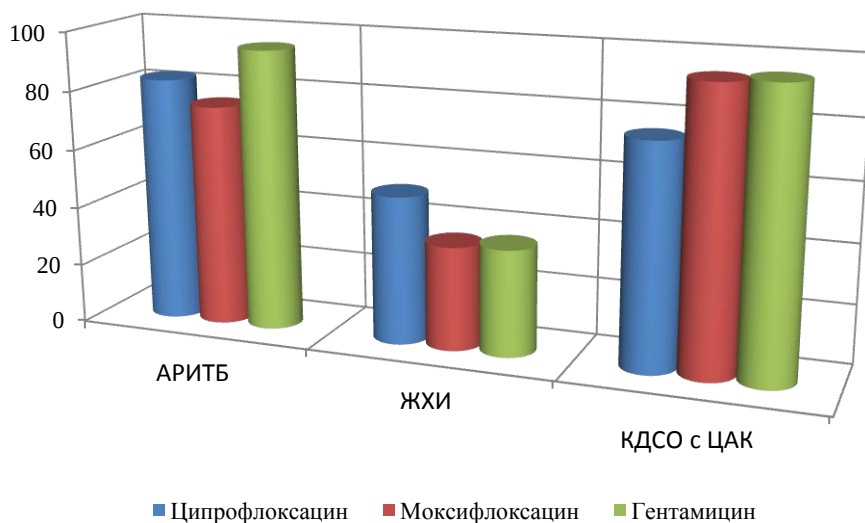


Сурет 2 - *S. aureus* штамдарының екінші қатар антибиотиктеріне сезімталдығы.

Тетрациклин мен доксициклинге сезімталдық барлық бөлімшелер бойынша 32%-55% аралығында. *S. aureus* рифампицинге 100% төзімді.

Емдеуге алынған үшінші қатар антибиотиктері: ципрофлоксацин, офлоксацин, моксифлоксацин, левофлоксацин, гентамицин, хлорамфеникол. Диаграммада *S.aureus*-ке ең сезімтал антибиотиктер ғана берілген (3 сурет). АРИТБ бөлінген штамдар жоғары сезімталдықты ципрофлоксацинге (83%), гентамицинге 75% көрсеткен, моксифлоксацинге 50% штамдардың сезімталдығы байқалған. ЖХИ бөлімшесі бойынша *S.aureus* гентамицинге (94%),

ципрофлоксацинге (75%), моксифлоксацинге 12 штамм сезімталдық көрсеткен. Амбулаторлық колопроктология орталығымен қабылдау-диагностикалық бөлімшесінен бөлінген алтын түсті стафилококктар ең жоғары сезімталдықты ципрофлоксацин мен гентамицинге бірдей дәрежеде көрсеткен (95%). Моксифлоксацинге 8 штамм сезімтал (36%).



Сурет 3 - *S.aureus* штаммдарының үшінші қатар антибиотиктеріне сезімталдығы.

Қорытындылай келе, жұқпалы емес аурухананың әртүрлі бөлімшелерінде емделетін науқастар ауруларының этиологиялық құрылымын 90% жағдайда *Staphylococcus aureus* алатындығы және соңғы жылдары антибиотиктерге төзімді MRSA түрлерінің кездесу жиілігінің артуы әдебиеттер мәліметтерін нақтылайды (3).

Қорытынды

1. Анестезиология, реаниматология интенсивті терапия бөлімшесіндегі науқастардан бөлінген *S. aureus* штаммдары линезолидке (100%), оксацилли, триметоприм сульфометоксазолға, ципрофлоксацинге (83%) сезімталдық көрсеткен.

2. Жалпы хирургиялық инфекциялар бөлімшесіндегі науқастардан бөлінген *S. aureus* штаммдары линезолидке (100%), гентамицинге (94%), эритромицин мен клиндомицинге 80% жағдайда сезімталдық көрсеткен. 9 науқастан MRSA штаммдар бөлінген.

3. Амбулаторлық колопроктология орталығымен қабылдау-диагностикалық бөлімшесіндегі науқастардан бөлінген *S.aureus* штаммдары линезолид пен клиндомицинге (100%), ципрофлоксацин мен гентамицинге (95%) сезімталдық көрсеткен.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1. Антибиотикорезистентность в стационаре: контролируем ли мы ситуацию?/ Яковлев С. В., Проценко Д. Н., Шахова Т. В. и др.// Антибиотики и химиотерапии. – 2010. - № 55. - С. 50-58.
2. Бакиеева С.С., Сергеева И.В. Стафилококковое бактерионосительство, как критерий экологического неблагополучия среды обитания человека//Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6.;
3. Зырянов С.К., Сычев И.Н., Гуцина Ю.Ш. Современные проблемы инфекций, вызванных MRSA и пути их решения//Антибиотики и химиотерапия. – 2017. - N 7-8. - С. 69-79.
4. Балбуцкая А.А., Дмитренко О.А., Скворцов В.Н. Современные особенности видовой идентификации коагулазоположительных бактерий рода *Staphylococcus*//Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. - N 8. - С. 497-502.
5. Буга Д.В., Присакаръ В.И. Значимость метициллин-резистентных стафилококков в септической патологии// Медицинский альманах. – 2019. - N 1. - С. 40-43.
6. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков //МЗ.РК.

Корреспондент автор: Н.В. Калина - «№ 1 көпсалалы қалалық ауруханасы» ШЖҚ ММ микробиологиялық зерттеулер зертханасының меңгерушісі, ф.ғ.к., доцент, ГКП; электронды пошта: natalya_kalina@mail.ru, 8 (701) 554 35 49.

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕДА С КАЗАХСТАНСКИХ РЕГИОНОВ

Ж.Р. Хасенбекова¹, А.Е. Гуляев², Ш.Д. Сергазы², С.С. Кожакметов², А.Р. Кушугулова²

¹ТОО «SaumalBioTech», Нур-Султан, Казахстан

²ЧУ «National Laboratory Astana», Nazarbayev University, Нур-Султан, Казахстан

Изучена антимикробная активность четырех образцов полифлорного мёда, шести образцов монофлорного мёда и четырех образцов прополиса с Восточно-Казахстанского и Южно-Казахстанского регионов Казахстана. Был поставлен метод диффузии в агар с применением грамположительного тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Полифлорные сорта меда с Восточно-Казахстанского региона показали высокую антимикробную активность.

Ключевые слова: мед, прополис, антимикробная активность, диффузия в агар.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY FROM KAZAKHSTANI REGIONS

Zh. Khassenbekova¹, A. Gulyaev², Sh. Sergazy², S. Kozhakhmetov², A. Kushugulova²

¹LLP «SaumalBioTech», Nur-Sultan city, Kazakhstan

²PI «National Laboratory Astana, Nazarbayev University», Nur-Sultan city, Kazakhstan

The antimicrobial activity of four polyphloric honey samples, six monoflora honey samples, and four propolis samples from the East Kazakhstan and South Kazakhstan regions of Kazakhstan was studied. The agar diffusion method using the gram-positive test strain *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 was used. Samples of polyphloric honey from the East Kazakhstan region showed high antimicrobial activity.

Keywords: honey, propolis, antimicrobial activity, diffusion in agar.

ҚАЗАҚСТАН АЙМАҚТАРЫНДАҒЫ БАЛДЫҢ МИКРОБҚА ҚАРСЫ БЕЛСЕНДІЛІГІ

Ж.Р. Хасенбекова¹, А.Е. Гуляев², Ш.Д. Сергазы², С.С. Қожакметов², А.Р. Кушугулова²

¹«SaumalBioTech» ЖШС, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²ЖМ «National Laboratory Astana», Nazarbayev University, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Микробқа қарсы белсенділігі үшін полифлорлы балдың төрт үлгісі, монофлора балының алты үлгісі, төрт прополис үлгісі Қазақстанның Шығыс Қазақстан және Оңтүстік Қазақстан облыстарынан алынған зерттелді. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 грам-оң сынама штаммымен агар диффузиясы әдісі қолданылды. Шығыс Қазақстан облысындағы полифлорлы бал сорттары жоғары микробқа қарсы белсенділік көрсетті.

Кілт сөздер: бал, прополис, микробқа қарсы белсенділік, агардағы диффузия.

Введение

Целебные свойства меда известны с древних времен. Первое свидетельство применения меда человеком встречается в наскальных рисунках каменного века (Аранская пещера в Валенсии, Испания). На одном из самых древних папирусов, найденных в Египте (папирус Смирты, который датируется 1700 годом до нашей эры), рассказывается о том, как можно использовать пчелиный нектар для заживления ран. В древнеиндийских ведических трактах «Книга жизни» мед рекомендовали как общеукрепляющее средство, а также при заболеваниях желудка и кишечника. Мед являлся обязательным компонентом в составе эликсиров, продлевающих жизнь до 500 лет. В Древней Греции мед также считали «напитком молодости» [1,2].

На арабском Востоке врачи широко использовали мед. Успешно применял продукты пчеловодства знаменитый ученый Средней Азии Абу Али Ибн-Сина (Авиценна). В его «Каноне» мы находим десятки рецептов, в состав которых входят пчелиный мед и воск [3].

На современном этапе истории антимикробный и ранозаживляющий эффект меда и его продуктов вызывает большой интерес у ученых и врачей всего мира. В 20 веке в научных трудах В.П. Кивалкиной [4] показаны антибактериальные свойства прополиса, которые имеют зависимость

от географического и растительного происхождения. Прополис, воскообразное вещество, производимое пчелами, с древних времен. Он имеет широкий спектр применений, включая потенциальные противомикробные и противораковые эффекты. Многие из терапевтических эффектов могут быть приписаны его иммуномодулирующим функциям. В составе прополиса выявлены биологически активные ингредиенты CAPE и артепиллин С, которые определяют его специфические свойства [5].

Антимикробные свойства меда в последнее время активно изучаются в связи с появлением устойчивых к антибиотикам патогенов. Высокая концентрация сахара, перекись водорода, осмотическое действие и низкий pH являются хорошо известными антибактериальными факторами в мёде, а в последнее время метилглиоксаль и антимикробные пептиды были определены как важные антибактериальные соединения в мёде. При изучении в эксперименте ранозаживляющих свойств меда выявлено, что антимикробная активность связана с перекисью водорода, выделяемого в результате ферментативной реакции, катализируемой глюкооксидазой. При этом мёд защищает ткани от негативного действия перекиси водорода, препятствуя реакции со свободным железом, результатом которой является появление свободных радикалов кислорода. Содержащиеся в мёде антиоксиданты также блокируют свободные радикалы. Умеренное предварительное разведение мёда усиливает его антибактериальную активность. Оказалось, что при небольшом разведении мёда водой, в нём активируется ферментная система, конечным продуктом работы которой является перекись водорода [6, 7].

Цель

Исследование антимикробной активности Казахстанских сортов меда и прополиса относительно грамположительного тест-штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 методом диффузии в агар.

Материалы и методы

Для изучения антимикробной активности исследовались четыре образца полифлорного мёда и шесть образцов монофлорного мёда с Восточно-Казахстанского и Южно-Казахстанского регионов Казахстана. Все представленные для исследования образцы были расфасованы в контейнеры объёмом 1 л и хранились в холодильнике при 4-5°C. Они представлены в таблице 1, где также указано процентное содержание воды в каждом образце. Также в работе были задействованы 4 образца прополиса (их происхождение указано в таблице 2).

Таблица 1 - Характеристика происхождения образцов мёда.

Медоносы	Регион	Содержание воды, %
Лесной	ВКО	17,4
Подсолнечник (<i>Helianthus annuus</i>)	ВКО	16,3
Степное разнотравье	ЮКО	16,4
Аккурай (<i>Psoralea drupacea</i>)	ЮКО	16,6
Горное разнотравье	ВКО	18,3
Луговой	ВКО	17,4
Лук-слизун (<i>Allium nutans</i>)	ВКО	16,9
Акация степная (<i>Caragana</i>)	ЮКО	16,4
Каперсы (<i>Capparis</i>)	ЮКО	16,5
Хлопчатник (<i>Gossypium</i>)	ЮКО	17,5
Примечание: ВКО - Восточно-Казахстанская область, ЮКО - Южно-Казахстанская область		

Таблица 2 - Характеристика происхождения образцов прополиса.

Медоносы	Регион
Берёза	ВКО, с. Бобровка
Хвойные деревья	ВКО, с. Бобровка
Хвойные деревья	ВКО, с. Зыряновка
Тополь	ВКО, с. Зыряновка
Примечание: ВКО - Восточно-Казахстанская область	

В работу для определения антимикробной активности взяты 10% водные экстракты меда, прополиса. Решено провести исследование с минимальной концентрацией для отбора наиболее активных образцов.

Испытуемый образец в объеме 1 г. растворяли в 10 мл. дистиллированной воды, 6 часов выдерживали при 37°C до полного растворения меда и отфильтровывали через мембранный фильтр 0,2 микрона. Аналогичным способом в дальнейшем были приготовлены 25% и 50% водные экстракты меда в соответствующем соотношении. Водный экстракт прополиса готовили следующим способом: 1 г. исследуемого прополиса разводили 10 мл дистиллированной воды. Ставили на водяную баню, нагретую до 80°C на 3 часа для экстрагирования. Полученную смесь отфильтровывали и хранили в холодильнике при 4°C.

Определение проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-микробов, образующихся при испытании растворов определенных концентраций контрольного и испытуемого образца [8].

Приготовление среды. К 24 г. молочного агара (Sigma) добавили литр дистиллированной воды. Смесь нагревали до 160°C при постоянном перемешивании до полного растворения всех частиц. Приготовленную среду стерилизовали в автоклаве при 121°C в течении 15 минут.

Метод диффузии в агар. Для изучения антимикробной активности меда был использован грамположительный тест-штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Диск штамма был добавлен в 0,9% изотонический раствор хлорида натрия и инкубирован при 37°C в течении 18-24 часов. Выросшая культура была посеяна на косяки среды (молочный агар) для последующего использования. Культура с косяка была смыта 0,9% изотоническим раствором хлорида натрия и доведена до стандарта мутности 5 ед. ($1,5 \times 10^8$) этим же раствором. На 50 мл. среды был добавлен 1 мл разведенной культуры. Метод диффузии в агар был поставлен согласно стандартам, рекомендованным Государственной фармакопее Казахстана. Стерильные чашки Петри были установлены на столиках со строго горизонтальной поверхностью и залиты молочным агаром в объеме 20 мл. После застывания агара был добавлен второй слой в объеме 10 мл., содержащий культуру бактерий. После того, как среда полностью застыла были сделаны лунки с помощью цилиндров диаметром 8 мм. каждая, равномерно расположенные друг от друга. В каждую лунку было добавлено 100 мкл. образца либо контроля.

В качестве контроля взят антибиотик Бензилпенициллин. Приготовление основного и рабочего растворов: основной раствор Бензилпенициллина готовят из расчета 200 000 ЕД в 1 мл. буферного раствора № 1. Из основного раствора готовят рабочий раствор с дистиллированной водой в концентрации 1ЕД/мл., который будет закапан в объеме 100 мкл в контрольную лунку. После внесения растворов, используемых в опыте, рекомендуется чашки выдерживать при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Затем чашки инкубируют при температуре 37°C в течение 16-18 часов. После инкубации в термостате измеряют диаметры зон угнетения роста тест - микробов. Диаметры зон угнетения роста тест-микроба измеряют с точностью до 0,1 мм. [9].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде «среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения».

Результаты и обсуждение

Исследование методом диффузии в агар 10% концентрации меда и прополиса показало следующие результаты (таблица 3). Как видно, монофлорные сорта меда хлопчатник и аккурай из Южно-Казахстанской области и сорта подсолнечник из Восточно-Казахстанской области при 10% концентрации не показали антимикробной активности, в отличии от меда акации и каперсов, где отмечена минимальная активность (9,0 и 9,4 мм.). Полифлорные сорта лесной мед, степное разнотравье и горное разнотравье дают несколько больший эффект, но максимальную активность в 10% концентрации дает мед сорта лук-слизун в среднем его зона угнетения роста тест-штамма $12,0 \pm 2,3$ мм. При этом отмечены хорошие зоны диффузии в агар диаметром от 1,6 до 2 см., что возможно связано с тем, что в состав меда входит около 18% воды.

Таблица 3 –Антимикробные свойства меда.

Образец меда/10% водный экстракт	Диаметр зон задержки роста, мм
Лесной	10,8 ± 2,5
Подсолнечник (<i>Helianthus annuus</i>)	-
Степное разнотравье	10,6 ± 1,3
Аккурай (<i>Psoralea drupacea</i>)	-
Горное разнотравье	10,4 ± 1,2
Луговой	10,0 ± 0,4
Лук-слизун (<i>Allium nutans</i>)	12,0 ± 2,3
Акация степная (<i>Caragana</i>)	9,0 ± 0,9
Каперсы (<i>Capparis</i>)	9,4 ± 1,3
Хлопчатник (<i>Gossypium</i>)	-
Стандарт Бензилпенициллин 1 мкг/мл	17,3 ± 1,8

На основании полученных результатов, нами были отобраны образцы для дополнительного исследования антимикробной активности меда в более высоких концентрациях. Нами были взяты в 25% и 50% концентрации мед луговой, лесной, лук-слизун и горное разнотравье. Результаты в таблице 4. Полифлорные сорта лесной мед, горное разнотравье в 50% концентрации водного экстракта дают больший антимикробный эффект, чем монофлорный мед лук-слизун, который показал результаты лучше в 10% концентрации. Наилучшую антимикробную активность относительно тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 показал мёд луговой, особенно в 50% концентрации, где его зоны угнетения роста 20,8±2,5 превышают в диаметре зоны угнетения стандартного образца (17,3 ± 1,8). Как видно из проведенных исследований наиболее выраженной антимикробной активностью обладают полифлорные сорта меда независимо от региона производства.

Таблица 4 – Антимикробные свойства меда в 25% и 50% концентрации водного экстракта.

Образец меда	Диаметр зон задержки роста в мм	
	25% водный экстракт	50% водный экстракт
Лесной	Диффузия в агар	14,8±1,3
Луговой	12,5±0,9	20,8±2,5
Лук-слизун (<i>Allium nutans</i>)	-	Менее 10,0
Горное разнотравье	Менее 10,0	16,0±1,4
Стандарт пенициллин 1 мкг/мл	17,3 ± 1,8	

В эксперименте антимикробную активность показали 10% водные экстракты прополиса, данные представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Антимикробная активность образцов прополиса.

Образцы прополиса	Диаметр зоны угнетения, мм
Берёза	10,75±0,56
Хвойные деревья, Зыряновка	13,25±0,56
Хвойные деревья, Бобровка	10,5±1,03
Тополь, Зыряновка	17,00±1,12
Стандарт Бензилпенициллин, 1 мкг/мл	17,3 ± 1,8

Наибольший антимикробный эффект проявил тополиный прополис (17,00±1,12), далее по убыванию хвойный прополис из села Зыряновка Восточно-Казахстанской области и хвойный прополис из села Бобровка, березовый прополис. Антимикробные свойства прополиса связывают с присутствием в нем флавоноидов. Каффеиновая кислота и кверцетин, входящие в состав прополиса, согласно литературным данным, обладают антимикробным действием [10,11].

Таким образом, проведенные на данном этапе исследования антимикробной активности образцов 10%, 25% и 50% водного экстрактов монофлорного и полифлорного сортов меда, 10% водного экстрактов прополиса выявили различные степени проявления антибактериального

эффекта относительно грамположительного тест-штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. В отношении различных сортов меда, наиболее активным можно считать в 10% концентрации монофлорный мед лук-слизун, в 50% концентрации водные экстракты полифлорных сортов меда луговой и горное разнотравье с Восточно-Казахстанского региона проявляют антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 сопоставимую с антимикробной активностью антибиотика-стандарта Бензилпенициллин. Визуально можно отметить, что они темнее монофлорных сортов, что, согласно научным исследованиям (Taormina, 2001) объясняет их повышенную активность: темный цвет мёда свидетельствует о повышенной антиоксидантной силе [12-14]. Полученные нами результаты по антимикробному эффекту мёда сравнимы с результатами, полученными учеными с других регионов мира, в эксперименте которых мёд также ингибировал рост *St. aureus* и имел активность, сравнимую с применением антибиотика [15-17].

Все исследуемые образцы прополиса показали антибактериальную активность, независимо от происхождения, относительно тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Но наибольший антибактериальный эффект у тополиного прополиса из Восточно-Казахстанской области с. Зыряновска, лучшие результаты и у хвойного прополиса из этого же села.

Заключение

В нашем исследовании образцы полифлорных сортов меда и прополиса, полученные из Восточно-Казахстанской области, проявили высокую антимикробную активность в отношении грамположительного тест-штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Учитывая полученные результаты, дальнейшие эксперименты необходимо провести относительно других групп тест-штаммов микроорганизмов.

Список литературы

1. Tahereh Eteraf-Oskouei and Moslem Najafi Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review//*Iran J Basic Med Sci.* - 2013 Jun. - V. 16 (6). - P. 731-742.
2. Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control/. Al-Wail, N. S., Salom K., Butler G., & Al Ghamdi A. A. //*Journal of Medicinal Food.* - 2010. - V. 14. - P. 1079-1096.
3. Ибн-Сина (Авиценна). Канон врачебной науки, т. V. - Ташкент: Изд-во АН УзССР, 1960. - С. 30-31.
4. Кивалкина В. П. Прополис, его антимикробные и лечебные свойства: Автореф. дисс.... докт. биол. наук. - Казань, 1964. - 30 с.
5. Pujirahayu N., H. Ritonga S. A. L, and Uslinawaty Z. Antibacterial activity of oil extract of trigona propolis// *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* - Apr. 2015. - Vol. 7, No. 6. - P. 419-422.
6. Antibacterial Components of Honey -Paulus H. S. Kwakman and Sebastian A. J. Zaat//*IUBMB Life.* - January 2012. - V. 64 (1). - P. 48-55.
7. Khelod Salom Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Isolates in Single and Polymicrobial Cultures Noori/ AL-Waili, Ahmad Al-Ghamdi, Mohammad Javed Ansari et al. //*International Journal of Medical Sciences.* - 2012. - V. 9 (9). -P. 793-800.
8. Государственная фармакопея РК, первое издание, Т.1. - Алматы: Издательский дом «Жибек жолы», 2008. - 592 с.
9. Кулешова С.И. Определение активности антибиотиков методом диффузии в агар//*Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* - 2015. - № 3. - С. 13-17.
10. Synergistic Effect of Honey and Propolis on Cutaneous Wound Healing in Rats/ Takzaree N., Hadjiakhondi A., Hassanzadeh G. et al. //*Acta Med Iran.* - 2016. - Vol. 54, No. 4. - P. 233-239.
11. Jull A.B., Walker N., Deshpande S. Honey as a topical treatment for wounds//*Cochrane Database Syst Rev.* - 2013. - Vol. 28, N 2. - P. 215-224.
12. Taormina P. J., Niemira B. A., & Beuchat, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power//*International Journal of Food Microbiology.* - 2001. - V. 69 (3). - P. 217-225.
13. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and color of Slovenian honey/Bertoncelj J., Doberšek U., Jamnik M., Golob T.// *Food Chem.* - 2007. - V. 105. -P. 822-828.
14. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics/Beretta G., Granata P., Ferrero M et al. //*Anal Chim Acta.* - 2005. - V. 533. - P. 185-191.
15. In vitro antimicrobial activities of Saudi honeys originating from *Ziziphus spina-christi* L. and *Acacia gerrardii* Benth. Trees/Ayman A. Owayss, Khaled Elbanna, Javaid Iqba and al.//*Food Sci Nutr.* - 2020. - V. . - P. 390-401.
16. In vitro evaluation of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* susceptibility to Saudi honeys/Muhammad Barkaat Hussain, Yasser Mahmoud Kamel, Zia Ullah et al. //*BMC Complementary and Alternative Medicine.* - 2019. - V. 19. - P. 185.

17. Antimicrobial effect of bee honey in comparison to antibiotics on organisms isolated from infected burns Abd-El Aal, El-Hadidy M. R., El-Mashad N. B. & El-Sebaie, a H.//Annals of Burns and Fire Disasters. – 2007. – V. 20 (2). – P. 83–88.

Автор для корреспонденции: Хасенбекова Ж.Р. - к.м.н., ведущий специалист ТОО «SaumalBioTech»; эл. почта: zhanagul.khassenbekova@gmail.com, 8 701 624 51 20.

ҒТАМБ 76.03.43+76.03.31

ӘӨЖ 576.3/.7

ПЛАЗМИНОГЕНДІК АКТИВАТОР ЖҮЙЕСІНІҢ ҚЫЗМЕТІН ЗЕРТТЕУ

И.К. Мухаммад Ахтер, А.С. Абилхадиров, С.М. Шайхин

МРК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» ҚР БҒМ ҒК, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

uPA және uPAR-ң қан тамырлары мен ұлралардың өсуі мен регенерациясы, ангиогенез, эмбриогенез, сондай-ақ жасушалардың өсуі мен қозғалуындағы патологиялық және бірқатар қалыпты физиологиялық үрдістерді реттеудегі рөлі сипатталған. Көп функционалды uPA жүйесі фибринолиз, нейрогенез үрдісінде ғана емес, сонымен қатар қорғаныс реакцияларын жүргізуде және ағзадағы қалыпты қан ағымын реттеуде негізгі функцияларды орындайды.

Кілт сөздер: uPA, uPAR, ақуыз, урокиназа, жасуша.

STUDY OF THE PLASMINOGEN ACTIVATOR SYSTEM

I. Mukhammad Akhter, A. Abilkhadirov, S. Shaikhin

RSE "Republican collection of microorganisms" SC MES RK, Nur-Sultan city, Kazakhstan

The role of uPA and uPAR in the regulation of pathological and several normal physiological processes in the growth and regeneration of blood vessels and tissues, angiogenesis, embryogenesis, as well as cell growth and migration is described. uPA multifunctional system plays a key role not only in the process of fibrinolysis, neurogenesis, but also in conducting protective reactions and regulating normal blood flow in the body.

Keywords. uPA, uPAR, protein, urokinase, cells.

ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА

И.К. Мухаммад Ахтер, А.С. Абилхадиров, С.М. Шайхин

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

Описана роль uPA и uPAR в регуляции патологических и ряда нормальных физиологических процессов в росте и регенерации кровеносных сосудов и тканей, ангиогенезе, эмбриогенезе, а также росте и миграции клеток. Многофункциональная система uPA играет ключевую роль не только в процессе фибринолиза, нейрогенеза, но и в проведении защитных реакций и регуляции нормального кровотока в организме.

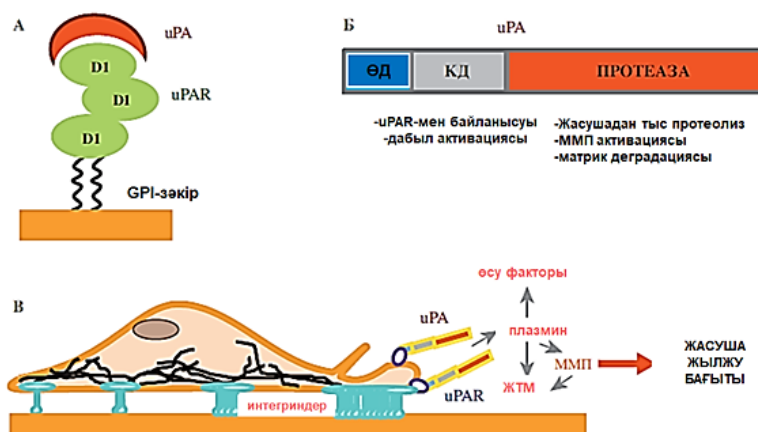
Ключевые слова: uPA, uPAR, протеин, урокиназа, клетки.

Кіріспе

Плазминогендік активатордың урокиназа тәрізді көпфункционалды жүйесі (uPA жүйесі) физиологиялық және патологиялық үрдістерді дамытуда протеолитикалық және реттеуші функцияларды орындайды. Протеолитикалық функция плазминогенді белсендендіруге және оны фибринолитикалық жүйені реттеуге жауап беретін плазминге айналдыруға бағытталған, сонымен қатар байланыстырушы ұлпа матриксінің (БҰМ) деструкциясын қамтамасыз ететін матрикстік металлопротеиназа (ММП) жол салушысын белсендендіруде жетекші рөл атқарады [1-3].

Урокиназалы жүйе uPAR—uPA жоғары аффинді рецепторын және плазминогеннің белсенді эндопептидазасына дейін белсенді емес зимогенді ыдырататын және белсендендіретін uPA және серинді протеазаны қамтиды. uPA рецептор-байланыстырушы N-соңды эпидермальді домен тәрізді өсу факторынан (GFD), C-соңды протеолиттік домен және Крингл доменінен тұрады. GFD домен uPA мен uPAR-дың жоғары спецификалық байланысуына жауап береді, ал

Крингл uPA-uPAR кешенінің тұрақтануын және оның жасушадан тыс матриксмен өзара әрекеттесуін қолдайды. uPAR құрамында үш гомологиялық домен бар және GPI-зәкір көмегімен плазма мембранасына бекітілген [4,5]. GPI-зәкір мембрананың ішіндегі жоғары латералды қозғалушылықты қамтамасыз етеді, бұл uPAR-дың жұмыс істеуі үшін маңызды, себебі ол жылжушы жасушалардың алдыңғы шетінде uPA/uPAR кешенін кластерлеуіне себепші болады және оқшауланған протеолизді жеңілдетеді [6]. uPA жасушаның бетінде uPAR-мен байланысады және бұл байланыс uPA белсенділігін арттырады [7-9]. uPA және uPAR үйлескенде жасушадан тыс матрикстің протеолизін және сонымен қатар басқа да жасушалық үрдістерді кейбіреуін іске қосады (сурет 1) [10-12].



Сурет 1. - Урокиназа және оның рецептарының жасуша жылжуына әсер ету механизмі.

А-uPA-плазминогеннің урокиназа типті немесе урокиназа активаторлары, uPAR-урокиназа рецепторы, GPI-гликозилфосфатидилинозитол, D1-D3-урокиназа рецепторының домендері, Б-ӨД-өсу домені, КД-Крингл домені, В-ЖТМ-жасушадан тыс матрикс. Сурет мақаладан алынған [13].

uPA жүйесінің uPA арқылы атқаратын протеолиздік функцияларымен қатар ол дабыл рецепторы болып табылатын және бірқатар киназалардың активациясына қатысатын uPAR рецепторы арқылы реттеуші функцияларды орындайды [14,15]. Сонымен қатар, uPA жүйесі интегриндер, витронектиндермен де әрекеттесе отырып, белгілі бір сигнал беру жолдарын белсендіреді [16]. uPA белсенділігі ең маңыздысы PAI-1 болып табылатын 1 және 2 - PAI-1 және PAI-2 типтегі плазминоген активаторының эндогенді ингибиторлары арқылы реттеледі. uPA жүйесінің құрамдас бөліктері - uPA, uPAR және PAI-1 мен PAI-2 ингибиторлары адгезия, пролиферация, апоптоз, хемотаксис және жасуша жылжуы үрдістеріне қатысады, сонымен қатар эпителиальды-мезенхималық ауысу мен ген экспрессиясын белсендендіруге еліктірілуі мүмкін [17-19]. Бұл процестердің барлығы гомеостазды қолдауға бағытталған тамырлардың өсуі мен қалпына келуі сияқты қалыпты физиологиялық жағдайларда, сонымен қатар, канцерогенез, қабыну, фиброз және фибринолиз үрдістерінде айқын көрінетін патологиялық жағдайларда да жүреді [1,2,20].

Деректер бойынша, урокиназа жүйесі жүрек-қан тамырлары жүйесінің жұмысына қатысатынын көруге болады. Осыған дейін uPA және uPAR жылжу мен пролиферациялану кезіндегі қан тамырлары жасушаларында экспрессияланатыны және атеросклероз бен рестеноз сияқты жүрек-қан тамырлары ауруларының патогенезіне қатысатындығы көрсетілген [21-23]. uPA плазма, зәр құрамында және бүйректе болады. Көптеген жасушаларда uPA рецепторлары бар. uPA-ны жасуша бетіндегі uPAR рецепторымен байланыстыру uPA-ның жоғары белсенді формасының пайда болуын және плазминогеннің плазминге айнала отырып белсенденуін ынталандырады. Бұл үрдіс жасушадан тыс матрикте жүреді, ол БҰМ деградациясында, көбеюде және жасуша жылжуында маңызды рөл атқарады [2,3,24].

uPA плазмин протеолизінің uPA-делдалы арқасында матрикстің деградациясына және өсу факторының белсенденуіне алып келетін тамырлы жасушалардың жылжуы мен көбеюіне

септігін тигізеді [5, 25]. Бірақ, uPA-да жасуша аралық дабылды терапиялық белсендендіру арқылы жүзеге асыратын серозды және тирозинді фосфорлау және RhoA мен Rac1-ді белсендендіру сияқты протеолитикалық емес функциялар бар [26,27]. Рекомбинантты uPA немесе трансфекцияны плазмаға енгізу кезінде урокиназаның құрамы *in vivo* жергілікті артуы тамырлы жасушалардың жылжуын, олардың пролиферациясын және фенотиптік трансформациясын ынталандыру арқылы ішкі артериялардың ремодельденуіне және неоинтиманың түзілуіне ықпал етеді [21,22].

uPA-ның (pro-uPA) бастама формасы 10q24 хромосомасында орналасқан PLAU генімен кодталады және 54 кДа М.м бар амин қышқылының 411 қалдықтарынан (а.қ.) тұратын бір тізбекті профермент түрінде секреттеледі [28]. pro-uPA молекуласы бірнеше функционалды маңызды домендерді қамтиды. Атап айтқанда, pro-uPA посттрансляциялы тасымалдауды қамтамасыз ететін дабылдық домен (1-5 а.қ.), uPAR рецепторымен uPA-ның байланысуын қамтамасыз ететін өсу факторы сияқты N-соңды домен (6–46 а.қ.), PAI-1 ингибиторымен және интегриндермен байланысуға жауапты, сондай-ақ рецептормен бірге жасуша жылжуын және uPA кешенін тұрақтандыруға қатысатын аймақтары бар крингл домені (50–131 а.қ.), линкерлі домен (132–147 а.қ.), трипсин тәрізді белсенділігі бар каталиттік немесе протеолиттік домен (148–411 а.қ.) [17,29-31].

Екі плазминоген активаторы урокиназа және ұлпалық плазминоген активаторы (ұПА) фибринолизді реттеудегі қызметтері ұқсас, бірақ олардың тамыр қабырғаларына әсері әртүрлі болып шықты. Сонымен, егер урокиназа зақымдалған артериядағы неоинтима өсуіне ғана емес, сонымен қатар тамырдың тарылуына ықпал етсе - қалыңдатылған регидті адвентиция қалыптасуы арқасында конструктивті ремодельдеуге септігін тигізсе, онда tPA, керісінше, оңтайлы ремодельдеуге ықпал ететін неоинтима өсуінің азаюы мен тамырдың кеңеюіне алып келеді [32]. Транскрипциялық матрицалар әдісін қолдана отырып, авторлар урокиназа зақымдалған тамырға әсер еткен кезде қабынуға қарсы гендер тобының экспрессиясын, сондай-ақ митохондриялық тыныс алуды және тотығу күйзелісін реттейтін гендердің көбейетінін көрсетті [33]. Ұлпалық плазминоген активаторы, керісінше, тамыр тонусын реттеуге қатысатын гендердің, сондай-ақ жүйке ұлпаларының қызметіне қатысатын гендердің экспрессиясын арттырады [34]. Демек, плазминоген активаторлары гендердің транскрипциясы мен трансляциясы үрдістеріне әсер етуі мүмкін. Осылайша, урокиназа реактивті оттегінің белсенді формаларының өнімдерін көбейтетін Nox1 және Nox4 оксидазаларын индукциялай отырып, тамырлы тегіс бұлшықет жасушаларының пролиферациясын ынталандырады [11].

Сүтқоректілерде эндотелий жасушаларымен синтезделетін және тамыр қабырғасында локализацияланған ұлпалық типтегі плазминоген активаторы (tPA, ЕС 3.4.21.68) анықталған. tPA плазминогенде uPA байланысын ыдыратады. Оның фибринге жоғары жақындығы бар және фибринолизде шешуші рөл атқарады. Екі фермент те прекурсорлар түрінде көрінеді, олардың негізгі активаторы плазмин [2,3]. Шетік жүйкенің қысылуынан кейін қалпына келетін тышқанның шеткері жүйкесінде аксондардың максималды өсуі, плазминоген активаторларының мРНҚ экспрессиясының едәуір артуымен байланысты [35].

Осылайша, плазминнің пайда болуына әкелетін uPAR мен uPA әрекеттесуі, жасуша бетінде де, перицеллюлярлы кеңістікте де жүреді, бұл БҰМ деградациясында маңызды рөл атқарады және пролиферация, өсу, инвазия және ангиогенез үрдістерінің дамуын қамтамасыз етеді.

Нейрогенез. Орталық жүйке жүйесінің дамуындағы uPA-ның маңызды рөлі туралы мәліметтер бар. Яғни, uPA-uPAR молекулалық кешені нейритогенез үрдісіндегі нейрондық желілердің дұрыс қалыптасуы үшін өте маңызды нейрондардың миграциясы кезіндегі дабылды жасуша аралық жеткізуге қатысады [37]. Сонымен қатар, uPAR-uPA-ң ми нейрондары мен астроциттері арасындағы өзара әрекеттесудің делдалы ретіндегі жаңа биологиялық қызметі анықталды [36]. uPA нейрондарының uPAR астроциттерімен байланысуы ишемиялық зақымданған мидың синапстарын қалпына келтіруге ықпал етеді [37]. Бұл функция плазминнің түзілуін қажет етпейді, бірақ бірқатар сигналдық киназалардың активациясы арқылы делдал болады [38]. *In vitro* зерттеулері көрсеткендей, плазминоген активаторлары культивацияланатын перифериялық нейрондар мен Schwann жасушалары арқылы секреттеледі [39].

Тышқан эмбрионындағы урокиназа рецепторларының экспрессиясын, *in vivo* эмбриональды дамуының алғашқы кезеңдерінде, ми қыртысының қалыптасуының маңызды кезеңдерде (E14) өзгерте отырып, авторлар урокиназа рецепторларын гиперэкспрессиялайтын нейрондар бақылау нейрондарына қарағанда қыртыстың жоғарғы қабаттарына көбірек көшетінін анықтады. Бұл адамдар мен сүтқоректілердің когнитивті қызметтері мен жоғары жүйке қызметіне жауап беретін салалары. Мүмкін, сол себеппен урокиназа рецепторлары гендері алынып тасталған (нокаутты) тышқандардың ми қыртысындағы тежегіш интернейрондардың жетіспеушілігімен, сондай-ақ адамдарда кездесетін аутизм мен шизофренияға тән мінез-құлық ауытқуларымен байланысты ауыр эпилепсия дамиды [40]. Адамдардағы аутизм мен когнитивті ауытқулардың дамуындағы урокиназа рецепторларының қатысуына аутистік спектрі және сөйлеу қабілеті бұзылған науқастарда uPAR гені (Т-аллеля rs344781) полиморфизмінің кездесуінің жоғары жиілігі жөніндегі деректер дәлел бола алады [41].

Фибринолиздің маңызды қатысушысы ретіндегі урокиназа жүйесі жасушадан тыс матриксты қалпына келтіру үшін немесе регенерация кезінде жүйке мен қан тамырларының өсуін жеңілдету үшін ғана емес, сонымен қатар жасушалардың, соның ішінде бағаналы жасушалардың зақымдалу аймағына қоныс аударуы үшін, және де бұрыннан дифференциалданған жасушалардың фенотипін өзгерту үшін қажет екені белгілі болды, яғни бұл трансдифференциация деп аталады, эпителиалды-мезенхималық ауысу деп аталады (ЭМА) [41]. Эпителиалды жасушалар мықты жасушааралық байланыстардың салдарынан көп жасушалы қабат түрінде болады. Бұл жасушалар байланыстрады бұза отырып, қабаттан шығып, мезенхималық фенотипі бар, яғни қысқартатын ақуыздар мен бағаналы сипатқа ие біртұтас жылжитын жасушаларға айналуы мүмкін екендігі белгілі болды. Бұл үрдістер ұлпалардың зақымдануы кезінде жүреді және репарация мен регенерация кезінде маңызды рөл атқарады. Регенерация үрдістері аяқталғаннан кейін кері процесс жүреді - мезенхималды-эпителиалды ауысу (МЭА), нәтижесінде мезенхималық фенотип маркерлерінің экспрессиясы төмендейді, жасушалар өздерінің эпителиалды қасиеттерін қалпына келтіреді.

Авторлар урокиназа рецепторларының экспрессиясы эпителиалды фенотипте жасушаларды ұстап тұратындығын, ал рецепторлар бойынша нокаут ЭМА-ды іске қосатынын көрсетті. CRISPR/Cas9 геномын редакциялау технологиясын қолдана отырып, авторлар Neuro2a нейробластома жасушаларында uPAR-ты нокауттап, олардың көшуінің ұлғайғанын, эпителиалды маркерлер экспрессиясының төмендегенін және мезенхималық маркерлер экспрессиясының жоғарылағанын анықтады. Эпителий жасушаларының мезенхималық жасушаларға айналуы жарақаттың тез жазылуына ықпал етеді. Егер бұл үрдіс мезенхималық жасушалардың эпителийге айналуымен аяқталған жағдайда жазылу фиброзсыз өтеді [41]. Егер бұл үрдіс бұзылған, мезенхималық жасушалар тыртық түзіп, фибробласттарға айналады және жасушадан тыс матрикс секреттейді. Жара жазылмаған жағдайда, эпителиалды қабатымен немесе фиброзды ұлпамен жабылмаған жағдайда ісік пайда болуы мүмкін [42]. Созылмалы жара профиброзды жасушадан қатерлі ісікке дейін, жасушадан тыс матрица мен ЭМА коагуляциясы, фиброзы, қабынуы, қайта құрылуы жиі жүретін құрылым деп түсіндіріледі. Қатерлі ісік кезіндегі ЭМА ісік жасушаларының көшу үрдістері активациясымен түйіседі, бұл ісік жасушалары сабақ түзетін және химиотерапияға деген бірнеше тұрақтылыққа әкелетін өте қолайсыз үрдіс, яғни олардың инвазиясы мен дормантты метастаздардың пайда болуына себеп болып табылады [43]. uPA-uPAR жүйесінің нейрогенездегі маңыздылығын көрсететін дәлелдерге қарамастан, аксон өсуі мен тармақталуындағы uPA мен uPAR рөлі әлі күнге дейін анық зерттелмеген.

Қорытынды

Бұл шолуда біз өсу мен тармақтану үрдістеріндегі, сондай-ақ жүйке жасушаларының жылжуындағы uPA мен uPAR маңызды рөлін сипаттадық. Сонымен қатар, көп функционалды uPA жүйесі фибринолиз үрдісінде ғана емес, қорғаныш реакцияларын жүргізіп, ағзадағы қалыпты қан ағымын реттеуді қамтамасыз ететін негізгі функцияларды орындайды. Сондай-ақ, бұл БҰМ дегенациясында және қан тамырлары мен ұлпалардың өсуі мен қалпына келуінде,

ангиогенезде, эмбриогенезде, жасуша жылжуында, сонымен қатар патологиялық және бірқатар қалыпты физиологиялық үрдістерді реттеуде маңызды.

Пайдаланылған әдебиеттер тізімі

1. Jaiswal R.K., Varshney A.K., Yadava P.K. Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system.//*Biomed. Pharmacother.* - 2018. - V. 98. - P. 886–898.
2. Mahmood N., Mihalciou C., Rabbani S.A. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): diagnostic, prognostic, and therapeutic applications.//*Front. Oncol.* - 2018. - V. 8. - P. 24.
3. Айсина Р.Б., Мұхаметова Л.И. Структура и функции системы плазминоген/плазмин.//*Биоорганич. химия.* - 2014. - Т. 40 (6). - С. 642–657. DOI:10.7868/S0132342314060025. PMID: 25895360.
4. Collen D., The plasminogen (fibrinolytic) system.// *Thromb. Haemost.* - 1999. - V. 82. - P. 259.
5. Blasi F., Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling.//*FEBS Lett.* - 2010. - V. 584. - P. 1923.
6. Bruneau N., Szegetowski P. The role of the urokinase receptor in epilepsy, in disorders of language, cognition, communication and behavior, and in the central nervous system.// *Curr. Pharm. Des.* - 2011. - V. 17. - P. 1914.
7. Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator.// Estreicher A., Wohlwend A., Belin D. et al.// *J. Biol. Chem.* - 1989. - V. 264. - P. 1180.
8. The urokinase plasminogen activator receptor (UPAR) is preferentially induced by nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells and is required for NGF-Driven differentiation.// Farias-Eisner R., Vician L., Silver A. et al.// *J. Neurosci.* - 2000. - V. 20. - P. 230.
9. Vassalli J., Baccino D., Belin D. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator urokinase.// *J. Cell Biol.* - 1985. - V. 100. - P. 86.
10. Activation of p38 MAP-kinase and caldesmon phosphorylation are essential for urokinase-induced human smooth muscle cell migration.// Goncharova E.A., Vorotnikov A.V., Gracheva E.O. et al.// *Biol. Chem.* - 2002. - V. 383. - P. 115.
11. Urokinase plasminogen activator stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via redox-dependent pathways.// Menshikov M., Plekhanova O., Cai H. et al.// *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2006a. - V. 26. - P. 801. , Plakid
12. Urokinase induces matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression in THP-1 monocytes via ERK1/2 and cytosolic phospholipase A2 activation and eicosanoid production.// Menshikov M., Torosyan N., Elizarova E. et al. *J. Vasc. Res.* - 2006b. - V. 43. - P. 482.
13. Фибринолитики: от разрушения тромбов до процессов роста и ремоделирования сосудов, нейрогенеза, канцерогенеза и фиброза.// Ткачук В.А., Парфенова Е.В., Плеханова О.С. и др.// *Терапевтический архив.* - 2019. - № 09. - С. 4-9.
14. Smith H.W., Marshall C.J. Regulation of cell signalling by uPAR.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2010. - V. 11 (1). - P. 23–36. DOI: 10.1038/nrm2821. PMID: 20027185.
15. D'Alessio S., Gerasi L., Blasi F. uPAR-deficient mouse keratinocytes fail to produce EGFR-dependent laminin-5, affecting migration in vivo and in vitro.// *J. Cell Sci.* - 2008. - V. 121 (Pt 23). - P. 3922–3932. DOI: 10.1242/jcs.037549. PMID: 19001498.
16. Mekawy A.H., Pourgholami M.H., Morris D.L. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview.// *Med. Res. Rev.* - 2014. - V. 34 (5). - P. 918–956. DOI: 10.1002/med.21308. PMID: 24549574.
17. Reversible interactions between plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1.// Mimuro J., Kaneko M., Murakami T. et al.// *Biochim. Biophys. Acta.* - 1992. - V. 1160 (3). - P. 325–334. DOI:10.1016/0167-4838(92)90095-U. PMID: 1477106.
18. Lijnen H.R. Pleiotropic functions of the plasminogen activator inhibitor 1.// *J. Thromb. Haemost.* - 2005. - V. 3 (1). - P. 35–45. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2004.00827.x. PMID: 15634264.
19. Kruithof E.K., Baker M.S., Bunn C.L. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2.// *Blood.* - 1995. - V. 86 (11). - P. 4007–4024. PMID: 7492756.
20. Ткачук В.А., Плеханова О.С., Белоглазова И.Б., Парфенова Е.В. Роль мультидоменной структуры урокиназы в регуляции роста и ремоделирования сосудов.// *Укр. биохим. журнал.* - 2013. - Т. 85 (6). - С. 18–45.
21. Chemotactic effect of urokinase plasminogen activator: a major role for mechanisms independent of its proteolytic or growth factor domains.// Poliakov A.A., Mukhina S.A., Traktouev D.O. et al.// *J. Recept. Signal Transduct. Res.* - 1999. - V. 19. - P. 939.
22. Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor-dependent and proteolysis-dependent mechanisms.// Stepanova V., Mukhina S., Kohler E. et al.// *Mol. Cell. Biochem.* - 1999. - V. 195. - P. 199.
23. The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of interactions and contribution to chemotaxis.// Mukhina S., Stepanova V., Traktouev D. et al.// *J. Biol. Chem.* - 2000. - V. 275. - P. 16450.
24. Mondino A., Blasi F. uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology.// *Trends Immunol.* - 2004. - V. 25 (8). - P. 450–455. DOI: 10.1016/j.it.2004.06.004. PMID: 15275645.
25. Blasi F., Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2002. - V. 3. - P. 932.
26. Urokinase-type plasminogen activator expression by neurons and oligodendrocytes during process outgrowth in developing rat brain.// Dent M.A., Sumi Y., Morris R.J., Seeley P.J.// *Eur. J. Neurosci.* - 1993. - V. 5. - P. 633.

27. Kjoller L., Hall A. Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. // *J. Cell Biol.* - 2001. - V. 152. - P. 1145.
28. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. / Appella E., Robinson E.A., Ullrich S.J. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1987. - V. 262 (10). - P. 4437-4440. PMID: 3031025.
29. The kringle domain of urokinase-type plasminogen activator potentiates LPS-induced neutrophil activation through interaction with $\alpha_5\beta_3$ integrins. / Kwak S.H., Mitra S., Bdeir K. et al. // *J. Leukoc. Biol.* - 2005. - V. 78 (4). - P. 937-945. DOI: 10.1189/jlb.0305158. PMID: 16033814.
30. Integrin $\alpha_5\beta_3$ orchestrates and accelerates plasminogen activation and fibrinolysis by neutrophils. / Pluskota E., Soloviev D.A., Bdeir K. et al. // *J. Biol. Chem.* - 2004. - V. 279 (17). - P. 18063-18072. DOI: 10.1074/jbc.M310462200. PMID: 14769799.
31. The kringle stabilizes urokinase binding to the urokinase receptor. / Bdeir K., Kuo A., Sachais B.S. et al. // *Blood.* - 2003. - V. 15 (10). - P. 3600-3608. DOI: 10.1182/blood-2003-03-0949. PMID: 12881310.
32. Урокиназа стимулирует, а тканевой активатор плазминогена подавляет развитие стеноза кровеносных сосудов. / Плеханова О.С., Соломатина М.А., Домогатский С.П. и др. // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* - 2001. - Т. 87 (5). - С. 584-593.
33. Oligonucleotide microarrays reveal regulated genes related to inward arterial remodeling induced by urokinase plasminogen activator. / Plekhanova O., Berk B.C., Bashtrykov P. et al. // *J Vasc Res.* - 2009. - V. 46 (3). - P. 177-87. doi: 10.1159/000156703.
34. Oligonucleotide microarrays identified potential regulatory genes related to early outward arterial remodeling induced by tissue plasminogen activator. / Plekhanova O., Parfyonova Y., Beloglazova I. et al. // *Front Physiol.* - 2019. - V. 10. - P. 493. doi:10.3389/fphys.2019.00493.
35. Siconolfi, L.B., Seeds N.W. Mice lacking tPA, uPA, or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush. // *J. Neurosci.* - 2001. - V. 21. - P. 4348.
36. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching. / Semina E., Rubina K., Sysoeva V. et al. // *Eur. J. Cell. Biol.* - 2016. - V. 95 (9). - P. 295-310. DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.05.003. PMID: 27324124.
37. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) binding to the uPA receptor (uPAR) promotes axonal regeneration in the central nervous system. / Merino P., Diaz A., Jeanneret V. et al. // *J. Biol. Chem.* - 2017. - V. 292 (7). - P. 2741-2753. DOI: 10.1074/jbc.M116.761650. PMID: 27986809.
38. A cross talk between neuronal urokinase-type plasminogen activator (uPA) and astrocytic uPA receptor (uPAR) promotes astrocytic activation and synaptic recovery in the ischemic brain. / Diaz A., Merino P., Manrique L.G. et al. // *J. Neurosci.* - 2017. - V. 37 (43). - P. 10310-10322. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1630-17.2017. PMID: 28931568.
39. Krystosek A., Seeds N.W. Peripheral neurons and Schwann cells secrete plasminogen activator. // *J. Cell Biol.* - 1984. - V. 98. - P. 773.
40. Levitt P. Disruption of Interneuron Development. // *Epilepsia.* - 2005. - V. 46 (7). - P. 22-28. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00305>.
41. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. / Stone R.C., Pastar I., Ojeh N. et al. // *Cell Tissue Res.* - 2016. - V. 365 (3). - P. 495-506. doi: 10.1007/s00441-016-2464-0.
42. Rybinski B., Franco-Barraza J., Cukierman E. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. // *Physiol Genomics.* - 2014. - V. 46 (7). - P. 223-244. doi: 10.1152/physiolgenomics.00158.2013.
43. Weidenfeld K., Barkan D. EMT and Stemness in Tumor Dormancy and Outgrowth: Are They Intertwined Processes? // *Front Oncol.* - 2018. - V. 8. - P. 381. doi: 10.3389/fonc.2018.00381.

Корреспондент автор: Мухаммед Ахтер И.К. - генетика және микроорганизмдердің биохимиясы зертханасының жетекші ғылыми қызметкері, т.ғ.к. ҚР БҒМ ҰК «Республикалық микроорганизмдер жинағы» РМК; электрондық пошта: indiara@mail.ru, 8 (7172) 20 10 32.

МРНТИ 76.03.43+62.09.39+34.15.23
УДК 579.262

МОДУЛЯЦИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПОСЛЕ ДИСБИОЗА ВЫЗВАННОГО ДЕКСТРАН СУЛЬФАТОМ НАТРИЯ

С.С. Кожаметов^{1,2,3}, Д.Б. Бабенко^{4,5}, А.К. Туякова¹, М.А. Нургазиев¹, А.Ф. Нургожина¹, Н.А. Муханбетжанов³, Л.Е. Чуленбаева¹, Ш.Д. Сергазы¹, А.Е. Гуляев¹, А.Р. Кушугул^{1,2}

¹National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Нур-Султан, Казахстан

²Казахстанская ассоциация изучения микробиома человека, Нур-Султан, Казахстан

³ТОО SaumalBioTech, Нур-Султан, Казахстан

⁴Научно-исследовательский центр Карагандинский Медицинский Университет, Караганда, Казахстан

⁵TOO G-SHAG, Нур-Султан, Казахстан

Это исследование показало потенциал биологического продукта на основе кобыльего молока и метаболитов симбиотической микрофлоры для модуляции кишечной микрофлоры после дисбактериоза, вызванного декстрансульфатом натрия (ДСН). Язвенный колит у крыс моделировался внутрижелудочным введением 10% раствора ДСН. Результаты секвенирования продемонстрировали снижение биологического разнообразия микробиоты после индукции колита и восстановление после 7 дней использования биопрепарата. Продукт вызвал структурные изменения микробиома, поврежденного DSS. Повышались концентрации КЖК-продуцирующих бактерий: *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Muribaculaceae*, *Ruminococcaceae*.

Ключевые слова: ДСН-индуцированный дисбиоз, микробиом кишечника, микробное разнообразие, биологический продукт, крысы.

MODULATION OF THE GUT MICROBIOTA AFTER DEXTRAN SULFATE SODIUM INDUCED DYSBIOSIS

S. Kozhakhmetov^{1,2,3}, D. Babenko^{4,5}, A. Tuyakova¹, M. Nurgaziyev¹, A. Nurgozhina¹, N. Muhanbetganov³, L. Chulenbayeva¹, S. Sergazy¹, A. Gulyayev¹, A. Kushugulova^{1,2}

¹National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Kazakhstan

²Kazakhstan society of researchers of human microbiome, Nur-Sultan city, Kazakhstan

³SaumaBioTech LLP, Nur-Sultan city, Kazakhstan

⁴Research Center Karaganda Medical University, Karagandy city, Kazakhstan

⁵G-SHAG LLP, Nur-Sultan city, Kazakhstan

This study showed the potential of a biological product based on mare's milk and a metabolites of symbiotic microflora to modulate intestinal microflora after dextran sulfate sodium (DSS)-induced dysbiosis. Rat ulcerative colitis has been developed using intra-gastric administration of 10% DSS solution. The results of sequencing demonstrated a decrease in biological diversity of microbiota after the induction of colitis, and recovery after 7 days of use of the biological product. The product induced the structural changes of the microbiome damaged by DSS. Representatives of SCFA producing bacteria increased concentrations of *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Muribaculaceae*, *Ruminococcaceae*.

Key words: DSS-induced dysbiosis, gut microbiome, microbial diversity, biological product, rats.

НАТРИЙ ДЕКСТРАН СУЛЬФАТЫМЕН ТУЫНДАҒАН ДИСБИОЗДАН КЕЙІН ІШЕК МИКРОБИОТЫНЫҢ МОДУЛЯЦИЯСЫ

С.С. Қожахметов^{1,2,3}, Д.Б. Бабенко^{4,5}, А.Қ. Тұяқова¹, М.А. Нұрғазиев¹, А.Ф. Нұрғожина¹, Н.А. Мұханбетжанов³, Л.Е. Чуленбаева¹, Ш.Д. Серғазы¹, А.Е. Гуляев¹, А.Р. Күшүгула^{1,2}

¹National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

²Қазақстан адам микробиомын зерттеу Ассоциациясы, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

³SaumaBioTech ЖШС, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

⁴Қарағанды Медицина Университеті Ғылыми-зерттеу орталығы, Қарағанды қ., Қазақстан

⁵G-SHAG ЖШС, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Бұл зерттеу бие сүтінің және симбиотикалық микрофлораның метаболиттерінің негізінде биологиялық өнімнің натрий декстрансульфатынан (НДС) туындаған дисбактериоздан кейін ішек микрофлорасын модуляциялау үшін әлеуетін көрсетті. Егеуқұйрықтардың ойық жарасы 10% НДС ерітіндісін интрагастралық енгізумен үлгіленді. Секвенирлеу нәтижелері колит индукциясынан кейін микробиотаның биологиялық әртүрлілігінің төмендеуін және биопрепаратты 7 күннен кейін қалпына келтіруді көрсетті. Өнім НДС зақымдалған микробиомның құрылымдық өзгерістерін тудырды. КЖК-өндіруші бактериялардың концентрациясы жоғарылаған: *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Muribaculaceae*, *Ruminococcaceae*.

Түйінді сөздер: НДС-индукцияланған дисбиоз, ішек микробиомы, микробтық әртүрлілігі, биологиялық өнім, егеуқұйрықтар.

Введение

Кишечный микробиом представляет собой живую высоко диверсифицированную, гетерогенную экосистему, выполняющую и регулирующую важнейшие физиологические и иммунологические функции. Вместе с тем существует много данных, свидетельствующих о

роли микробиома кишечника в патогенезе различных заболеваний, таких как, ожирение, сахарный диабет, воспалительные заболевания кишечника, неалкогольный стеатогепатит, кардиоваскулярные заболевания [1]. Также кишечная микробиота выполняет существенную роль в защите организма от негативного воздействия внешней среды. В процессе своей жизнедеятельности выполняет такие важные функции для симбионтного взаимоотношения с организмом человека как, антимикробная для защиты от инфекций, стимулирование иммунитета, синтез вторичных жирных кислот, продукция витаминов. Одной из важнейших функций является синтез короткоцепочечных жирных кислот (КЖК). КЖК это мажорный класс метаболитов, продуцируемых бактериями в толстом кишечнике путем сахаролитической ферментации углеводов или ферментацией белков [2]. Основными видами продуцирующими бутираты являются *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* и *R. bromii*. *Bacteroidetes* присутствуют в меньшей пропорции и включают в себя следующих основных представителей *Alistipes*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella* продуцирующих в большинстве своем пропионаты и ацетаты [3]. Потенциальная роль КЖК как сигнальные молекулы, регулирующие гомеостаз глюкозы в печени [4].

Обнаружено, что сокращение разнообразия микрофлоры толстого кишечника коррелирует со многими заболеваниями, например, такими как метаболический синдром [5], сахарный диабет второго типа [6], воспалительные заболевания кишечника и колоректальный рак [7]. Потеря значительной части микрофлоры связана с диетой с высоким содержанием жиров и волокон с низким содержанием клетчатки. Напротив, потребление пищи с высоким содержанием ферментированных и растительных волокон увеличивает разнообразие микрофлоры. Сами пищевые волокна не могут перевариваться в кишечнике и проходят верхние отделы пищеварительного тракта, в значительной степени, неповрежденными, где становятся пищей для микробиоты [8].

Анаэробный метаболизм пищевых волокон толстокишечной микрофлорой приводит к продукции короткоцепочечных жирных кислот, в частности к ацетату, бутирату и пропианату. КЖК модулируют физиологические процессы организма хозяина и, как полагают, способствуют поддержанию здоровья [9]. Например, диета с высоким содержанием пшеничных отрубей способствует росту и развитию бактерий, продуцирующих бутират, принадлежащих к семейству *Lachnospiraceae* (*Eubacterium xylanophilum* и *Butyrivibrio* spp.) [10]. Молярное соотношение ацетата, пропионата и бутирата в толстой кишке и стуле составляет около 3: 1: 1 [11].

Бутират является ключевым источником энергии для колоноцитов, обладает потенциальной противораковой активностью благодаря способности вызывать апоптоз раковых клеток толстого кишечника. Важной функцией бутирата является активирование глюконеогенеза кишечника через цАМФ-зависимый механизм, благотворно влияющий на глюкозу и энергетический гомеостаз [12]. Пропионат также является источником энергии для эпителиальных клеток, играет роль в глюконеогенезе. Также считается, что он является важной молекулой для передачи сигналов сытости благодаря взаимодействию с рецепторами кишечника [13]. Ацетат является наиболее распространенным КЖК и является важным кофактором / метаболитом для роста других бактерий. Например, *Faecalibacterium prausnitzii* не будет расти в чистой культуре в отсутствие ацетата.

Цель

Изучить влияние метаболитов микробных культур (включая КЖК) на структуру кишечного микробиома.

Материалы и методы

Рекрутинг здоровых добровольцев проводился в период с декабря 2018 года по апрель 2019 года. Сбор образцов осуществлялся согласно процедурам [14]. Собрано 6 образцов стула. Все добровольцы были ознакомлены с исследованием и заполнили информированное согласие на исследование. Исследование получило одобрение локального этического комитета Центра

наук о жизни, ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университета, выписка из протокола № 20 от 22.09.2017 г.

Получение чистых бактериальных культур

Образцы стула, в транспортной среде доставленные в лабораторию не позднее 2 часов после дефекации. Серийные разведения фекалий производили в стерильном физиологическом растворе. Высев проводили на следующие питательные среды: WilkinsChalgrenAgar, BSM Agar, MeatInfusionAgar, BrainHeartInfusionAgar, BifidobacteriumAgar, MRS Agar, ReinforcedClostridialAgar, LBagar. Инкубирование проводилось на чашках Петри в анаэробных условиях (CO_2 – 13,0%, N_2 – 86,5%, O_2 – 0,5%). Единичные колонии бактерий отсеивали в чистые питательные среды. Определение чистоты культур проводили путем микрокопирования.

Идентификация

Выращенные культуры идентифицировались с использованием Maldi Biotyper. Образцы для MALDI-TOF MS готовили следующим образом: проводили прямой перенос свежей единичной колонии на полированную стальную мишень MSP 96 (Bruker Daltonik), подсушивали. Покрывали 1 мкл насыщенного раствора α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) матричный раствор в 50% ацетонитриле-2,5% трифторуксусной кислоты (Bruker Daltonik) и сушили при комнатной температуре [15]. Идентификацию микроорганизмов до вида производилась путём сопоставления полученных масс-спектров белков с референтной базой.

Определение короткоцепочечных жирных кислот

Осаждение культур проводили центрифугированием при 6000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбирали в чистые пробирки. В качестве бланка использовали среду, соответствующую культивирования. Подготовка стандартов: желаемая концентрация стандартов (Пропионовая кислота, 94425-1ML-F, Sigma-Aldrich; Масляная кислота 19215-5ML, Sigma-Aldrich; Молочная кислота PHR1215-3X1.5ML Sigma-Aldrich; Уксусная кислота PHR1748-3X1,5ML, Sigma-Aldrich). Готовили стоковые концентрации стандартов 200 мг/л в ацетонитриле. Из стока готовили 7,5 мкл (1,5 мкг), 15 мкл (3 мкг), 22,5 мкл (4,5 мкг), 30 мкл (6,0 мкг) стандартов для молочной кислоты. Дериватизацию проводили добавлением к стандартам и испытуемым образцам 20 мкл N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide with 1% tert-Butyldimethylchlorosilane. Тестируемые пробирки со стандартами и образцами были выдержаны 3 часа при 70 °C. Для масляной, пропионовой и уксусной кислот: 2 мкл (4 мкг), 5 мкл (10 мкг), 10 мкл (20 мкг) и 15 мкл (30 мкг). После сушки продуктов в атмосфере азота добавляли 100 мкл (9000 мкг) этилацетата для ресуспендирования содержимого, пробирки встряхивали в течение 1 минуты перед GC/MS анализом.

Для анализа КЖК был использован прибор GC/MS Agilent 5977B GC/MSD квадрупольный масс-спектрометр.

Подготовка исследуемого продукта

Исследуемый продукт получали путем смешивания бактериальных культур и их лизирования. Супернатант лизированных культур получали путем центрифугирования при 12 000 об/мин в течение 60 мин. Полученную субстанцию смешивали с кобыльим молоком и сублимационно высушивали.

Моделирование язвенного колита

Исследование проводилось на 16 лабораторных животных (крысы мужского пола линии Вистар со средней массой 250-280 г.) в виварии Национального Центра Биотехнологии (Нур-Султан) со стандартным рационом питания и ухода. Крыс помещали в отдельные клетки в комнате, свободной от патогенов, и для акклиматизации за 7 дней до начала эксперимента. Во время акклиматизации и эксперимента крысы потребляли стандартную коммерчески доступную диету. Животные содержались и эксперименты проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных (NationalResearchCouncil 2011) и этическими принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (CouncilofEurope 2006).

Колит у крыс был воспроизведен с использованием 10% раствора ДСН (Декстран сульфат натрия, MW - 40 кДА, SigmaAldrich), введенного крысам внутрижелудочно с использованием

зонда в течение 7 дней в объеме 5 мл. Исследуемый продукт вводили внутривентриально в дозе 45 мг/кг массы тела животного один раз в день в течение 7 дней после введения 10% раствора ДСН. Здоровая группа –1НС (без колита) получали питьевую воду внутривентриально вместо 10% ДСН в течение 7 дней, а затем еще 7 дней вместо лечения (n = 4). Экспериментальная группа - 2EGwater (с колитом) получавшая 10% раствор ДСН в течение 7 дней и воду в течение последующих 7 дней (n = 4). Экспериментальная группа - 3EGsp(с колитом) получавшая 10% раствор ДСН в течение 7 дней и изучаемый продукт внутривентриально в дозе 500 мг / кг массы тела один раз в день в течение последующих 7 дней (n = 4). Группа сравнения 4EG_5-asa(с колитом) получала 10% раствор ДСН в течение 7 дней и в качестве лечения 5-ASA (5-аминосалициловую кислоту) внутривентриально в дозе 100 мг / кг массы тела животного один раз в течение 7 дней (n = 4). Крысы выводились из эксперимента путем передозировки углекислого газа [16]. Фекальные образцы собирали до и после эксперимента и оценивали консистенцию и цвет. Также проводили оценку кишечной проницаемости и массы тела.

Секвенирование и анализ микробиома

ДНК было изолировано с использованием коммерческого набора QIAampDNAMiniKit (Qiagen, 51306). Концентрацию двуцепочечной ДНК измеряли с использованием прибора Qubit 2.0 и набора QubitdsDNAHSAssaykit (ThermoFisher, catalognumber 32853).

Библиотеки участка 16S ДНК готовили с использованием NEXTflex® 16SV1-V3 Amplicon-SeqKit (PerkinElmer, catalognumberNOVA-4202-04), в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию библиотек оценивали с помощью набора QubitdsDNAHSAssayKit (Invitrogen, LifeTechnologies, GrandIsland, NY, USA). Качество библиотек оценивали с использованием Agilent 2100 Bioanalyzer. Ампликоны были секвенированы на прибореMiSeqinstrument (Illumina). Демультимплексирование, фильтрацию, снижение шума, удаление химерных последовательностей, определение операционных таксономических единиц (OTU) и идентификация были выполнены с использованием LotuS [17].

Анализ альфа-разнообразия для оценки численности сообщества, подсчет альфа-биоразнообразия (индекс Шеннона), бета-биоразнообразия, а также построение таксономического распределения на уровне типов и рода были выполнены с использованием vegan и пакеты phyloseqR (v.1.24.2) и графики были созданы с использованием веб-платформы для комплексного анализа –MicrobiomeAnalyst [18].

Статистический анализ

Непараметрические тесты Манна-Уитни (MW) и Крускала-Уоллиса (KW) использовались для сравнения двух или более групп. Сырые данные были нормализованы по общему количеству операций чтения. Подход к обнаружению метагеномных биомаркеров, линейный дискриминантный анализ EffectSize (LEfSe), был использован для идентификации микробных компонентов, чьи последовательности статистически различались между группами. Для оценки величины эффекта каждого дифференциально обильного таксона были проведены LEfSe, Kruskal-Wallis и попарные тесты Вилкоксона, после чего был проведен линейный дискриминантный анализ (LDA). Бактерии с заметно увеличенными числами были определены как бактерии с LDA-баллом (log10) более 2.

Результаты и обсуждение

Из отобранных образцов было выделено и идентифицировано 425 изолятов. Все образцы были скринированы на продукцию КЖК. Результаты показали, что из отобранных культур 86 продуцируют уксусную, молочную, пропионовую и масляную кислоты: *Bifidobacterium longum* 32 культуры, *Bifidobacterium adolescentis* 15 культур, *Bifidobacterium bifidum* 15 культур, *Lactobacillus rhamnosus* 7 культур, *Streptococcus salivarius* 4 культуры, *Bifidobacterium animalis* 3 культуры, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 2 культуры, *Enterococcus durans* 2 культуры, *Lactobacillus ruminis* 2 культуры, *Faecalibacterium prausnitzii* 1 культура, *Eubacterium rectale* 1 культура, *Eubacterium hallii* 1 культура, *Coprococcus eutactus* 1 культура.

В таблице приведены бактерии с высокой продукцией короткоцепочечных жирных кислот. Наиболее высокими продуцентами являются: *Eubacterium hallii* kz2f1, *Faecalibacterium*

prausnitzii kz4d9, *Eubacterium rectale* kz4e5, *Enterococcus durans* kz5b9, *Enterococcus durans* kz5b10.

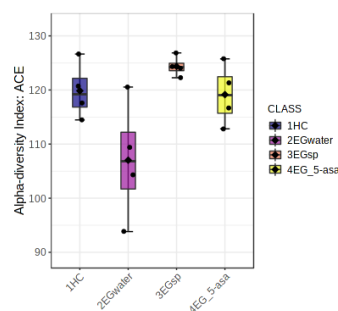
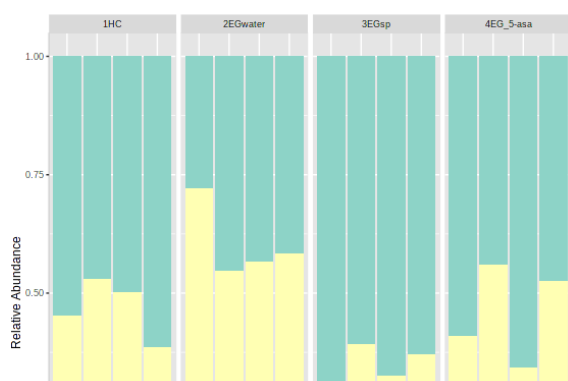
Таблица - Продукенты короткоцепочечных жирных кислот.

Наименование	Продукция короткоцепочечных жирных кислот, ммол/л			
	ацетат	бутират	пропионат	лактат
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> kz1d1	<10	>10	>10	<10
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> kz1d11	>10	>10	>10	<10
<i>Eubacterium hallii</i> kz2f1	-	<20	<10	-
<i>Coprococcus eutactus</i> kz2f6	-	<15	-	-
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> kz4d9	-	<20	-	-
<i>Eubacterium rectale</i> kz4e5	-	<20	<10	-
<i>Enterococcus durans</i> kz5b9	<20	<20	<10	>5
<i>Enterococcus durans</i> kz5b10	<20	<20	<10	>5
<i>Alistipes shahii</i> kz6A6	<10	<15	-	-

Эффект биологического продукта на ДСН индуцированный дисбиоз

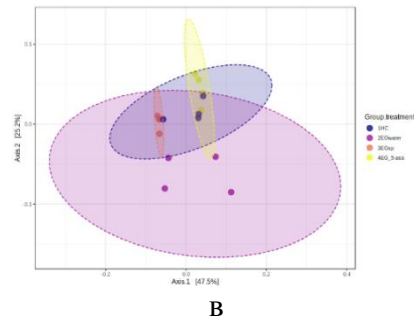
Эффект биологически-активной субстанции на основе метаболитов микробных культур (включая КЖК) и кобыльего молока оценивали на модели язвенного колита у крыс. Оценку проводили по индексу активности заболевания (DAI), который рассчитывали по шкале от 0 до 4 с использованием следующих параметров: потеря массы тела (0, нет; 1, 0–5%; 2, 5–10%; 3, 10–20%; 4, >20%); консистенция стула (0: нормальный; 2: жидкий стул; 4: водянистая диарея); кровотечение (0, нет; 1, следы; 2, слабая скрытая кровь; 3, очевидная скрытая кровь; 4, сильное кровотечение). После 1 недели приема ДСН стул был в основном мягким, а в некоторых случаях пастообразным, кровотечения не наблюдалось. DAI не показал отличий с группой сравнения, принимавшей 5-аминосалициловую кислоту. Чтобы определить способность продукта модулировать микрофлору, образцы стула крыс после 1 недели введения препаратов. Всего было отобрано 16 образцов кала у 16 самцов крыс. Образцы фекалий крыс собирали в стерильные центрифужные пробирки и сразу же замораживали при -80°C.

Для анализа микробного сообщества был выбран регион V1 – V3 гена 16SrRNA. Глубина охвата составляла не менее 36 700 чтений на один образец. Все последовательности сиквенсов сравнивались с базой данных SILVA с использованием биоинформатического процесса LotuS. В среднем было определено 66995 чтений на образец. Таксономическая идентификация бактериального сообщества позволила выявить различные филумы, из которых наиболее представленными являлись *Firmicutes* и *Bacteroidetes* (рисунок 1а).



б

а

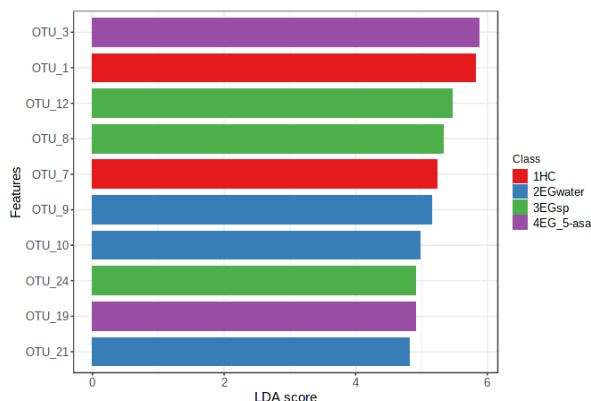


В

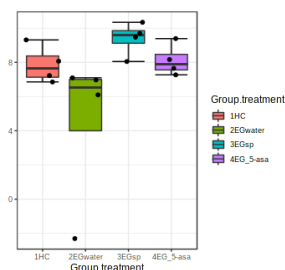
Рисунок 1 - Эффект введения декстран сульфат натрия на кишечную микрофлору крыс. а) Альфа-разнообразие, p -value: 0.020937; [ANOVA] F -value: 4.7437.6) Бетта-разнообразие, Анализ главных координат UnweightedUniFrac Distance [PERMANOVA] F -value: 4.4685; R -squared: 0.52766; p -value < 0.001. 1HC – группа здоровых животных, 2EGwater – группа, принимающая воду, 3EGsp – группа, принимавшая биологический продукт, 4EG_5-asa – группа, принимавшая 5-аминосалициловую кислоту.

Для определения разнообразия кишечных микробных сообществ крыс в различных изучаемых группах использовалась метрика α -разнообразия, реализованная в R. Применение 10% ДСН привело к снижению биоразнообразия и α -разнообразия, на уровне родов, в экспериментальных группах. Наиболее значительное снижение биоразнообразия наблюдалось в группе крыс, с ДСН индуцированным колитом без лечения, принимавших воду (рис. 1б). В группе, принимавшей биологический продукт на основе метаболитов микробных культур, биоразнообразие кишечной микрофлоры повысилось после 7 дней приема. В то время как, индекс ACE в группе, принимавшей 5-ASA (5-аминосалициловую кислоту) был сопоставим с группой здоровых животных. Снижение биоразнообразия кишечной микрофлоры связывают с изъязвлениями (вызванными ДСН) и локальной активацией нейтрофилов и макрофагов. PCoA анализ показал значительную разницу в микрофлоре при многомерном шкалировании. Рисунок 1 демонстрирует значительную разницу в биоразнообразии в группах, принимавших биологический продукт (красный эллипс) и 5-аминосалициловую кислоту (желтый эллипс).

Для определения различий между группами использовался линейный дискриминационный анализ (LDA), (рисунок 2). Анализ позволил определить наиболее представленные бактерии в каждой исследуемой группе. Так в здоровой группе наиболее представленными были *Lactobacillus* (OTU_1), *Lachnospiraceae* (OTU_19), в группе, без лечения, с ДСН индуцированным колитом *Prevotella* (OTU_9, OTU_10), *Alloprevotella* (OTU_21), в группе с биологическим продуктом *Eubacterium coprostanoligenes* group (OTU_12), *Lactobacillus* (OTU_8), *Muribaculaceae* (OTU_24), в группе сравнения с 5-аминосалициловой кислотой *Lactobacillus murinus* (OTU_3), *Lachnospiraceae* (OTU_19).



а



Ruminococcaceae

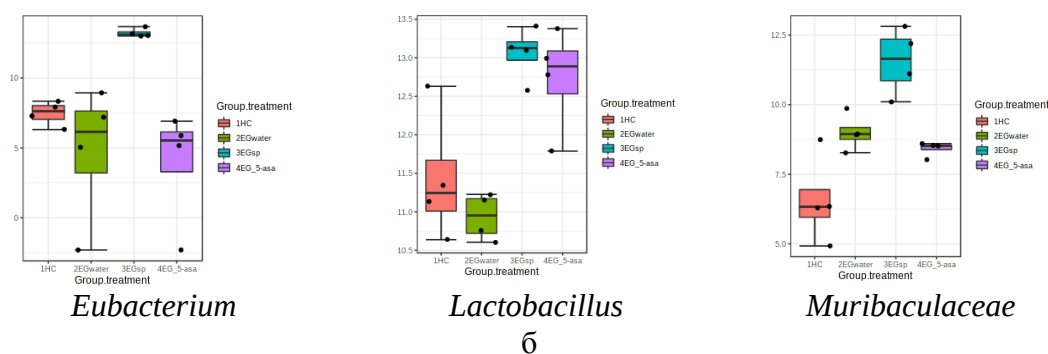


Рисунок 2 - Линейный дискриминационный анализ (LDA) Размер эффекта (LEfSe), уровень OTU, p -value < 0.05. а) по всем группам. б) эффект биологического продукта.

В этом исследовании в группе здоровых животных топ-10 таксонов включали следующие бактериальные роды: *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Romboutsia*, *Lachnospiraceae*, *Mycoplasma*, *Rikenella*, *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Parasutterella*, *Ruminococcus*. После формирования модели ДСН-индуцированного колита в топ-10 таксонов вошли *Treponema*, *Butyricicoccus*, *Turicibacter*. В то же время количество микоплазм, рикенелл, парабактероидов уменьшилось. Результаты соответствуют опубликованным данным [19].

Использование пакета для дифференциального анализа численности в редких данных высокопроизводительных маркеров metagenomeSeq позволило выявить влияние биологического продукта на увеличение роста *Caldicoprobacteriales*, *Rhodospirillales*, *Peptostreptococcales*, *Tissierellales*.

Применение биологического препарата на основе метаболитов бактерий (включая КЖК) привело к сдвигу бактериальной структуры микробиома кишечника с увеличением грамположительных *Eubacterium*, *Lactobacillus*, грамотрицательных *Muribaculaceae*. *Eubacterium coprostanoligenes* характеризуется холестерол редуцирующими свойствами и продукцией КЖК (уксусная кислота) [20]. Интересно, что применение биологического продукта привело к восстановлению популяции *Muribaculaceae*, являющимся одним из доминирующих видов в кишечнике здоровых мышей и характеризуется продукцией КЖК (пропионовая кислота) [21].

Заключение

Фактически, сдвиг микробиоты может напрямую влиять на жизненно важные функции организма [22,23]. В проведенном исследовании мы наблюдали увеличение штаммов, продуцирующих КЖК, включая *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Muribaculaceae*, *Ruminococcaceae* в результате применения биологического продукта. Кроме того, было обнаружено уменьшение количества *Helicobacter* и других представителей патогенной микрофлоры кишечника. Наши результаты показывают, что биологически активные вещества бактерий и кобылье молоко обладают терапевтическим потенциалом для лечения язвенного колита. Однако для подтверждения его эффективности и клинической значимости необходимы дополнительные исследования.

Список литературы

1. Yoshida N., Yamashita T., Hirata K.-I. Gut Microbiome and Cardiovascular Diseases // Dis. (Basel, Switzerland). MDPI - 2018. Vol. 6, № 3. - P. 56.
2. Short-chain fatty acids: ready for prime time? / Roy C.C. et al. // Nutr. Clin. Pract. United States. - 2006. - Vol. 21, № 4. - P. 351–366.
3. Macfarlane S., Macfarlane G.T. Regulation of short-chain fatty acid production. // Proc. Nutr. Soc. England. - 2003. - Vol. 62, № 1. - P. 67–72.
4. Morrison D.J., Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. // Gut Microbes. United States. - 2016. - Vol. 7, № 3. - P. 189–200.
5. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. / Karlsson F. et al. // Diabetes. - 2013. - Vol. 62, № 10. - P. 3341–3349.
6. Gut microbial diversity is reduced and is associated with colonic inflammation in a piglet model of short bowel syndrome. / Laphorne S. et al. // Gut Microbes. - 2013. - Vol. 4, № 3. - P. 212–221.
7. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. / Ahn J. et al. // J. Natl. Cancer Inst. - 2013. - Vol.

105, № 24. - P. 1907–1911.

8. Hamaker B.R., Tuncil Y.E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. // *J. Mol. Biol. England*. - 2014. - Vol. 426, № 23. - P. 3838–3850.
9. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites./Koh A. et al. // *Cell. United States*. - 2016. - Vol. 165, № 6. - P. 1332–1345.
10. Wheat bran promotes enrichment within the human colonic microbiota of butyrate-producing bacteria that release ferulic acid./Duncan S.H. et al. // *Environ. Microbiol.* - 2016. - Vol. 18, № 7. - P. 2214–2225.
11. Canfora E.E., Jocken J.W., Blaak E.E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. // *Nat. Rev. Endocrinol. England*. - 2015. - Vol. 11, № 10. - P. 577–591.
12. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits./De Vadder F. et al. // *Cell. United States*. - 2014. - Vol. 156, № 1–2. - P. 84–96.
13. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids./Brown A.J. et al. // *J. Biol. Chem. United States*. - 2003. - Vol. 278, № 13. - P. 11312–11319.
14. Clinical Microbiology Procedures Handbook./Weinstein M.P. et al., 2018. - 296 p.
15. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory./Schulthess B. et al. // *J. Clin. Microbiol. United States*. - 2014. - Vol. 52, № 4. - P. 1089–1097.
16. A comparison of euthanasia methods in rats, using carbon dioxide in prefilled and fixed flow rate filled chambers./Hewett T.A. et al.// *Lab. Anim. Sci. United States*. - 1993. - Vol. 43, № 6. - P. 579–582.
17. LotuS: an efficient and user-friendly OTU processing pipeline / Hildebrand F. et al. // *Microbiome*. - 2014. - Vol. 2, № 1. - P. 30.
18. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data/ Chong J. et al. // *Nat. Protoc.* - 2020. - Vol. 15, № 3. - P. 799–821.
19. Microbiota of Inflammatory Bowel Disease Models/ Gao Z. et al. // *Conf. Proc. ... Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* - 2018. - Vol. 2018. - P. 2374–2377.
20. Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe./Freier T.A. et al.// *Int. J. Syst. Bacteriol. Englan.* - 1994. - Vol. 44, № 1. - P. 137–142.
21. Phoceia, Pseudoflavonifractor and Lactobacillus intestinalis: Three Potential Biomarkers of Gut Microbiota That Affect Progression and Complications of Obesity-Induced Type 2 Diabetes Mellitus /Wang Y. et al.// *Diabetes. Metab. Syndr. Obes. Dove*. - 2020. - Vol. 13. - P. 835–850.
22. Järbrink-Sehgal E., Andreasson A. The gut microbiota and mental health in adults. // *Curr. Opin. Neurobiol. England*. - 2020. - Vol. 62. - P. 102–114.
23. Long-Term Effects of Multi-Drug-Resistant Tuberculosis Treatment on Gut Microbiota and Its Health Consequences/Wang J. et al.// *Frontiers in Microbiology*. - 2020. - Vol. 11. - P. 53.

Автор для корреспонденции: Кожамбетов Самат Серикович – старший научный сотрудник лаборатории микробиома человека и долголетия Центра наук о жизни ЧУ «National Laboratory Astana»; skozhakhmetov@nu.edu.kz

МРНТИ 34.27.17+34.27.39

ИЗУЧЕНИЕ КИСЛОТООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ *A. NIGER*, ПОЛУЧЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ МУТАГЕНЕЗА

С.А. Садуахасова, Г.Х. Оспанкулова, Б.С. Шайменова, Е.Е. Ермеков, Л.А. Мурат
Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина, Нур-Султан, Казахстан

Для гиперпродуцирования лимонной кислоты штаммами аспергилл, выделенными нами из различных биообразцов, был использован гибридный метод мутагенеза с помощью УФ-облучения и N – нитрозометилмочевины. В результате проведенных исследований получен мутантный штамм *A. niger* CA24–УФ–5–0,005–1, превышающий кислотообразующую способность родительского штамма в 3 раза (22 г/л) при ферментации сахаросодержащей среды через 168 ч культивирования. Штамм является перспективным для разработки технологии производства лимонной кислоты.

Ключевые слова: *A. niger*, мутагенез, лимонная кислота.

STUDY ACID-FORMING ACTIVITY OF *A.NIGER* STRAINS OBTAINED DURING MUTAGENESIS

S. Saduakhassova, G. Ospankulova, D. Shaymenova, Y. Ermekov, L. Murat

To attain hyperproduction of citric acid, strains of microscopic fungi *Aspergillus niger* were subjected to mutagenesis using both N-Nitroso-N-methylurea and UV-irradiation. As a result, strain *A. niger* CA24-УФ-5-0,005-1, with 3 times the potential to produce citric acid after 168 hours of cultivation in sugar containing medium compared to the parental strain was obtained. Strain is perspective for use in developing technologies of citric acid production.

Keywords: *A. niger*, mutagenesis, citric acid.

МУТАГЕНЕЗ НӘТИЖЕСІНДЕ АЛЫНҒАН *A. NIGER* ЛИМОН ҚЫШҚЫЛЫНЫҢ ПРОДУЦЕНТІНІҢ ҚЫШҚЫЛ ТҮЗУ АКТИВТІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

С.А. Сәдуақасова, Ғ.Х. Оспанқұлова, Б.С. Шайменова, Е.Е. Ермеков, Л.А. Мұрат
Қазақ агротехникалық университеті С. Сейфуллин атындағы, Нұр-Сұлтан, Қазақстан

Әр түрлі биосынамалардан шығарып алынған аспергилл штамдарымен лимон қышқылын гиперпродуцирлеу мақсатында УК сәулелендіру мен N – нитрозометилмочевинаны қолданумен гибриді мутагенез өткізілді. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде, құрамында қант бар ортаны 168 сағат ішінде өсіру кезінде, қышқыл түзу қабілеті аналық штаммнан 3 есе (22 г/л) асатын *A. Niger* CA24-УФ-5-0,005-1 мутантты штамм алынды. Штамм лимон қышқылын алу технологиясын әзірлеуде перспективті

Кілт сөздер: *A. niger*, мутагенез, лимон қышқылы.

Введение

Большие объемы лимонной кислоты (ЛК) используются в производстве продуктов питания (до 70 %), в фармацевтической, косметической, электронной, радиотехнической, металлургической и других отраслях промышленности. В целом, рынку лимонной кислоты многие годы были характерны стабильные уровни роста в 3,5-4,0 %, и это продолжится в будущем.

Сегодня практически всю лимонную кислоту получают биотехнологическим способом, используя в качестве сырья отходы сахарного производства, крахмалы (картофельный, кукурузный, пшеничный, рисовый и др.) и их гидролизаты, продукты переработки нефти [1], и Казахстан обладает богатым потенциалом сырья.

Самым широко распространенным продуцентом лимонной кислоты является микромицет *A. niger*, физиология и механизм биосинтеза лимонной кислоты которого наиболее изучены [2]. *A. niger* прост в обращении, может ферментировать широкий ассортимент недорогого сырья, обеспечивает высокую урожайность.

Наиболее распространенным методом улучшения штаммов, продуцирующих лимонную кислоту, является индукция мутаций в родительских штаммах с использованием мутагенов. Среди физических мутагенов часто используют гамма-излучение [3] и УФ-облучение (УФО) [4]. УФ-облучение вызывает димеризацию пиримидинов и является мутагеном широкого спектра действия. Эффективность УФ-облучения довольно высока, однако высокая частота мутаций достигается за счет низкой выживаемости клеток. Чтобы получить штаммы с гиперпродуцирующими свойствами, часто УФ-воздействие сочетают с некоторыми химическими мутагенами, например, азиридином, N-нитрозо-N-метилмочевиной (НММ) или этилметансульфонатом [5].

В данной статье приводятся результаты исследования по улучшению свойств штаммов аспергилл методом гибридного мутагенеза УФО и НММ.

Цель

Получить штамм с высокой производительностью лимонной кислоты.

Материалы и методы

В результате скрининга диких штаммов аспергилл по кислотообразующей активности, штамм *A. niger* CA24 был взят для наших настоящих исследований.

Мутагенез

В качестве химического мутагена для повышения синтеза лимонной кислоты была использована НММ (Sigma, США) в концентрации 0,005%. Конидии собирали от 5-дневных культур и суспендировали в нормальном физиологическом растворе. Твин 80 (0,2%) использовали

для разрыва конидиальных цепей, и конидиальную суспензию тщательно встряхивали, фильтровали, чтобы удалить остатки мицелия, и центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 мин. Супернатант удаляли и полученные таким образом конидиальные осадки суспендировали в реакционной смеси, содержащая НММ. После инкубации в мутагенном растворе при 30°C в течение 30 минут образцы центрифугировали и дважды промывали физиологическим раствором перед посевом. Ту же самую процедуру применяли и для контролей, за исключением добавления мутагена [6].

Генератором УФ-излучения служила лампа бактерицидная ультрафиолетовая, ртутная, разрядная, высокого давления, предназначенная для работы в установках, применяемых в медицине, биологии, сельском хозяйстве. Чашки Петри с 7-суточными культурами аспергилл с открытыми крышками располагались от источника излучения на расстоянии 30 см. УФ-облучение продолжалось в течение 2 часов.

Скрининг культур – продуцентов лимонной кислоты

Споры обработанных штаммов высевались из серийных десятикратных разведений на чашки Петри, содержащие агаризованную среду Чапека–Докса с добавлением кислотно-основного индикатора ализариновый красный и инкубировались в течение 5 суток при 30°C [7]. Через 5 суток измерялся диаметр желтой зоны.

Количественное определение лимонной кислоты осуществляли путем измерения объема титруемой кислотности с использованием 1% фенолфталеина в качестве индикатора [8]. Ферментационную среду с добавлением сахарозы следующего состава (% мас. / об.) – 3,0; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,05; NaNO_3 , - 0,3 при начальном значении pH 6,5, инокулировали 0,5 мл. суспензии спор из выбранных изолятов отдельно с концентрацией (5×10^7 КОЕ / мл). Затем колбы Эрленмейера с культурами инкубировали на лотковой качалке (150 об/мин) при 30°C в течение 7 дней. pH среды регистрировали ежедневно, используя pH-метр из стеклянного электрода, общую кислотность определяли титрованием.

Для этого образец, содержащий 2 мл. культуральной жидкости и 200 мл дистиллированной воды, титровали 0,1 N раствором NaOH [9].

Содержание лимонной кислоты в 1 мл культуральной жидкости рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{0,007a}{b},$$

где: а – число мл 0,1 н раствора NaOH, пошедшего на титрование;

б – число мл культуральной жидкости, взятой на титрование;

0,007 – количество грамм лимонной кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора NaOH;

Все эксперименты проводились в трех повторностях, данные были рассчитаны как среднее стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

В ходе предыдущих исследований установлено, что из 23 выделенных нами изолятов аспергилл, *A. niger* CA24 производил наибольшее количество кислоты (7,0 г/л) через 168 ч. культивирования на сахаросодержащей ферментационной среде.

Наряду с исследованиями по усилению природной активности микроорганизма-продуцента большое внимание уделяется селекционной работе по повышению продуктивности штамма. В настоящее время показано, что перспективен метод получения активных продуцентов лимонной кислоты с применением метода мутагенеза. Высокий выход лимонной кислоты наблюдается при мутагенезе УФ-излучением. Получение мутантных клеток исследуемого микромицета *A. niger* CA24 после воздействия УФО проводилась следующим образом. Свежие 5-7 суточные культуры, инкубированные на чашках Петри с агаризованной питательной средой, облучались УФО в течение 2 ч. Обработанные культуры высевались и инкубировались в течение 5 суток. В дальнейшую работу отбирали меньшие по величине колонии, предполагая, что колонии, с измененными морфологическими признаками, обладают положительными свойствами.

В результате исследований, нами получено 189 мутантных штаммов *A. niger* CA24. Отобранные мутантные культуры подвергались скринингу на основе их кислотообразующей

активности методом лунок на специальной дифференцирующей среде. По данным наших исследований качественным методом 16 мутантных культур обладали высокой активностью (диаметр зоны желтого цвета вокруг колонии составил более 15 мм.).

У 16 отобранных мутантных штаммов определяли количественное содержание кислоты (рисунок). В процессе жизнедеятельности аспергилл основная масса сахара превращается в лимонную кислоту, в связи с чем, определение содержания лимонной кислоты в культуральной жидкости можно, используя метод определения общей титруемой кислотности. Все полученные мутантные штаммы показали более высокую продуктивность лимонной кислоты, чем у родительского штамма. Максимальный выход продукта составил 15,1 г/л культуральной суспензии у штамма *A. niger* CA24-5, показатель родительского штамма – 7 г/л.

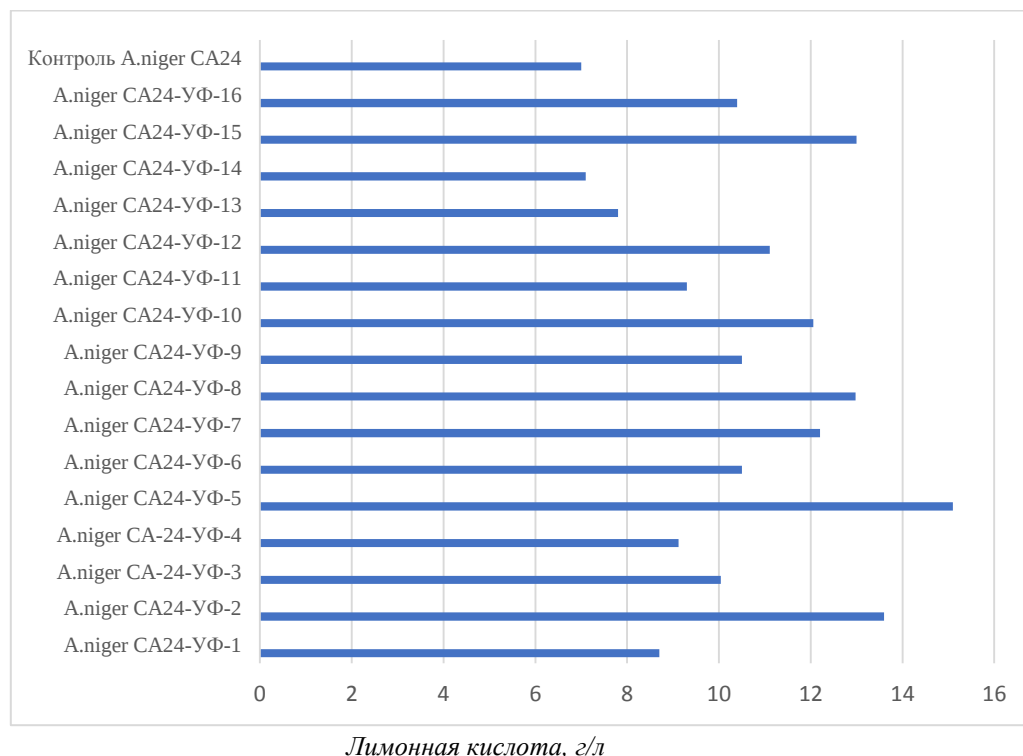


Рисунок - Количественные показатели выхода лимонной кислоты у мутантов после УФ-облучения штамма *A. niger* CA24

Для более интенсивного производства кислоты исследователями применяется поэтапное воздействие различными мутагенами, в том числе химическими. В связи с чем, на 2 ступени мутагенеза штамм *A. niger* CA24-УФ-5 был обработан химическим мутагеном НММ в концентрации 0,005%.

После обработки 0,005% НММ на основе качественного и количественного анализа было отобрано 5 штаммов с активностью выше $15,10 \pm 0,8$ (таблица).

Таблица - Штаммы-мутанты с высокими значениями синтеза лимонной кислоты после химического мутагенеза штамма *A. niger* CA24-УФ-5 с концентрацией 0,005%

№	Штаммы-мутанты	Содержание лимонной кислоты, г/л
1	<i>A. niger</i> CA24-УФ-5-0,005-1	$22,00 \pm 0,7$
2	<i>A. niger</i> CA24-УФ-5-0,005-2	$20,05 \pm 0,7$
3	<i>A. niger</i> CA24-УФ-5-0,005-3	$15,98 \pm 1,8$
4	<i>A. niger</i> CA24-УФ-5-0,005-4	$19,17 \pm 0,3$
5	<i>A. niger</i> CA24-УФ-5-0,005-5	$15,28 \pm 1,2$
6	Контроль <i>A. niger</i> CA24-УФ-5	$15,10 \pm 0,8$

На каждом этапе мутагенеза нами определялся процент выживших клеток - отношение количества колоний, выросших после обработки мутагенным агентом к количеству выросших в контроле.

В литературе имеются данные, что при выживаемости 50% - 0,3% клетки несут мутации [10]. Результаты наших исследований показали, что выживаемость аспрегилл при обработке 0,005% НММ была более низкой в сравнение с выживаемостью после воздействия УФО и составила 31%.

Заключение

В результате проведенных экспериментов получен мутантный штамм *A. niger* CA24-УФ-5-0,005-1 методом гибридного мутагенеза с использованием УФ-облучения и N - нитрозометилмочевины. Мутантный штамм-продуцент превышает кислотообразующую активность родительского штамма в 3 раза (22 г/л).

Список литературы

1. Khosravi D.K., Zoghi A., Alavi S.A., Fatemi S.S.A. // *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. – 2008. - V. 27. - P. 91-104.
 2. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses/Ikram-ul H., Ali S., Qadeer M., Iqbal J. // *Bioresour Technol.* - 2004. - V. 93. – P. 125-130.
 3. Bonatelli J.R., Azevedo J.L. Improved reproducibility of citric acid production in *Aspergillus niger* // *Biotechnol. Lett.* - 1983. - Vol.4. - P. 761-766.
 4. Selection of a hyperproducing strain of *Aspergillus niger* for biosynthesis of citric acid on unusual carbon substrates/Pelechova J., Petrova L., Ujcova E., Martinkova L. // *Folia Microbiol.* - 1990. - Vol. 35. - P. 138-142.
 5. Effect of changed cultivation conditions the morphology of *Aspergillus niger* and citric acid biosynthesis in laboratory cultivation/Musilkova M., Ujcova E., Seichert L., Fencel Z. // *Folia Microbiol.* - 1983. - Vol. 27. - P. 382-332.
 6. Chattoo, B.B., Sinha U. Mutagenic activity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) and N-methyl-N-nitrosourea (NMU) in *Aspergillus nidulans* // *Mutation Res.* - 1974. - V. 23. – P. 41-49.
 7. Ali S. Studies on the submerged fermentation of citric acid by *Aspergillus niger* in a stirred fermentor, Ph.D. Thesis. - University of Punjab, Lahore, Pakistan, 2004. – P. 114-115.
 8. Ikram-ul H., Ali S., Qadeer M., Iqbal J. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses // *Bioresour Technol.* - 2004. - V. 93. – P. 125-130.
 9. Муратова Е.И., Зюзина О.В., Шуняева О.Б. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов: Учебное пособие. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2007. – 80 с.
 10. Лунина Ю.Н. Биосинтез лимонной кислоты мутантными штаммами дрожжей *Yarrowia lipolytica* из возобновляемого растительного сырья: Дис. ... – Путино, 2015. – 128 с.
- Автор для корреспонденции:** Садуахасова С.А. – в.н.с., Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина; эл. почта: saule_aru@list.ru, 8 705 244 90 85

МРНТИ 34.27.15+34.27.51

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ РЫБ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА В ОТНОШЕНИИ *LACTOCOCCUS GARVIEAE*

З.С. Сармурзина, Ж.Б. Текебаева, Г.Н. Бисенова, М.С. Уразова, А.Д. Досова

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

Изучено действие пробиотического препарата на микробиоту кишечника сеголеток карпа в лабораторных условиях. Введение пробиотика даже после заражения болезнетворным агентом оказало положительное влияние на микрофлору кишечника, выражающееся в значительном снижении количества обнаруженных групп бактерий, а также выживаемости рыб до 90%. Выявлено, что для целесообразного применения пробиотиков необходимы микробиологические исследования с целью выявления целевых патогенов.

Ключевые слова: микрофлора рыб пробиотик, микробиот кишечника *Lactococcus garvieae*

STUDYING FISH MICROBIOTAS USING A PROBIOTIC DRUG AGAINST *LACTOCOCCUS GARVIEAE*

Z. Sarmurzina, Zh. Tekebaeva, G. Bissenova, M. Urazova, A. Dosova

RSE "Republican collection of microorganisms" SC MES RK, Nur-Sultan city, Kazakhstan

The effect of a probiotic preparation on the intestinal microbiota of carp yearlings was studied under laboratory conditions. The introduction of a probiotic even after infection with a pathogenic agent had a positive effect on intestinal microflora, which manifests itself in a significant decrease in the number of detected bacterial groups, as well as fish survival, up to 90%. It was revealed that for the appropriate use of probiotics, microbiological studies are necessary to identify target pathogens.

Key words: fish microflora probiotic, intestinal microbiota *Lactococcus garvieae*

ПРОБИОТИКАЛЫҚ ПРЕПАРАТҚА ҚАТЫСТЫ *LACTOCOCCUS GARVIEAE* БОЙЫНША БАЛЫҚ МИКРОБИОТАСЫН ЗЕРТТЕУ

З.С. Сармурзина, Ж.Б. Текебаева, Г.Н. Бисенова, М.С. Уразова, А.Д. Досова

МРК «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» ҚР БҒМ ҒК коллекциясы»,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан

Лабораториялық жағдайда пробиотикалық препараттың жас тұқының ішек микробиоталарына әсері зерттелді. Ауру тудырушы агентпен залалдағаннан кейін де пробиотикті енгізу ішек микрофлорасына оң әсерін тигізді, бұл бактериялардың анықталған топтарының санының едәуір төмендеуімен, сондай-ақ балықтардың 90% дейін тіршілік ету деңгейімен анықталды. Пробиотиктерді мақсатты пайдалану үшін мақсатты қоздырғыштарды анықтау үшін микробиологиялық зерттеулер қажет екендігі анықталды.

Түйінді сөздер: балық микрофлорасы пробиотикалық, ішек микробиотасы *Lactococcus garvieae*.

Введение

Водные объекты постоянно находятся в окружении микроорганизмов, которые способны проникать в них, ассоциироваться или находиться некоторое время в тканях и органах, не принося вреда. Они постоянно присутствуют в желудочно-кишечном тракте, откуда при определенных условиях могут быстро проникать во внутренние ткани и органы, активно размножаться. Постоянное присутствие в водной среде патогенной и условно-патогенной микрофлоры представляют скрытый очаг бактериальных инфекций, который способен быстро реализовываться в виде вспышек массовых заболеваний среди как культивируемых объектов, так и аборигенных представителей природных водоемов. Вспышки бактериальных заболеваний нередко приводят к смертности культивируемых рыб и беспозвоночных, трудно поддаются локализации при проведении лечебно-профилактических мероприятий, поэтому являются наиболее экономически значимым препятствием для развития аквакультуры [1].

Инфекционные болезни у рыб могут проявляться в виде простой, смешанной и вторичной или секундарной, инфекции. Простая инфекция вызывается одним возбудителем, а смешанная возникает при одновременном заболевании рыб двумя или несколькими болезнями. Например, у карпов в прудах иногда наблюдается одновременно развитие двух заболеваний – бранхиомикоза (грибковое) и краснухи. Вторичная, или секундарная, инфекция у рыб возникает при наличии основной болезни и вызывается микробами, обычными обитателями кожи и слизистых оболочек пищеварительного тракта. Основная инфекция ослабляет организм, что способствует проявлению вирулентности возбудителями вторичной инфекции. Например, при заболевании рыб краснухой нередко развивается сильнейший дерматомикоз, являющийся вторичной инфекцией. В странах ЕС с 2003 г. существует обязательная система мониторинга по зоонозам, пищевым токсикоинфекциям и антимикробной устойчивости их возбудителей. В 2011 г. в этой работе принимали участие 26 стран ЕС [2].

Для снижения потерь при воспроизводстве водных объектов практически повсеместно проводятся профилактические или лечебные мероприятия с использованием антибиотиков, которые добавляют чаще в корм [1].

Широкое применение антибиотиков и химиопрепаратов для профилактики и борьбы с бактериальными болезнями в рыбоводных хозяйствах привело к возникновению таких проблем, как лекарственная сопротивляемость, накопление антибиотиков и химиопрепаратов в тканях и иммуносупрессия. Если антибиотики используются в самых низких возможных дозах, по экономическим причинам или с целью избежать побочных эффектов и снизить воздействие на окружающую среду, сопротивление патогенов к действию антибиотиков увеличивается. В

последние годы использование некоторых антибиотиков было запрещено в ряде стран вследствие серьезной экологической опасности, а также некоторого канцерогенного эффекта, вызываемого ими у многих костистых рыб. Антибиотики могут вызвать угнетение полезной микрофлоры, которая обычно присутствует в пищеварительном тракте рыб. Кроме того, вакцины не могут быть использованы как универсальная мера для борьбы с болезнями в области аквакультуры вследствие того, что их количество в ряде стран ограничено и их защитное действие проявляется лишь при определенных бактериальных и вирусных заболеваниях.

В связи с этим в настоящее время в качестве средства для поддержания и восстановления нормального физиологического состояния животных широко используют различные пробиотические препараты, значительно возрастает интерес ученых и практиков к использованию микроорганизмов в сельскохозяйственном производстве. Пробиотики в качестве профилактического средства все шире используются в аквакультуре. Пробиотические препараты стимулируют рост привилегированных микроорганизмов и укрепляют естественные защитные механизмы организма. Механизм действия пробиотиков, в отличие от такового антибиотиков, направлен не на уничтожение части популяций кишечных микроорганизмов, а на заселение кишечника конкурентоспособными штаммами бактерий-пробионтов, которые осуществляют неспецифический контроль над численностью условно-патогенной микрофлоры путем ее вытеснения из состава кишечного микробиоценоза [3].

На базе РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК создан пробиотический биопрепарат на основе трех штаммов молочнокислых бактерий. Данный биопрепарат является альтернативой антибиотикам и активен в отношении условно-патогенных микроорганизмов рода *Pseudomonas* и *Aeromonas* [4]. Так как среди бактериальных болезней рыб наибольший удельный вес имеют аэромоноз (краснуха), и псевдомонозы карповых, фурункулез и вибриоз лососевых, миксобактериозы лососевых и осетровых рыб [5].

Цель

Изучить состав микрофлоры кишечника при использовании пробиотического препарата путем кормления сеголеток карпа в отношении такого рыбного патогена как *Lactococcus garvieae*.

Материалы и методы

Микробиота, находящаяся в организме, особенно в желудочно-кишечном тракте, часто рассматривается как эквивалент целостного органа. Однако в настоящее время невозможно охарактеризовать более 70% микробиоты ЖКТ. Это в основном связано с невозможностью культивирования микробов и использованием рутинных лабораторных методов [6]. Исследование было одобрено Локальной этической комиссией РГП «Национальный Центр Биотехнологии» КН МОН РК № 5 от 8 сентября 2017 года.

Поэтому при проведении модельного эксперимента по изучению влияния действия созданного биопрепарата против еще одного известного патогена рыб *Lactococcus garvieae* 10A B-RKM 0639 было принято решение изучить параллельно влияние биопрепарата на микрофлору кишечника сеголеток карпа *Cyprinus carpio* (1-го года жизни). Сеголетки при введении в исследование имели следующие биометрические показатели: вес $7,7 \pm 0,49$ г., длину тела $8,6 \pm 0,26$ см., ширину груди $2,2 \pm 0,10$ см. Сеголетки карпа были предоставлены ТОО «Рыбопитомник Майбалык» (г. Нур-Султан).

В эксперименте были задействованы 4 варианта: 1-й (опытный) - кормление биопрепаратом до и после заражения *L. garvieae*, 2-й (опытный) - кормление коммерческим кормом до и после заражения *L. garvieae*, лечение гентамицином (100 мг. гентамицина), 3-й (контрольный) - кормление коммерческим кормом и 4-й (контрольный) - кормление биопрепаратом без заражения. Использовали аквариумы объемом 20 литров по 10 особей в каждом. Продолжительность эксперимента составила 21 день.

Для изучения состава микрофлоры кишечника рыб использовали селективные и хромогенные пластины с готовыми средами Compact Dry (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd.,

Япония), предназначенные для определения и подсчета основных физиологических групп микроорганизмов: ТС (для выявления общего числа жизнеспособных бактерий, ОМЧ); ЕС/ЕСО (для выявления кишечной палочки и колиформа); YM/YMR (для выявления дрожжей и грибов); X-SA (для выявления золотистого стафилококка); X-BC (для выявления восковой бациллы); ETC (для выявления энтерококка); ETB (для выявления энтеробактерий); CF (для выявления колиформ); SL (для выявления сальмонелл); AQ (для выявления гетеротрофов). Для этого методом предельных разведений был сделан высеив из тонкого и толстого кишечника сеголеток карпа в начале и в конце эксперимента по вариантам. Из соответствующего разведения образец объемом 1 мл наносили диффузионно на поверхность готовых пластин Compact Dry. Образцы подписывали и инкубировали согласно инструкции изготовителя в диапазоне от 28°C до 43°C в течение 1-3 суток для каждого вида микроорганизма при аэробных условиях. Как известно, более 95% микрофлоры кишечника составляют аэробные микроорганизмы. Результаты интерпретировали с помощью приложения BactLab (для таких групп как ТС, ЕС/ЕСО, YM/YMR).

Результаты и обсуждение

Многие коммерческие пробиотики не обеспечивают эффективные или стабильные результаты, что может быть связано с неправильным выбором или применением пробиотиков. Большинство пробиотических штаммов выделены из объектов окружающей среды, а не из пищеварительного тракта рыб, в связи с чем они не способны колонизировать в кишечнике рыб или способны к колонизации в течение короткого времени [6].

Используемый нами биопрепарат пробиотического действия создан на основе консорциума молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 24c, *Pediococcus pentosaceus* 10/9к и *Lactobacillus paracasei* 9с, выделенных из кишечника взрослой особи карпа *Cyprinus carpio*. Данные штаммы обладают высокой антагонистической активностью по отношению к таким условно-патогенным бактериям как *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Escherichia*.

Опытная партия биопрепарата была наработана на лабораторном ферментере марки (Labfors 5, Швейцария) с использованием питательной среды MRS собственной модификации.

Выявление и определение основных физиологических групп микроорганизмов, представленных линией чашек CompactDry проводили до и по окончании эксперимента. Результаты представлены в таблице.

Таблица - Микробиологический анализ кишечника сеголеток карпа до и после введения биопрепарата.

№	Группа микроорганизмов	Исходные результаты, КОЕ/мл	Конечные результаты, КОЕ/мл			
			1 вариант	2 вариант	3 вариант	4 вариант
1	ТС	115x10 ⁵	1 x 10 ⁵	32 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	10 x 10 ⁵
2	CF	23 x 10 ⁵	0	150 x 10 ⁵	1 x 10 ⁵	9 x 10 ³
3	ЕС/ЕСО	36 x 10 ⁵	0	23 x 10 ³	11 x 10 ³	16 x 10 ³
4	YM	1 x 10 ³	0	0	0	0
5	ETB	5 x 10 ⁵	16 x 10 ³	32 x 10 ⁵	6 x 10 ³	3 x 10 ⁵
6	X-SA	0	0	0	0	0
7	SL	0	0	0	0	0
8	ETC	0	0	2 x 10 ⁵	0	0
9	X-BC	0	0	0	0	0
10	AQ	28 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵	<150 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	23 x 10 ⁵

В результате проведенных исследований выявлено, что микрофлора кишечника сеголеток карпа до начала эксперимента была представлена колиформными бактериями, энтеробактериями, бактериями из группы кишечной палочки, энтерококками, гетеротрофами, грибами и общим микробным числом. Такие группы микроорганизмов как *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*,

Salmonella enteridis обнаружены не были ни до, ни по окончании эксперимента. По полученным данным обнаружено, что введение пробиотика (вариант 1) даже после заражения болезнетворным агентом оказало положительное влияние на микрофлору кишечника, выражающееся в значительном снижении количества энтеробактерий на 2 порядка, а также выживаемости рыб до 90%. Во 2-ом варианте, где вводился коммерческий корм до и после заражения *L.garvieae* при лечении гентамицином наблюдалось снижение бактерий группы кишечной палочки на 2 порядка, тогда как количество колиформных бактерий, энтеробактерий, энтерококков и гетеротрофных микроорганизмов несколько увеличилось. По всей видимости, это связано с тем, что в данном варианте на 21-й день эксперимента наблюдалась полная гибель оставшихся 5 особей и высеив был произведен из кишечника погибшей рыбки. В 3-ем контрольном варианте (кормление коммерческим кормом) выявлено значительное снижение энтеробактерий и кишечной палочки на 2 порядка. Выживаемость составила 80%. В 4-ом контрольном варианте (кормление пробиотическим препаратом без заражения) наблюдалось снижение колиформ и кишечной палочки на 2 порядка. Выживаемость в данном варианте составила 90%. Следует отметить, что грибы по окончании эксперимента не были обнаружены ни в одном из вариантов. Биометрические показатели за период проведения эксперимента увеличились незначительно (рисунок 1).

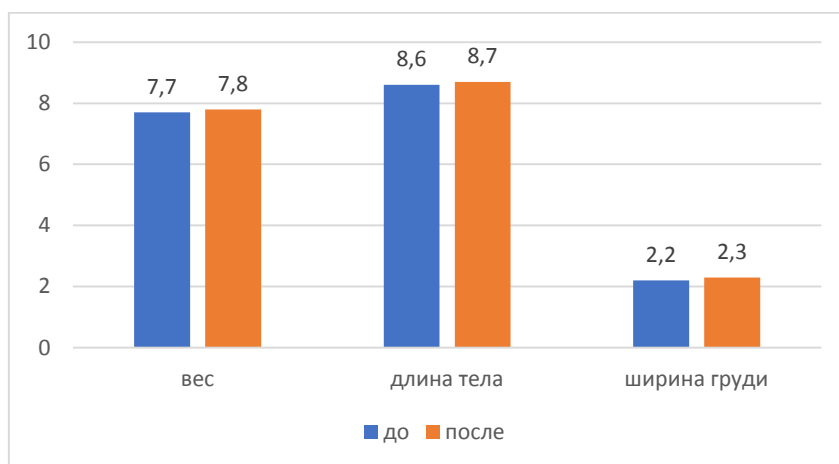


Рисунок 1 – Средние биометрические показатели сеголеток карпа до и по окончании эксперимента.

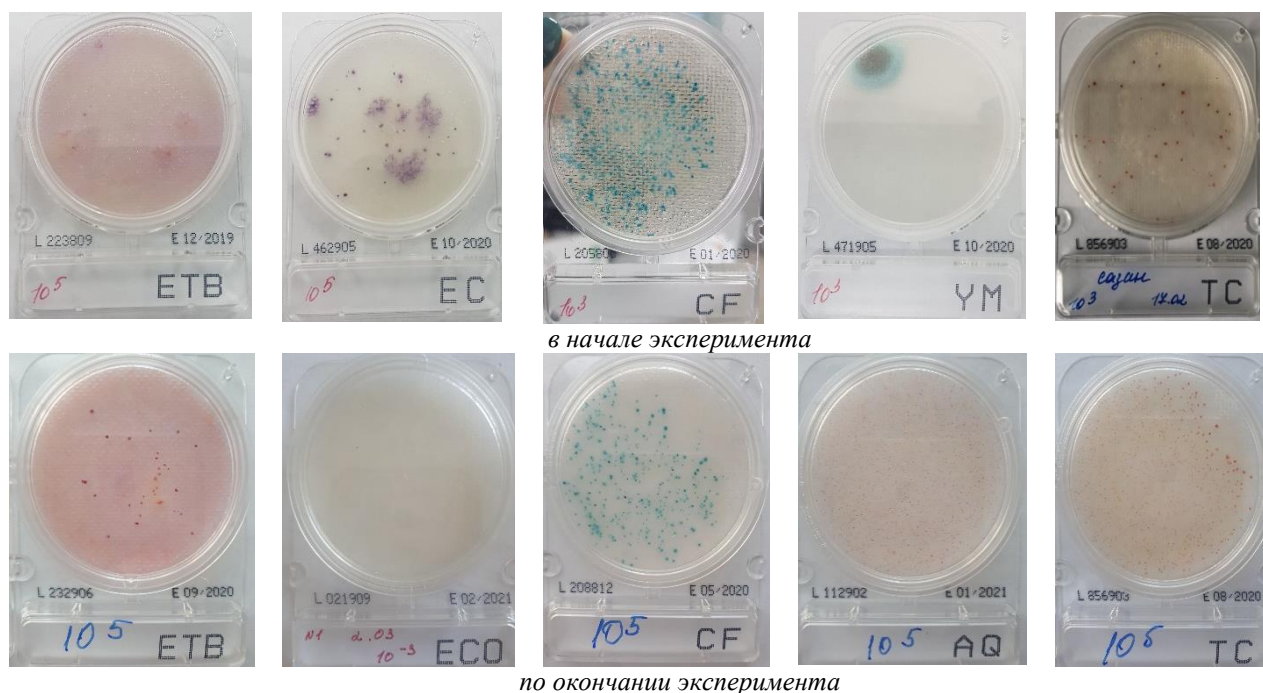


Рисунок 2 – Фотографии результатов микробиологического анализа кишечника рыб.

Установлено, что плотность микробной популяции содержимого кишечника рыб зависит от плотности микробной популяции в воде. Найдена прямая зависимость между интенсивностью питания и общим количеством бактерий в кишечнике [7].

Отмечается, что при недостатке в желудочно-кишечном тракте тех или иных нутриентов, состав микробиоты может изменяться вследствие конкуренции за питательные вещества [8].

Заключение

Таким образом, резюмируя полученные данные доказано положительное влияние пробиотического препарата на микрофлору кишечника рыб, оказывающее терапевтическое действие как альтернатива применяемым антибиотикам, а также на такие условно-патогенные микроорганизмы как *Pseudomonas*, *Aeromonas* и *L.garvieae*. Использование пробиотика на несколько порядков снижает количество колиформных бактерий, бактерий из группы кишечной палочки и энтеробактерий.

Успешное применение пробиотиков будет целесообразным при проведении микробиологических исследований, скрининга высокоантагонистичных пробиотических штаммов и их использовании против целевых патогенов в рыбном хозяйстве.

Список литературы

1. Антибиотики в объектах аквакультуры и их экологическая значимость. Обзор/Шульгина Л.В., Якуш Е.В., Шульгин Ю.П. и др. // Известия ТИНРО. – 2015. – Т. 181. – С. 216-230.
2. Ларцева Л.В., Обухова О.В., Бармин А.Н. Экологическая и биологическая опасность резистентности условно-патогенной микрофлоры к антибиотикам (обзор) // Экологическая безопасность. – 2015. - № 4. – С.47-52.
3. Аламдари Х., Пономарев С.В. Использование пробиотических препаратов при кормлении осетровых рыб: результаты испытания при температуре воды ниже оптимальной // Вестник АГТУ. Серия Рыбное хозяйство. – 2013. - № 3. – С. 133-140.
4. Изучение эффективности пробиотика на модели бактериальной болезни мальков в лабораторных условиях/Бисенова Г.Н., Текебаева Ж.Б., Уразова М.С. и др.// Вестник АГТУ. Сер. Рыбное хозяйство. – 2019. - № 2. – С. 14-21. <https://doi.org/10.24143/2073-5529-2019-2-14-21>.
5. Гончарова М.Н., Грищенко Л.И. Экспериментальное обоснование применения препарата «Антибак» для борьбы с бактериальными болезнями рыб // РВЖ СХЖ. Специальный выпуск. -2009. - № 3. – С. 42-43.
6. Gastrointestinal Metagenomics of Fish: Methods, Research Advances and Applications/ BoDong, DengDeng, YunhaiYi et al.// International journal of agriculture & biology. – 2018. - Vol. 20, № 10. - P. 2277–2286.
7. Syvokiene J., Stasitinaite P., Mickeniene L. The impact of municipal wastewater and heavy metal mixture on larvae of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // Acta Zoologica Lituanica. - 2003. - V. 13, № 3. - P. 372-378.
8. Lactic acid bacteria in fish: a review/ Ringo E., Gatesoupe F.J. et al. // Aquaculture. - 1998. - V. 160. - P. 177-203.

Автор для корреспонденции: Сармурзина З.С. - к.б.н., РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК; эл. почта: sarmurzina@list.ru, 8 (7172) 20 10 32