

5. Bergijk EC. Differential expression of collagen IV isoforms in experimental glomerulosclerosis/ I.E. van Alderwegen, H.J. Baelde, E. de Heer, K. Funabiki, H. Miyai et al.// J Pathol.- 1998.-№184.-p.307-315
6. Chan RW-Y. Urinary mononuclear cell and disease activity of systemic lupus erythematosus/ FM.-M. Lai, EK.-M. Li, L.-S. Tam, K.-Y. Chung, K.-M. Chow, PK.-T. Li, C.-C. Szeto// Lupus.-2006.-№15.-p. 262-267.
7. Daugas E. Antiphospholipid syndrome nephropathy in systemic lupus erythematosus/ D. Nochy, DL. Huong, P. Duhaut, et al.// JAm-SocNephrol.-2002.-№13.-p.42-52.
8. Levey A.S. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group/ J.P. Bosch, J.B. Lewis, T. Greene, et al.// Ann Intern Med.-1999.-№130.-p. 461-470
9. Petri M. Systemic lupus international collaborating clinics renal activity/response exercise/ N. Kasitanon, S.S. Lee et al.// Arthr. Rheum.- 2008.- №58(6).-p. 1784-8.

УДК 616.98:579.842.14:579.252.55:615.281./33.015.8]-07:578.52

© Р.Г. Назмутдинова, Р.Т. Мурзабаева, А.Р. Мавзютов, 2011

Р.Г. Назмутдинова¹, Р.Т. Мурзабаева¹, А.Р. Мавзютов^{1,2}
**ВЗАИМОСВЯЗЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПАТОГЕННОСТИ
 S. ENTERITIDIS С АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ КУЛЬТУР**

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздравоохранения России, г. Уфа

²ООО Исследовательский центр «Лаборатория», г. Уфа

Обследовано 105 больных сальмонеллёзом. Выделенные культуры *S. enteritidis* исследованы методом ПЦР на наличие фрагментов генов, ассоциированных с «островами» патогенности *E.coli*: *hlyA*, *hlyB* (гемолизины), *sfaG* и *sfaA* (фимбриальные антигены типа S).

Фрагменты генов «островов» патогенности *E.coli* обнаружены у 102 из 105 исследованных штаммов *S. enteritidis* (97,1%). Всего выявлено 190 генетических детерминант: *hlyA*-50 (49,0%), *hlyB*-54 (52,9%), *sfaG*-57 (55,9%) и *sfaA*- в 29 (28,4%). При этом у 40 (39,2%) штаммов выявлено по одному гену: *hlyA* – 7, *hlyB* – 13, *sfaG* – 18, *sfaA* – 2, у следующих 40 (39,2%) - комбинации из двух генетических детерминант, у 18 (17,6%) сальмонелл – сочетания из трёх. 4 штамма (3,9%) возбудителя одновременно несли фрагменты *hlyA*, *hlyB*, *sfaA* и *sfaG*. Установлена корреляционная связь между наличием у *S. enteritidis* фрагментов генов «островов» патогенности, ассоциируемых с патогенностью *E.coli* и резистентностью к ампициллину, доксициклину, цефазолину, левомицетину, карбенициллину. Установлена зависимость тяжести болезни от фактора полирезистентности микроба.

Ключевые слова: «острова» патогенности, сальмонеллез, взрослые, антибиотикорезистентность, клинические проявления.

R.G. Nazmutdinova, R.T. Murzabayeva, A.R. Mavzyutov
**GENETIC MARKERS OF PATHOGENICITY SALMONELLA ENTERITIDIS
 AND ANTIBIOTIC RESISTANCE**

We examined 105 patients. The isolated *S. enteritidis* cultures were examined by means of PCR for the presence of gene fragments associated with *E.coli* pathogenicity «islands»: *hlyA*, *hlyB* (hemolysins), *sfaA* (type S fimbrial antigens).

The gene fragments of pathogenicity «islands» were detected in 102 out of 105 studied samples (97.1%) of *S. enteritidis* strains. A total of 190 genetic determiners were identified: *hlyA* – in 50 samples (49.0%); *hlyB* – in 54 (52.9%); *sfa* – in 57 (55.9%); *sfaA* – in 29 (28.4%). Therewith, 40 salmonella strain samples (39.2%) were found to have only one genetic determiner, in *hlyA* - 7 ; *hlyB* - 13 ; *sfaG* - 18 ; *sfaA* - 2 . The subsequent 40 samples (39.2%) were revealed to possess combinations of two bacterial determiners. In 18 salmonella samples (17.6%), there were observed combinations of 3 genetic determiners. Four salmonella samples simultaneously possessed fragments of *hlyA*, *hlyB*, *sfaA* and *sfaG*. A correlation between *E.coli* pathogenicity-associated gene fragments of pathogenicity «islands» in *S. enteritidis* samples and resistance to ampicillin, doxycycline, cefazolin, levomycetin, carbenicillin. A correlation between the severity of the disease and the polyresistance of the microbial agent was determined.

Key words: pathogenicity «islands», salmonellosis, adults, antibiotic resistance, clinical manifestations.

В настоящее время сальмонеллёзы являются одной из важных проблем инфекционной патологии в большинстве стран мира, что обусловливается способностью сальмонелл длительно сохраняться во внешней среде, полирезистентностью к антибактериальным препаратам и значительной генетической пластичностью микроорганизмов [3]. Среди генетических детерминант патогенности большое значение придаётся структурным и регуляторным генам, сгруппированным в мобильные кластеры («островки» и «острова» патогенности), способные к горизонтальному и вертикальному перемещениям и встраиванию в определённые сайты бактериальной

ДНК бактериофагов, транспозонов или плазмид [4,7], что и определяет темпы формирования лекарственной устойчивости, неуправляемый характер заболеваемости и тяжёлое течение болезни. Резистентность сальмонелл к большинству АБП контролируется преимущественно генами, расположенными на плазмидах [2, 6, 8].

Целью настоящего исследования явилось изучение характера взаимосвязей между частотой обнаружения фрагментов генов «островов» патогенности, ассоциируемых с патогенностью *E.coli* у клинических штаммов сальмонелл и антибиотикорезистентностью культур, также клиническими особенностями

сальмонеллеза у взрослых.

Материал и методы

Нами обследовано 105 больных с сальмонеллезом. Для выделения возбудителя исследовали испражнения, рвотные массы и промывные воды желудка. Выделение чистых культур осуществляли общепринятыми методами с использованием отечественных питательных сред. Антибиотикочувствительность клинических изолятов к антибиотикам и фагам оценивали дискодиффузионным методом. Выделенные культуры исследовали методом ПЦР на наличие генов, ассоциированных с «островами» патогенности *E.coli*. Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием приложений пакета версии 6,0.

Результаты и обсуждение

Среди обследованных больных были 63 (60%) женщины и 42 (40%) - мужчины, средний возраст которых составил $35,11 \pm 2,28$ и $34,9 \pm 2,85$ года соответственно ($\chi^2=2,44$ ($p=0,295$)).

Клинически сальмонеллез протекал в гастроинтестинальной форме с преобладанием гастроэнтеритического варианта в 87 (82,8%), гастроэнтероколита - в 18 (17,2%) случаях. У 62 (59%) пациентов диагностирована среднетяжелая, у 25 (23,8%) - легкая и у 18 (17,2%) - тяжелая форма заболевания.

В результате проведенных исследований было выделено 105 клинических штам-

мов *S.enteritidis*. Фрагменты ДНК, специфичные известным генам кластеров патогенности *E.coli*, обнаружены у 102 (97,1%) исследованных культур сальмонелл. В общем пуле протестированных микроорганизмов образование искомым ампликонов при исследовании праймеров к *hlyA* имело место в 50 (49,0%) случаях, *hlyB* - в 54 (52,9%), *sfaG* - в 57 (55,9%) и *sfaA* - в 29 (28,4%) случаях соответственно.

В дальнейшем была исследована чувствительность выделенных нами культур сальмонелл к 13 наиболее широко используемым антибактериальным препаратам (ампициллин, гентамицин, доксициклин, цефазолин, амикацин, ципрофлоксацин, цефотаксим, цефтриаксон, цефалексин, левомицетин, карбенициллин и интести - и сальмонеллезный бактериофаг). Установлено, что 68 (66,7%) клинических штаммов бактерий были резистентными к антибактериальным препаратам (АБП), из них 35 (51,5%) - к 1-3 препаратам, 27 (39,7%) - к 4-5, 6 (8,8%) - к 6 и более одновременно. Наиболее часто устойчивость возбудителя имела место к 5 АБП: ампициллину (52%), доксициклину (40,2%), левомицетину (34,3%), цефазолину (30,4%) и карбенициллину (28,4%), наименьшая устойчивость - к ципрофлоксацину (2,9%), цефотаксиму (2,9%), цефтриаксону (3,9%), гентамицину (6,8%), амикацину (8,8%) и бактериофагам (1,0%).

Таблица 1

Выявляемость фрагментов генов «островов» патогенности у *S. enteritidis* и полирезистентность к антибиотикам

ФГОП	Ампициллин, %	Доксициклин, %	Цефазолин, %	Левомецитин, %	Карбенициллин, %	Кол-во АБП с устойчив. микроба 50% и более
<i>hlyA+hlyB</i> (n=8)	100	62,5	87,5	87,5	37,5	4
<i>hlyA+sfaG</i> (n=11)	72,7	63,6	63,6	45,5	50	4
<i>hlyA+hlyB+sfaG</i> (n=8)	75	50	25	50	25	3
<i>hlyA+sfaA+sfaG</i> (n=6)	83	50	66,6	83	66,6	5

Таблица 2

Связь между наличием ФГОП у клинических штаммов сальмонелл и резистентностью к пяти антибактериальным препаратам

ФГОП	n	Ампициллин, %	Доксициклин, %	Цефазолин, %	Левомецитин, %	Карбенициллин, %	η^2 , %	F	p	r*
<i>HlyA</i>	7	42,8	42,8	14,2	14,2	57,1	13	1,12	0,336	0,36
<i>hlyA+hlyB</i>	8	100	62,5	87,5	87,5	37,5	27	3,18	0,024	0,52
<i>hlyA+sfaG</i>	11	72,7	63,6	63,6	45,5	50	7	0,98	0,427	0,26
<i>hlyA+hlyB+sfaG</i>	8	75	50	25	50	25	14	1,44	0,241	0,37
<i>hlyA+sfaA+sfaG</i>	6	83	50	66,6	83	66,6	7	0,5	0,736	0,26

Примечание. η^2 - сила влияния фактора; F - критерий Фишера; * - уровень значимости ($p<0,001$).

Таблица 3

Связь количества фрагментов генов «островов» патогенности с резистентностью к антибиотикам

ФГОП (n)	Отсутствие устойчивости к АБП	Ампициллин	Доксициклин	Цефазолин	Левомецитин	Карбенициллин
1 ФГОП (n = 40)	18	14	14	6	8	11
2 ФГОП (n = 40)	9	25	18	17	16	12
3-4 ФГОП (n = 22)	7	14	9	8	11	6
Итого: 102	34	53	41	31	35	29
η^2 , %	9	4	4	11	4	5
F	4,84	3,51	2,26	5,4	2,13	2,39
P	0,0099	0,03	0,109	0,006	0,124	0,099
r*	0,3	0,2	0,2	0,33	0,2	0,22

Примечание. η^2 - сила влияния фактора; F - критерий Фишера; p - уровень значимости, * - коэффициент корреляции.

У сальмонелл, у которых определилась наибольшая устойчивость к 5 АБП (ампициллину, доксициклину, цефазолину, левомицетину и карбенициллину), чаще выявлялись следующие сочетания генетической детерминанты hlyA: hlyA+hlyB, hlyA+sfaG, hlyA+hlyB+sfaG, hlyA+sfaA+sfaG. Выявляемость ФГОП и устойчивость сальмонелл к 5-и часто используемым АБП представлена в табл. 1.

Для выявления взаимосвязи между резистентностью микробов к 5-и, наиболее часто используемым АБП, и фрагментами генов «островов» патогенности был проведен статистический анализ (табл. 2).

В результате было установлено, что наличие генетических детерминант hlyA+hlyB оказывает сильное и статистически значимое влияние на резистентность к вышеперечисленным АБП: $\eta^2 = 27\%$ ($F=3,18$; $p=0,0249$), и между изучаемыми признаками выявлена прямая корреляционная связь средней силы - $r^*=0,52$. Несколько меньше средней силы, но статистически незначимым оказалось влияние факторов: hlyA - $\eta^2 = 13\%$ ($F=1,12$; $p=0,366$) и hlyA+hlyB+sfaG - $\eta^2 = 14\%$ ($F=1,44$; $p=0,241$); $r^*=0,36$ и $r^*=0,37$ соответственно. Для двух последних сочетаний выявлена слабая корреляционная связь между анализируемыми признаками: $r^*=0,26$.

Далее нами был изучен характер влияния количества генетических детерминант на резистентность к каждому отдельно взятому антибиотику с последующим статистическим анализом (табл. 3).

Установлены статистически значимая доля влияния количества генетических детерминант (ФГОП) на резистентность к цефазолину и прямая корреляционная связь средней силы между ними: $\eta^2 = 11\%$ ($F=5,4$; $p<0,0061$; $r^*=0,33$), к ампициллину $\eta^2 = 4\%$ ($F=3,51$; $p<0,0323$; $r^*=0,2$); в то время как на устойчивость к другим антибиотикам определились их слабое влияние и слабая корреляционная связь.

При анализе связи фактора резистентности к АБП у сальмонелл и степени тяжести заболевания установлено, что антибиотикорезистентные сальмонеллы чаще выделялись от больных со среднетяжелым и тяжелым течением болезни. Так, при легкой форме болезни количество микробов, чувствительных ко всем АБП, составило 9 (37,5%), при среднетяжелом и тяжелом течении сальмонеллёза - 20 (33,3%) и 5 (27,8%) соответственно. Тогда как число резистентных бактерий возрастало по мере утяжеления заболевания от легкой до

тяжелой степени и равнялось 15 (62,5%), 40 (66,7%), 13 (72,2%) соответственно. Проведенный статистический анализ влияния фактора полирезистентности микроба на тяжесть течения сальмонеллёза выявил достоверные различия между группами сальмонелл с различной резистентностью к АБП и степенью тяжести заболевания ($\chi^2 = 7,145$; $df = 2$; $p=0,028$). Так, в группе микроорганизмов, резистентных к 1-3 АБП, сила влияния данного признака на степень тяжести сальмонеллёза была слабой, но статистически значимой - $\eta^2 = 6\%$ ($F=3,37$; $p=0,0382$), что подтверждает и коэффициент корреляции - $r^*=0,24$. В группе полирезистентных микроорганизмов выявлено сильное, статистически значимое влияние между анализируемыми признаками: $\eta^2 = 32\%$ ($F=22,8$; $p=0,001$) и фиксирована прямая корреляционная связь средней силы $r^*=0,57$.

На основании полученных данных можно предположить, что полирезистентные к АБП сальмонеллы, а именно *S. enteritidis*, более вирулентные, чем чувствительные к АБП штаммы, и вызывают более тяжелое течение заболевания, что согласуется с мнением других авторов, назвавших лекарственную резистентность сальмонелл маркером их патогенности [3, 6, 7].

Определение «островов» патогенности может использоваться для тестирования клинических штаммов бактерий и проливать свет на генетические механизмы изменения их патогенности [1]. Начиная с середины 90-х годов до 2008 года среди *S. enteritidis* появились полирезистентные штаммы, которые составили треть всех изученных культур [6, 7]. Сальмонеллёз, вызванный данными возбудителями, характеризуется достаточно тяжелым течением, частым поражением толстой кишки, вплоть до геморрагического колита [6]. В литературе мы не нашли данных о взаимосвязи резистентности к анализируемым АБП и выявленными генами «островов» патогенности у представителей семейства Enterobacteriaceae. Но имеются данные о положительной корреляционной связи между адгезивной активностью и резистентностью *Morganella morganii* к антибиотикам [5].

«Острова» патогенности выполняют различные функции: патогенность, адаптация, метаболизм, лекарственная устойчивость, секреторная функция [1, 2]. В этой связи можно предположить, что выявленные нами ФГОП имеют отношение к формированию устойчивости к ряду антибиотиков, в частности генетические детерминанты гемолизина (hly), к формированию устойчивости к ампи-

циллин, цефазолин, доксицилин, левомицетин, карбенициллин.

Известно о генетической связи факторов резистентности и патогенности [8]. Гены антибиотикорезистентности расположены на плазмидах и транспозонах [4, 5]. Прослежено, что эпидемические штаммы, как правило, обладают множественной антибиотикорезистентностью плазмидной природы [7, 9]. Такие плазмиды включают в свой репликон дополнительно к R – детерминантам гены, ответственные за синтез токсинов [7], адгезинов [7], антилизосимной активности, сериновой протеазы, инактивирующей секреторный иммуноглобулин A [2]. Наследование сложных R – плазмид реципиентными бактериями сообщает им, наряду с множественной лекарственной устойчивостью, и свойства наследуемых факторов патогенности [1, 2]. Вартересян И.И. и соавт. предлагают изучать плазмидный профиль (R – плазмиды) клинических штаммов сальмонелл, распространенных в конкретном регионе, для мониторинга антибио-

тикорезистентности с целью успешного маневрирования средствами терапии [5].

Выводы

1. Частота обнаружения генетических детерминант гемолизинов (hly A и hly B) и фимбриальных антигенов типа S (sfa G и sfa A) у клинических штаммов сальмонелл коррелирует с тяжестью течения болезни.

2. Клинические штаммы *Salmonella* spp. полирезистентны к антибактериальным препаратам (62,5%). Наибольшая устойчивость показана к ампициллину (51,6%), левомицетину (30%) и цефазолину (23%), наименьшая – к цефотаксиму (1,1%), ципрофлоксацину (2,1%) и специфическим бактериофагам (1,1%).

3. Увеличение количества генетических детерминант, обнаруживаемых у отдельного штамма, сопровождается снижением чувствительности сальмонелл к антибактериальным препаратам. Множественная устойчивость к антибактериальным препаратам согласуется с тяжестью заболевания.

Сведения об авторах статьи:

Назмутдинова Рита Галиевна – заочный аспирант кафедры инфекционных болезней с курсами дерматовенерологии и косметологии ИПО БГМУ, зав. инфекционным отделением, МБУ «Городская больница №1 ГО г. Октябрьский», раб.т. 8(34767) 5-11-33; адрес: г. Октябрьский, ул. Ст. Кувыкина, д.30. e-mail: nazmutdinovarg@mail.ru

Мурзабаева Расима Тимурьяровна – д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней с курсом дерматовенерологии ИПО БГМУ, раб. тел. 8 (347) 250-18-83, доп.2-94; адрес: г.Уфа, ул. Запотоцкого, д.37, к. 4. e-mail: rmurzaeva@yandex.ru

Мавзютов Айрат Радикович – д.м.н., профессор, декан МПФ и МБ, зав. кафедрой прикладной и фундаментальной микробиологии ГБОУ ВПО «БГМУ». ООО «Исследовательский центр «Лаборатория»; раб. тел. 2736187; Раб. адрес: г. Уфа, ул. Ленина, д.3; e-mail: ufalab@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко, В.М. «Острова» патогенности бактерий // Журн. микробиол. – 2001. - №4. – С.67 – 74.
2. Бондаренко, В.М. Роль бактериальной протеазы, деградирующей секреторный иммуноглобулин A в персистенции клебсиелл / В.М. Бондаренко, О.В. Агапова, Н.А. Виноградов // Журн. микробиол.- 2000.- №4. - С.12-16.
3. Бухарин, О.В. Персистенция патогенных бактерий. - М., 1999. – 370с.
4. Вартересян, И.И. Конъюгативные плазмиды антибиотикорезистентных штаммов сальмонелл/И.И. Вартересян, З.У. Геворкян, Н.Н. Саркисян. [и др.]. // Журн. микробиол. - 2002. - №1. – С. 78-79.
5. Гашимова, Д.Т. Характеристика адгезивных свойств бактерий рода *Morganella morganii* /Д.Т. Гашимова, З.Г. Габидуллин, А.Р. Мавзютов, А.К. Булгаков. //Актуальные вопросы инфекционной патологии: сборник научных трудов - Уфа, 1998. – С.100-101.
6. Милотина, Л.Н. Эволюция лекарственной резистентности *Salmonella enteritidis*, выделенных от детей/Л.Н. Милотина, О.В.Гурьева, С.Ш. Рожнова, М.А. Головинова // Журн. эпидем. и инфекц. болезни. – 2008. - №2. – С.44-47.
7. Рожнова, С.Ш. Л.А. Кафтырева. Значение плазмид в эволюции возбудителей и эпидемического процесса внутрибольничных сальмонелл /Журн. эпидем. и инфекц. болезни. – 2000- № 5. - С. 25-27.
8. Martinez J.L., Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity and antibiotic resistance // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol.15. - №4. – P.647-679.
9. Silva J., Gatica R., Aguilar C. et al. Outbreak of infection with extended-spectrum lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. - №9. – P.3193-3196.

УДК 616.9-053.1:612.017.4

© Л.А. Русакова, У.Р. Хамадьянов, 2011

Л.А. Русакова, У.Р. Хамадьянов

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОКИНОВ ПРИ ВНУТРИУТРОБНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ПЛОДА

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздравсоцразвития России, г. Уфа

На основе количественного измерения ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ФНО в трех биологических жидкостях, таких как сыворотки венозной и пуповинной крови, а также околоплодные воды, у женщин высокого инфекционного риска с реализацией инфекции у новорожденных без ее реализации, а также условно здоровых женщин установлена высокая диагностическая ценность про- и противовоспалительных цитокинов. Наиболее статистически значимым признаком внутриутробного инфицирования (ВУИ) у плода является концентрация ИЛ-1 β .

Ключевые слова: внутриутробное инфицирование плода, диагностика, цитокины.