

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР ЭКСТРЕННОЙ И РАДИАЦИОННОЙ
МЕДИЦИНЫ ИМ. А.М. НИКИФОРОВА» МЧС РОССИИ

На правах рукописи

КОЗЛОВ АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

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

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика
1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, доцент
Гусякова Оксана Анатольевна
доктор медицинских наук, доцент
Лямин Артем Викторович

Санкт-Петербург - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	16
1.1. Этиопатогенетические и эпидемиологические особенности муковисцидоза	16
1.2. Методы лабораторной диагностики при муковисцидозе	18
1.3. Проблемы микробиологической диагностики при муковисцидозе	21
1.4. Метаболиты патогенеза инфекционно-воспалительного процесса в легких при муковисцидозе	25
1.5. Железо и железосвязывающие белки как возможные маркеры инфекционных осложнений у пациентов с муковисцидозом	29
1.6. Возможности биохимического исследования мокроты в клинико-диагностической лаборатории	30
1.7. Роль железа в метаболизме неферментирующих грамотрицательных бактерий	34
1.8. Механизмы получения и захвата железа из окружающей среды у неферментирующих грамотрицательных бактерий и их роль в патогенезе инфекционного процесса в легких у пациентов с муковисцидозом	35
1.9. Использование железа для выделения и культивирования неферментирующих грамотрицательных бактерий из материала от пациентов с муковисцидозом	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Дизайн исследования	42
2.2. Сбор и подготовка к исследованию образцов мокроты	44
2.3. Методы проведения валидирующих мероприятий для	

биохимического исследования показателей обмена железа в мокроте	45
2.4. Сбор и подготовка к исследованию образцов сыворотки крови	46
2.5. Биохимические методы исследования сыворотки крови и мокроты	47
2.6. Микробиологическое исследование мокроты	47
2.7. Методы испытаний на повышение показателя продуктивности и селективность при разработке питательной среды для выделения <i>Burkholderia cepacia</i> complex из клинического материала	49
2.8. Методы анализа белковых профилей <i>Burkholderia cepacia</i> complex	51
2.9. Методы статистической обработки полученных результатов	51
ГЛАВА 3. ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ	53
3.1. Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из мокроты у пациентов с муковисцидозом в Самарской области	53
3.2. Видовое разнообразие неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных из нижних дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом	60
3.3. Распространенность бактерий, имеющих доказанное клиническое значение в развитии легочной патологии среди пациентов с муковисцидозом в Самарской области	63
ГЛАВА 4. ПРОВЕДЕНИЕ ВАЛИДИРУЮЩИХ МЕРОПРИЯТИЙ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА В МОКРОТЕ	69
4.1. Определение внутрииндивидуальной биологической вариации содержания железа и железосвязывающих белков в мокроте	70

4.2. Валидация правильности биохимических методик исследования показателей обмена железа в мокроте (расчет общей аналитической ошибки)	75
4.3. Определение линейности и рабочего диапазона биохимической методики исследования показателей обмена железа в мокроте	78
4.4. Определение аналитической специфичности биохимических методик при исследовании показателей обмена железа в мокроте (эксперимент на открытие)	83
4.5. Валидация прецизионности биохимических методик исследования показателей обмена железа в мокроте	85
4.6. Определение внутрисерийной невоспроизводимости метода исследования показателей обмена железа в мокроте	87
4.7. Определение критической разницы для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении изменений показателей обмена железа в мокроте	89
ГЛАВА 5. БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА В МОКРОТЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ	91
5.1. Биохимическое исследование показателей обмена железа в мокроте и сыворотке крови у пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы	91
5.2. Микробиологическое исследование мокроты у пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы	93
5.3. Оценка зависимости уровня показателей обмена железа в мокроте от выделенной микробиоты у пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы	94
5.4. Показатели обмена железа в крови и мокроте у пациентов с муковисцидозом	96
5.5. Применение расчета коэффициента PCV% для ферритина в	

динамическом наблюдении за состоянием пациентов с муковисцидозом	99
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА СЕЛЕКТИВНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> COMPLEX	107
6.1. Разработка селективной питательной среды с ростовой добавкой для выделения <i>Burkholderia cepacia</i> complex из клинического материала	107
6.2. Оценка показателей продуктивности селективной питательной среды с ростовой добавкой для выделения <i>Burkholderia cepacia</i> complex из клинического материала	108
6.3. Оценка влияния ростовой добавкой на селективность питательной среды для выделения <i>Burkholderia cepacia</i> complex	113
6.4. Влияние железосодержащей ростовой добавки на результаты видовой идентификации представителей <i>Burkholderia cepacia</i> complex методом MALDI-ToF масс-спектрометрии	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ	136
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	138
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	139
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Совершенствование методов диагностики и лечения муковисцидоза (МВ) за последние десятилетия привело к увеличению случаев выявления патологии в раннем детском возрасте и продолжительности жизни больных, сохраняя одно из самых частых наследственных заболеваний актуальной медико-социальной проблемой современного здравоохранения [50, 58, 60, 108, 130, 143]. Однако, несмотря на значительные успехи в диагностике и терапии, осложнения, связанные с инфицированием бронхолегочной системы неферментирующими грамотрицательными бактериями (НФГОБ), по-прежнему остаются основной причиной смертности пациентов с муковисцидозом, вследствие чего выявление нарушений при патологических состояниях инфекционного генеза является приоритетной задачей диагностической службы при работе с материалом от пациентов с муковисцидозом [7, 9, 20, 21, 26, 40]. Также определение качественных и количественных характеристик лабораторных параметров воспалительного синдрома (лейкоцитоз, повышение скорости оседания эритроцитов, высокие значения С-реактивного белка) не всегда точно способствует выявлению этиологической причины воспаления, которое может быть локализовано вне респираторного тракта, часто характеризуется периодическими обострениями или может быть вызвано инфекционными агентами вирусной и грибковой природы. В связи с этим появляется потребность в разработке методик лабораторного исследования для диагностики заболевания, определения и прогнозирования тяжести течения инфекционно-воспалительных процессов в респираторном тракте больных муковисцидозом.

Поиск лабораторных параметров в альтернативных биологических жидкостях, например, в мокроте, может служить дополнительным критерием в диагностике инфекционных осложнений бактериального генеза при

муковисцидозе, а определение клинической значимости выявленных изменений при динамическом наблюдении за состоянием пациента позволит оценить тяжесть течения и обострения инфекционно-воспалительного процесса в бронхолегочной системе. Однако, использование мокроты в качестве субстрата для биохимических исследований требует валидации методик и стандартизации преаналитической подготовки материала, а также персонализированного подхода при интерпретации полученных результатов. Валидирующие мероприятия, в свою очередь, предполагают предварительное изучение закономерностей внутрииндивидуальных колебаний аналитов при исследовании новых биосубстратов [4, 19].

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

Таким образом, необходим поиск дополнительных лабораторных показателей инфекционно-воспалительных осложнений в бронхолегочной системе у пациентов с МВ, вызванных НФГОБ с разработкой критериев значимости их изменений. Использование информации о метаболических особенностях клинически значимых для больных МВ микроорганизмов поможет оптимизировать методы культивирования и идентификации патогенов. Актуальным является регулярный микробиологический

мониторинг структуры микробиоты пациентов с оценкой клинического течения обострения хронического инфекционного процесса в легких.

Степень разработанности темы исследования

Полученные за последние десятилетия данные по этиопатогенезу и распространенности МВ способствовали появлению новых подходов к диагностике и терапии инфекционных осложнений, вызванных НФГОБ. Описаны работы по исследованию мокроты с целью поиска маркеров инфекционно-воспалительного процесса, однако отсутствуют данные по валидации методов биохимического анализа мокроты и стандартизации преаналитического этапа исследования, которые обеспечивают достоверность получаемых результатов [30, 63, 78, 118, 127, 136].

В зарубежной литературе описаны исследования, характеризующие более высокие уровни железа и железосвязывающих белков в мокроте больных МВ по сравнению с пациентами с другими заболеваниями бронхолегочной системы [32, 72, 85]. Однако нет данных об интерпретации полученных результатов и значении их изменений при оценке состояния пациента. Также не проводилось изучение взаимосвязи показателей обмена железа и видовым составом микробиоты, инфицирующей респираторный тракт пациентов с муковисцидозом.

Описаны механизмы утилизации микроорганизмом железа из окружающей среды и его значение для метаболизма бактерий из *Burkholderia cepacia* complex [45, 48, 49, 88, 128]. При этом отсутствует информация об использовании железосодержащих добавок для культивирования представителей *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала пациентов с МВ, а также влияние их применения на результаты видовой идентификации с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Цель исследования

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

Задачи исследования:

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

Научная новизна

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

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

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

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

Доказано влияние органической соли железа в качестве ростовой добавки в питательной среде на сроки культивирования представителей *Burkholderia cepacia* complex и результаты их идентификации при использовании метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

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

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

Разработана плотная питательная среда для культивирования микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex (Патент РФ № 2759831).

Установлено повышение показателя продуктивности плотных питательных сред, сокращение сроков культивирования и улучшение результатов идентификации с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии *Burkholderia cepacia* complex при использовании железосодержащей добавки.

Методология и методы исследования

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

Положения, выносимые на защиту:

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

Степень достоверности и апробация результатов исследования

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

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

Личный вклад автора

Диссертант непосредственно участвовал на всех этапах проведения исследования. Формулировка цели и задач, разработка дизайна исследования проводились совместно с научными руководителями д.м.н., доцентом Гусяковой О.А. и д.м.н., доцентом Лямыным А.В. Сбор и анализ зарубежной и отечественной литературы по теме диссертационного исследования, проведение лабораторных исследований, статистическая обработка результатов, написание текста диссертации выполнены диссертантом самостоятельно. Подготовка публикаций и докладов по теме исследования выполнена совместно с сотрудниками кафедры фундаментальной и

клинической биохимии с лабораторной диагностикой и кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Тема работы, использованные материалы и методы, полученные результаты, их обсуждение, выводы и практические рекомендации соответствуют паспорту специальности 3.3.8. – клиническая лабораторная диагностика (пункты 1, 2, 3, 7); 1.5.11. – микробиология (пункты 2, 4, 7).

Внедрение результатов в практику

Результаты проведенного исследования используются в работе отдела лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, клинико-диагностических лабораторий Клиник федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Самарская областная детская клиническая больница им. Н.Н. Ивановой», государственного бюджетного учреждения здравоохранения Самарской области «Тольяттинская городская больница №5». Результаты диссертационного исследования включены в программу практических занятий и лекционного курса для студентов, ординаторов и врачей, также используются в научно-исследовательской деятельности кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой;

общей и клинической микробиологии, иммунологии, аллергологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации результатов исследования

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

Структура и объем диссертации

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

ГЛАВА 1. КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Этиопатогенетические и эпидемиологические особенности муковисцидоза

На сегодняшний день муковисцидоз или кистозный фиброз является одним из самых распространенных аутосомно-рецессивных наследственных заболеваний. Впервые это заболевание было описано в 1938 году Anderson D.H., и на тот момент больные МВ обычно умирали в первый год жизни, однако последние десятилетия в мире активно развиваются методы диагностики и лечения муковисцидоза, что ожидаемо приводит к увеличению продолжительности и улучшению качества жизни пациентов, сохраняя проблему одного из самых часто встречаемых генетических заболеваний актуальной и социально значимой. Применение новых антибиотиков, появление таргетной терапии, поддержание нутритивного статуса пациентов, расширение возможностей диагностических исследований, новые методы физиотерапии – это только часть факторов, способствующих тому, что в настоящее время в большинстве развитых стран доля взрослых пациентов с МВ превышает долю несовершеннолетних, а средний возраст дожития составляет почти 50 лет. Таким образом, МВ из заболевания исключительно детского возраста постепенно переходит в болезнь взрослых с соответствующими сопутствующими патологиями и осложнениями [77, 101, 131, 135, 143, 155].

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) ежегодно в мире рождается от 40 до 50 тысяч детей с МВ, при этом оценить количество гетерозиготных носителей можно только примерно – десятки миллионов. Распространенность патологии широко варьируется и зависит от географических зон и этнической принадлежности, но наиболее часто

заболевание встречается у представителей европеоидной расы. В Европе частота встречаемости МВ различна: от 1 случая на 1350 новорожденных в Ирландии, до 1:25000 в Финляндии. Также часто фиксируются случаи МВ в Северной Америке – в Канаде заболеваемость составляет 1:3000, в США 1:4000. Намного реже патология встречается в странах Азии, например в Японии выявляется всего 1 случай МВ на 350000–400000 новорожденных [58, 68, 130].

В России МВ встречается в среднем с частотой 1:10000 новорожденных. По данным регистра больных муковисцидозом в Российской Федерации за 2019 год в нашей стране наблюдалось 3117 пациентов, из них доля взрослых составила 25,5%. Для своевременного выявления патологии с 2007 года во всех субъектах нашей страны проводится неонатальный скрининг в соответствии с Приказом №185 МЗ и СР РФ от 22.03.2006 года «О массовом обследовании новорожденных на наследственные заболевания», что также подтверждает актуальность заболевания.

В этиологии МВ лежит дефект гена CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), что приводит к дисфункции одноименного белка, или, как принято называть в русскоязычной литературе, трансмембранного регулятора муковисцидоза (МВТР). МВТР (CFTR) является цАМФ-зависимым хлорным каналом, который находится преимущественно в апикальной части эпителиальных клеток всех органов и в норме обеспечивает активный транспорт ионов хлора, а также опосредованно регулирует абсорбцию ионов натрия [8, 15, 126].

Ген CFTR расположен в середине длинного плеча седьмой хромосомы и впервые был изолирован в 1989 году. В настоящее время известно более 2000 мутаций гена CFTR, которые в зависимости от типа механизма нарушения функции белка подразделяют на шесть основных классов. Мутации гена CFTR, относящиеся к I, II и III классам характеризуются полным или практически полным нарушением функции белка CFTR, в связи с чем чаще ассоциированы с классическим МВ и относятся к «тяжелым», тогда как при

мутациях IV, V и VI классов функция хлорного канала частично сохраняется, что позволяет объединить их в группу «мягких» мутаций. Также установлено, что один и тот же вариант мутации может приводить к разным видам нарушения функциональности белка CFTR [43, 50, 75, 108].

Согласно современным представлениям, функционально белок CFTR является не только главным хлорным каналом клетки, но и участвует в транспорте натрия. Поэтому дисфункция белка, возникшая вследствие генетической мутации, приводит к накоплению избыточного количества ионов хлора в клетке. Далее за ионами хлора в клетку устремляются ионы натрия, являющиеся осмотически активными электролитами, что обуславливает усиленное всасывание воды с поверхности клеток и межклеточного пространства, и, как следствие, происходит дегидратация и сгущение секрета экзокринных желез. Накопление чрезмерно вязкого и густого секрета приводит к нарушению работы поджелудочной железы, печени, репродуктивной функции у мальчиков и регулярным осложнениям инфекционно-воспалительного характера в бронхолегочной системе [5, 17, 41, 121].

Различные варианты мутаций, клинические особенности проявлений заболевания в разные возрастные периоды, разнообразные по этиологии осложнения – все это может затруднять диагностический поиск и, зачастую, требовать применения специфических и разнообразных тестов и методов лабораторной диагностики как для непосредственной постановки диагноза, так и для подтверждения развивающихся осложнений.

1.2. Методы лабораторной диагностики при муковисцидозе

Методы лабораторной диагностики, несомненно, являются важным и неотъемлемым этапом в постановке диагноза и мониторинге состояния больных МВ. Условно их можно разделить на специфические и вспомогательные. К специфическим методам диагностики МВ относят определение уровня иммунореактивного трипсиногена (ИРТ) (неонатальный

скрининг), потовую пробу, исследование панкреатической эластазы кала и молекулярно-генетическое исследование. Вспомогательные методы диагностики необходимы для оценки проводимой терапии, прогноза осложнений, наблюдения за состоянием пациента, и включают в себя биохимический анализ крови, микробиологическое исследование мокроты и мазков со слизистых оболочек верхних дыхательных путей (ВДП). Кроме этого, необходимо регулярно проводить лабораторные исследования, направленные на прогноз осложнений характерных для МВ – остеопороза и муковисцидоз-ассоциированного сахарного диабета [35, 55, 59, 62].

В РФ неонатальный скрининг на МВ проводится по протоколу, включающему 3 обязательных этапа: двукратное определение ИРТ (чувствительность более 96%, специфичность – не менее 99,8%) и потовый тест. У новорожденных, больных МВ выделение вязкого секрета приводит к закупорке протоков поджелудочной железы, в результате чего снижается выброс ИРТ в тонкий кишечник, где он в норме должен превращаться в трипсин, что, в свою очередь, приводит к проникновению трипсиногена в кровь. При проведении первого этапа скрининга осуществляется взятие крови новорожденного (на 4-5 день у доношенных, 7-8 день у недоношенных) с последующим внесением на специальные фильтровальные бумажные тест-бланки; далее методами иммуноферментного либо иммунохемилюминесцентного анализа с использованием специфических антител измеряется уровень ИРТ. Нормой считается показатель, не превышающий 70 нг/мл. При превышении порогового значения на 21-28 день проводят повторное исследование, норма которого составляет до 40 нг/мл.

Потовая проба является одним из первых методов лабораторной диагностики МВ, и до сих пор остается «золотым стандартом». Чувствительность данного метода достигает 98%. В настоящее время используют две методики проведения потового теста – классический по Гибсону-Куку и определение проводимости пота [60, 64, 112].

Для повышения точности результатов предлагается сочетанное применение методик. В качестве нормальных показателей рекомендуется учитывать уровень хлоридов, не превышающий 30 ммоль/л, и проводимость до 50 ммоль/л. Положительным результатом теста считается уровень хлоридов более 60 ммоль/л и показатель проводимости, превышающий значение 80 ммоль/л.

Пограничные результаты потовой пробы встречаются довольно редко и в основном у взрослых; их связывают с индивидуальными особенностями людей, не болеющих МВ, либо имеющих специфические заболевания (синдром Кляйнфельтера, гликогенозы, мукополисахаридозы и др.). В таких случаях пациентам рекомендуется проведение повторного исследования с использованием нескольких методик определения хлоридов пота, а также расширенное клинико-лабораторное обследование: ДНК-диагностика, определение фекальной эластазы, биохимический анализ крови, а также посев мокроты с идентификацией возбудителя.

Микробиологическое исследование мокроты имеет ключевое значение для пациентов с МВ, так как именно дыхательная недостаточность, развивающаяся на фоне хронического воспаления, вызванного, зачастую, нетривиальными микроорганизмами, является основной причиной смерти больных [20]. Нарушение работы МВТР приводит к изменению электролитного состава и дегидратации секрета бронхов, что сопровождается скоплением вязкой и густой мокроты и приводит к ее застою в нижних дыхательных путях (НДП). Все это способствует бактериальной колонизации респираторного тракта и развитию воспаления, в ответ на которое в дыхательные пути пациента поступает большое количество нейтрофилов. Во время дегенерации нейтрофилов высвобождается значительное количество нуклеиновых кислот: при хроническом воспалении у больных МВ ДНК нейтрофилов могут накапливаться в достаточно большом количестве – до 15 мг в 1 мл мокроты, что также обуславливает повышенную вязкость данного секрета. В результате длительного хронического инфекционно-

воспалительного процесса, периодически переходящего в обострения, отмечается нарушение мукоцилиарного клиренса, что соответственно ухудшает эвакуацию густой мокроты и в итоге еще больше усугубляет течение патологического процесса в бронхолегочной системе у пациентов с МВ [127, 150]. Формируется один из «порочных кругов»: изменение реологических свойств мокроты и ее скопление формирует благоприятные условия для колонизации респираторного тракта микроорганизмами; в ответ на присутствие микроорганизмов в мокроте увеличивается количество нейтрофилов и других антибактериальных факторов, но их конечная активность снижается из-за повышенной вязкости мокроты; разрушение нейтрофилов приводит к высвобождению большого количества нуклеиновых кислот, что повышает вязкость мокроты; развивается хроническое воспаление, сопровождающееся деструкцией мерцательного эпителия и нарушению механизмов мукоцилиарного клиренса, что, в свою очередь приводит к застою густой мокроты в НДП. Таким образом, в течение всей своей жизни пациенты с МВ подвержены развитию различных бронхолегочных инфекций бактериальной этиологии.

1.3. Проблемы микробиологической диагностики при муковисцидозе

Уже в середине 1940-х годов была очевидна ведущая роль бактериальной инфекции в патогенезе данного заболевания, когда Paul di Sant'Agnese успешно применял пенициллин для лечения инфекционно-воспалительных осложнений в респираторном тракте у больных МВ. На тот период времени основным возбудителем инфекционных осложнений в данной группе пациентов являлся метициллин-чувствительный золотистый стафилококк [34].

Но на сегодняшний день «микробный пейзаж» респираторного тракта пациентов с МВ характеризуется своей специфичностью, вариабельностью и во многом уникальностью [9, 40, 86, 105]. Целый ряд микроорганизмов, ежедневно выделяемых и идентифицированных микробиологическими

лабораториями, работающими с МВ, зачастую не встречается при работе с материалом от пациентов с другими заболеваниями. Микробиота, которую в литературе привычно описывают как сапрофитная, не представляет опасности для здоровых людей, однако часть из этих микроорганизмов может иметь критическое значение для пациентов с МВ, а клиническая значимость остальных бактерий может быть не изучена достаточно. Нередко количество видов бактерий, выделенных из НДП пациентов с МВ можно достигать десяти и более, при этом большая часть микроорганизмов специфичны и не встречаются в рутинной практике врача-бактериолога. Таким образом, можно говорить о том, что легкие пациента с МВ являются своеобразной микрoэкологической нишей, со своими особенностями и сложным взаимодействием ее отдельных частей. При этом следует учитывать и о взаимоотношении «микроорганизм-хозяин», так как не менее сложным оказывается воздействие микробного сообщества на отдельные физиологические системы и среды пациента, а также в целом на весь макроорганизм [38, 80, 110, 134, 157]. Именно поэтому перед специалистами лабораторной службы встает задача не только микробиологического мониторинга состояния респираторного тракта пациентов с МВ, но и изучения влияния активной жизнедеятельности микроорганизмов на организм пациента, как локальных, так и генерализованных, и, по возможности, предотвращение негативных последствий.

Неферментирующие грамотрицательные бактерии являются одними из наиболее клинически значимых микроорганизмов для пациентов с муковисцидозом [10, 123]. НФГОБ представляют собой широко распространенную группу микроорганизмов, встречающуюся повсеместно. Основная часть представителей этой группы являются естественными обитателями окружающей среды, преимущественно населяющими почву и водоемы [69, 82]. Некоторые из неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов входят в состав нормальной микробиоты кишечника, кожи и слизистых оболочек, в ряде случаев могут являться патогенами для

человека, в то время как для пациентов с муковисцидозом клиническое значение отдельных видов НФГОБ, колонизирующих дыхательные пути, не вызывает сомнений [137]. Ввиду повсеместной распространенности в окружающей среде представителей группы НФГОБ с большинством из них пациенты с муковисцидозом постоянно контактируют в повседневной жизни, и зачастую можно наблюдать случаи так называемой транзитной колонизации. Однако, отдельные группы микроорганизмов данного сегмента, например, *Pseudomonas aeruginosa* и бактерии из *Burkholderia cepacia* complex (ВСС) после первичной колонизации НДП пациентов с МВ быстро адаптируются к новым условиям обитания и часто переводят инфекционный процесс в хроническую форму [79, 107, 119]. В дальнейшем, нередко отмечаются периодические обострения, что в итоге приводит к развитию дыхательной недостаточности – основной причине летального исхода у данной группы пациентов. Безусловно, вероятность контакта с этими микроорганизмами из окружающей среды существует всегда, но тем не менее, именно инфицирование пациентов при контакте друг с другом остается на первом месте, зачастую это происходит в условиях внутрибольничной среды, поэтому основной защитной мерой остается соблюдение противоэпидемических мероприятий, главное из которых – разобщение пациентов друг от друга, с учетом результатов предварительно проведенных микробиологических исследований. Также необходим постоянный микробиологический мониторинг выделенных НФГОБ в сообществе больных МВ.

По данным Европейского регистра за 2016 год доля больных, инфицированных бактериями из ВСС от общего количества пациентов с муковисцидозом составила 0,98% во Франции, 2,09% в Германии и 3,62% в Великобритании [142]. В России этот показатель за 2016 год оказался значительно выше и составил 6,0%, а в 2017 году увеличился до 6,2%. Если оценивать распространение микроорганизмов из ВСС по регионам РФ, то выделяются Приволжский федеральный округ и Дальневосточный

федеральный округ, где количество пациентов с ВСС в 2016 году составило 10,1% и 11,2% соответственно. Однако такой формат фиксирования данных не всегда дает возможность точно оценить ситуацию в конкретном субъекте страны. В частности, до 2015 года данные регистра предоставлялись отдельно по каждому субъекту РФ, и в Самарской области количество пациентов, инфицированных микроорганизмами из ВСС в 2013 году, составило 42%, а в 2014 году – 39%, что является крайне высокими показателями.

На сегодняшний день выделение бактерий ВСС из материала от больных МВ остается неблагоприятным диагностическим и прогностическим фактором. По данным литературы инфицирование дыхательных путей данными микроорганизмами статистически значимо снижает продолжительность жизни пациентов с МВ по сравнению с хронической инфекцией другой микробиотой, а доказанные случаи эрадикации патогенов из ВСС единичны [21, 46, 124].

Микроорганизмы из *Burkholderia cepacia* complex были выделены в 1949 году из гниющего лука и описаны как фитопатоген, однако уже в 1977 году были высеяны из мокроты от пациентов с МВ и в дальнейшем описаны как причина развития «цепация-синдрома», проявляющегося некротизирующей пневмонией, лихорадкой, лейкоцитозом, что впоследствии может привести к летальному исходу [47]. Из этого следует, что смена экологических ниш привела к быстрой и радикальной адаптации данных бактерий, которым на приобретение и реализацию патогенного потенциала потребовалось менее 30 лет. Отчасти это стало возможным благодаря необычайно большому геному ВСС, превышающему геном других грамотрицательных бактерий в 2-4 раза, а также наличию плазмид, обладающих возможностью независимой репликации. Быстрое приобретение резистентности к антибиотикам связывают с передачей плазмидной ДНК между разными штаммами возбудителей из ВСС и даже между разными родами бактерий, например, возможен обмен плазмидами с синегнойной палочкой [139, 140]. Такая

сложная и переменная совокупность генетического материала и адаптивных механизмов дает возможность бактериям из ВСС выживать и размножаться в различных условиях окружающей их среды, выделяя различные факторы патогенности и вирулентности, сохраняя природную невосприимчивость к ряду антибиотиков и дезинфектантов [147]. В итоге мы можем наблюдать явление «рывков» – стремительных переходов от сапрофитного существования в природных резервуарах до вспышек внутрибольничных инфекций.

Несколько иная ситуация с другим, более «классическим» возбудителем из НФГОБ – *Pseudomonas aeruginosa*. По данным за 2017 год, в РФ синегнойная палочка была выявлена у 32,4% пациентов с МВ и является вторым по частоте выделения после *Staphylococcus aureus* (57,1%). Интересной особенностью является то, что число пациентов с синегнойной инфекцией в течение нескольких лет оставалось достаточно стабильным и в период с 2011 по 2017 годы варьировало от 30,0 до 32,4%. Также характерной особенностью является рост доли пациентов, инфицированных *P.aeruginosa* при увеличении их возраста: к 12 годам около 30% детей имеют хронический высеv синегнойной палочки, в то время как в группе пациентов старше 32 лет этот показатель составляет уже 55%. Похожая ситуация складывается и в других странах, например в США, где в 2017 году 44,6% больных МВ имели хроническую синегнойную инфекцию [40]. Согласно принятому модифицированному критерию г. Лидса (Leeds criteria) пациент считается хронически инфицированным грамотрицательными микроорганизмами, если результаты 50% посевов мокроты в течение последних 12 месяцев будут положительными, что подчеркивает необходимость регулярного микробиологического мониторинга для пациентов с МВ [20, 71, 115].

1.4. Метаболиты патогенеза инфекционно-воспалительного процесса в легких при муковисцидозе

Практически с самого рождения пациенты с МВ должны регулярно проходить микробиологическое обследование для выявления возможных патогенов и назначения корректной антибиотикотерапии. Несомненно, бактериологический посев мокроты дает возможность выделить и идентифицировать возбудителя, определить его количество и чувствительность к антибактериальным препаратам, однако данный вид исследования не дает возможности оценить общее состояние пациента и тяжесть течения инфекционно-воспалительного процесса в НДП. Как следствие начались поиски альтернативных методов лабораторного исследования материала от пациентов с МВ. В частности, было предложено использование биохимического метода исследования мокроты с целью выявления возможных маркеров осложнения инфицирования.

Было показано, что изменение активности ферментов в мокроте можно использовать для оценки степени патологических изменений, обусловленных воздействием микроорганизмов на бронхолегочную систему у пациентов с МВ. Исследования активности миелопероксидазы в мокроте показали, что активность данного фермента у больных МВ значительно выше, чем в группе сравнения у здоровых лиц, при этом установлена прямая корреляционная зависимость между концентрацией данного фермента и тяжестью воспаления [12]. Также отмечено достоверное повышение уровня миелопероксидазы у пациентов с высевом *P.aeruginosa*, что может служить как маркером синегнойной инфекции, так и дополнительным критерием оценки тяжести воспаления в НДП при МВ [145].

Известно, что основным источником миелопероксидазы являются нейтрофилы, что, в свою очередь имеет одно из ключевых значений в течение воспалительного процесса, так как данный фермент обладает не только выраженной бактерицидной активностью, но и участвует в развитии

оксидативного стресса и свободно-радикального повреждения легочной ткани, стимулируя образование активных форм кислорода и галогенов.

Помимо миелопероксидазы нейтрофилы секретируют ряд различных протеиназ: коллагеназу, нейтрафильную эластазу, матриксные металлопротеиназы, нейтрофильные катепсины, протеиназу-3, избыточный синтез которых разрушает эластин, что приводит к деструкции межальвеолярных перегородок с последующим формированием фиброза. Также повышенная активность эластаз и коллагеназ приводит к гиперсекреции слизи и нарушению работы протеиназных ингибиторов – α 1-протеазного ингибитора (α 1-антитрипсин) и α 2-макроглобулина, которые в норме регулируют активность протеолитических ферментов плазмы и слизистых секретов [83, 100, 132, 149].

α 1-протеазный ингибитор по своей структуре является гликопротеином, основной функцией которого является ингибирование эластазы. Ввиду своего небольшого размера – молекулярная масса 50 кДа – молекулы этого белка свободно диффундируют из плазмы в ткани, в частности в легкие, что может использоваться в качестве маркера воспаления и повреждения легких при исследовании мокроты [1]. α 2-макроглобулин в свою очередь также относится к гликопротеином, но имеет значительно большие размеры (молекулярная масса белка 725 кДа) и является более универсальным ингибитором – подавляет активность протеиназ основных классов: сериновых, тиоловых, кислых, металлосодержащих, регулируя синтез гормонов и цитокинов, гемостаз, воспалительный ответ [56]. Одними из основных функций α 2-макроглобулина при воспалительных заболеваниях нижних дыхательных путей являются образование белково-лигандных комплексов, лигандами которых являются медиаторы воспаления и ингибирование нейтрофильной эластазы. Механизм ингибирования состоит в захвате ферментативной молекулы α 2-макроглобулином, при этом энзим теряет способность гидролизовать крупные белки, однако сохраняет активность по отношению к низкомолекулярным субстратам. При этом

образование белково-лигандных комплексов $\alpha 2$ -макроглобулина с медиаторами воспаления, цитокинами, ферментами осуществляется благодаря наличию у $\alpha 2$ -макроглобулина трех сайтов связывания регуляторных лигандов: первый связывает ионы цинка; второй присоединяет цитокины, гормоны, и бактерии; третий захватывает протеолитические ферменты [6]. Высокие значения $\alpha 2$ -макроглобулина в мокроте могут наблюдаться как при активном экссудативном воспалении, вызванном бактериальными возбудителями, так и при хроническом инфекционно-воспалительном процессе в дыхательных путях. Таким образом, помимо оценки активности протеолитических ферментов в диагностических целях в мокроте у пациентов с МВ целесообразно исследовать и ингибиторы протеиназ, которые также будут являться маркерами тяжести воспаления в легочной ткани.

Очевидно, что активность протеолитических ферментов является прямым критерием при оценке воспаления, обусловленным разрушением нейтрофилов при бактериальной инфекции. Однако следует учитывать, что воспаление – это многофакторный процесс, в котором принимают активное участие медиаторы, в частности провоспалительные цитокины, в основном представленные IL-8 и TNF α . Для пациентов с МВ триггером усиленного синтеза данных медиаторов воспаления является персистирующая инфекция, вызванная чаще всего *P.aeruginosa* и возбудителями из ВСС [22, 33, 68].

Источником цитокинов при воспалении в легочной ткани являются эпителиальные клетки респираторного тракта, лимфоциты и макрофаги. IL-8 является цитокином белковой природы и служит важным звеном в патогенезе МВ, поскольку это один из основных хемоаттрактантов, стимулирующих движение нейтрофилов из периферической крови в бронхи и легкие и способствующие их адгезии к клеткам; кроме этого IL-8 тоже активизирует синтез протеолитических ферментов и оксидантов, что может усугублять течение инфекционно-воспалительного процесса [63]. Бактериальные факторы патогенности, такие как липополисахариды и

мукоидные экзополисахариды грамотрицательных бактерий стимулируют макрофаги на выработку другого важного провоспалительного медиатора – TNF α , который активирует образование перекиси водорода и других свободных радикалов нейтрофилами, а также является индуктором синтеза интерлейкинов [81]. Таким образом, формируется дополнительный «порочный круг» воспалительного процесса в респираторном тракте у пациентов с МВ: увеличение синтеза провоспалительных цитокинов IL-8 и TNF α стимулируют проникновение нейтрофилов в очаги воспаления, продуцирующих большое количество эластазы и других протеолитических ферментов. Эти ферменты, а также перекиси и другие оксиданты способствуют повреждению клеток легочной ткани, что, в свою очередь приводит к высвобождению и активации цитокинов и притоку новых нейтрофилов [63, 68].

Как мы видим, воспалительный процесс, вызванный НФГОб значительно индуцирует повышение активности ферментов нейтрофилов и увеличение синтеза цитокинов, что несомненно является важным звеном патогенеза развития дыхательной недостаточности на фоне хронического воспаления бактериального генеза. Определение активности ферментов и уровня провоспалительных цитокинов может использоваться в лабораторной диагностике при проведении биохимического исследования мокроты для оценки тяжести течения инфекционно-воспалительного процесса.

1.5. Железо и железосвязывающие белки как возможные маркеры инфекционных осложнений у пациентов с муковисцидозом

За последние годы проведен ряд исследований по обмену железа в легочной ткани, а также по определению показателей его обмена в мокроте у пациентов с МВ. В результате были получены данные, показывающие значительное увеличение количества железа и железосвязывающих белков (ферритин, трансферрин, лактоферрин) в мокроте у пациентов с МВ, при

этом у большинства из них были выделены НФГОБ – *P.aeruginosa* и представители ВСС. По сравнению с пациентами с другими нозологиями (пневмония, ХОБЛ) у пациентов с МВ уровень данных метаболитов в мокроте был выше в 2-4 раза, а в некоторых случаях – в 20 раз [85, 89]. Отмечена зависимость уровня железа и ферритина в мокроте от течения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте: повышение этих показателей во время обострения или развития «цепация-синдрома» и тенденция к их снижению после проведения терапии, при этом наблюдается корреляция с уровнем железа и железосвязывающих белков в сыворотке крови [72, 84, 85, 93]. Также в целом стоит отметить, что до 62% взрослых пациентов с МВ страдают железodefицитной анемией, либо тенденцией к снижению уровня железа и железосвязывающих белков в сыворотке крови, что может быть связано с особенностями инфекционно-воспалительного процесса в легких [32, 116, 117, 148]. Конечно, данный факт можно рассматривать как результат длительного воспаления, характерного для пациентов с МВ, с периодическими обострениями и осложнениями в виде кровотечений, сопровождающихся выходом гемоглобина, трансферрина и железа в ткани. Однако у большей части пациентов кровотечений не отмечалось, к тому же в мокроте были выявлены высокие уровни именно железа и ферритина – внутриклеточного депо железа. В связи с этим можно предположить, что причиной повышения этих показателей в мокроте является потребность бактерий [31, 45].

Таким образом, показатели обмена железа могут быть использованы в качестве маркеров инфекционно-воспалительных осложнений, вызванных НФГОБ в НДП у пациентов с МВ. Однако применение лабораторных методов биохимического исследования мокроты требует проведения валидирующих мероприятий, обеспечивающих достоверность полученных результатов.

1.6. Возможности биохимического исследования мокроты в клиничко-диагностической лаборатории

В современной клиничко-диагностической лаборатории исследования мокроты ограничиваются в основном микроскопическими методами диагностики. Микроскопия мокроты в лабораторной службе ассоциируется в первую очередь с диагностикой туберкулеза, реже – с другими заболеваниями респираторного тракта.

Возможно, применение других методов лабораторной диагностики, например биохимического анализа мокроты позволит расширить спектр диагностических возможностей в отношении определенных нозологий. Однако, существует ряд особенностей, которые необходимо учитывать при работе с данной альтернативной биологической жидкостью, а также проблем, требующих обязательного решения для реализации предложенного метода на практике:

- мокрота – трахеобронхиальный секрет, образующийся в результате патологического процесса, соответственно для этого субстрата априори отсутствуют варианты норм сравнения;
- отсутствие референтных величин для исследуемых в мокроте метаболитов;
- разнородность мокроты как биологического материала: количество и характер мокроты зависит от заболевания;
- отсутствие алгоритма проведения преаналитического этапа и пробоподготовки материала для последующих биохимических исследований;
- необходимость проведения валидирующих и верифицирующих мероприятий для возможности биохимического исследования в лабораторной практике на анализаторах, предназначенных для других биологических жидкостей (сыворотка крови, моча);
- нарушения преаналитического этапа: загрязнение мокроты большим количеством слюны при сборе;

Исходя из вышеперечисленного возникает вопрос: возможно ли использование мокроты как субстрата для биохимического исследования? Безусловно, внедрение данной методики в рутинную практику лабораторной и клинической службы для всех пациентов с заболеваниями респираторного тракта имеет низкую диагностическую ценность для врача-клинициста и требует не всегда обоснованных, значительных трудозатрат для специалистов лаборатории. Однако, в отношении пациентов с МВ, у которых инфекционно-воспалительные осложнения в бронхолегочной системе могут наблюдаться регулярно в течение всей жизни, биохимический анализ мокроты может служить дополнительным диагностическим инструментом, а определяемые метаболиты, описанные выше, использоваться в качестве предикторов обострения и маркеров тяжести течения инфекционно-воспалительного процесса [136].

Больные МВ являются особой когортой пациентов в современном здравоохранении. Неонатальная диагностика позволяет выявить патологию в раннем детском возрасте, при этом каждый случай заболевания фиксируется в национальном регистре. В дальнейшем пациенты с МВ в течение всей жизни наблюдаются в региональных центрах муковисцидоза, что позволяет проводить постоянный мониторинг клинико-лабораторных показателей каждого больного и определить внутрииндивидуальную биологическую вариацию интересующих нас метаболитов в данной группе.

Патогенетические особенности МВ характеризуются патологическими изменениями в респираторном тракте, обычно сопровождающимися обильным выделением мокроты, что упрощает соблюдение правил сбора материала и позволяет провести стандартизацию преаналитического этапа и пробоподготовки для последующего исследования [30].

Исследование мокроты с помощью автоматических биохимических анализаторов требует обязательного проведения валидирующих мероприятий, главная цель которых – экспериментальное доказательство того, что данная методика пригодна для достижения итоговой цели и

удовлетворяет требования для ее использования. Кроме того, валидация позволяет оценить пригодность метода при диагностике конкретного состояния пациента, квалификацию сотрудника, качество используемых реактивов, состояние используемых приборов, соблюдение правил преаналитического и аналитического этапов. Валидация является комплексом мероприятий, позволяющим оценить надежность и аналитическую пригодность используемого метода, а также оценить достоверность полученных результатов по следующим критериям:

- Специфичность – возможность метода выявлять именно тот аналит, для которого он предназначен, при наличии других различных метаболитов в биологическом материале;
- Чувствительность – характеризуется возможностью применяемого метода выявлять небольшие изменения концентрации определяемого аналита;
- Линейность метода характеризуется возможностью использования методики с отклонением значения определяемого вещества в пределах диапазона ее измерения;
- Прецизионность – позволяет оценить степень близости полученных результатов для серии измерений, выполненных по предлагаемой методике на различных пробах одного и того же образца. Включает в себя определение сходимости и воспроизводимости метода;
- Правильность метода характеризует степень соответствия между полученным при использовании предлагаемой методики результатом и уже известным значением (справочной величиной).

Комплекс валидирующих мероприятий проводится в соответствии с основными нормативными документами: Приказ № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»; ГОСТ Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль

качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях»; ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»; ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний»; Протоколы института Клинических Лабораторных Стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)), (США).

Таким образом, стандартизация преаналитического этапа и алгоритмов пробоподготовки образцов мокроты, а также проведение валидирующих мероприятий позволит использовать данный биологический субстрат для биохимического исследования с целью выявления возможных маркеров оценки тяжести течения инфекционно-воспалительных процессов бактериального генеза в НДП у больных МВ.

1.7. Роль железа в метаболизме неферментирующих грамотрицательных бактерий

Железо является одним из основных и жизненно важных микроэлементов для живых организмов и микроорганизмы здесь не исключение. Метаболизм бактерий из ВСС неразрывно связан с железом, функционирование целого ряда важных ферментов и белков обеспечивается его наличием, а способность железа легко менять свою валентность делает этот металл необходимым компонентом в окислительно-восстановительных реакциях живой клетки. Как пример известно, что железо является кофактором рибонуклеотидредуктаз I класса, катализирующих конверсию рибонуклеотидов, а соответственно имеющих ключевое значение в синтезе нуклеиновых кислот и делении микробной клетки [48, 49, 128]. Альтернативный пример значимости железа в метаболизме бактерий – постоянная работа железосодержащих белков – цитохромов и

ферредоксинов, обеспечивающих синтез энергии с участием кислорода [125, 90]. Другая жизненно важная для бактерий функция железа – защитная. Каталата и супероксиддисмутаза защищают микроорганизм от активных форм кислорода и других видов окислительных стрессов, а отложение ферригемов на наружной мембране предохраняет бактериальную клетку от перекиси водорода, вырабатываемой нейтрофилами в воспаленной ткани [32, 88, 146]. Также, учитывая адаптационные и патогенные особенности НФГОб, а именно их способность продуцировать биопленки и альгинаты, было продемонстрировано влияние наличия железа на эти факторы патогенности и сделан вывод – высокие концентрации железа стимулируют агрегацию и образование биопленок, продукцию альгинатов, а также факторов адгезии и инвазии, поддерживая таким образом вирулентность патогенной флоры [91, 141].

Очевидно, что для поддержания своей жизнедеятельности микроорганизмам из ВСС необходим постоянный источник железа. Однако, попадая в организм человека, в частности в респираторный тракт, бактерия сталкивается с дефицитом необходимого микроэлемента, так как его основная часть находится в секвестрированном с различными белками в тканях состоянии, а поверхность эпителиальных тканей является скудной на наличие свободного железа средой. Соответственно, для сохранения своей жизнеспособности микроорганизмам необходимо развивать способы и механизмы его получения, и, зачастую, эти механизмы являются дополнительными факторами патогенности, усугубляющими воспалительный процесс.

**1.8. Механизмы получения и захвата железа из окружающей среды у
неферментирующих грамотрицательных бактерий и их роль в
патогенезе инфекционного процесса в легких у пациентов с
муковисцидозом**

При инфицировании дыхательных путей пациентов с МВ микроорганизмы из ВСС провоцируют воспаление, активируя факторы патогенности, в первую очередь липополисахариды (эндотоксин) и специфические О-антигены. Но помимо «классических» факторов патогенности бактерии из ВСС зачастую продуцируют целый ряд ферментов, разрушающих клеточные структуры, что облегчает получение недоступного внутриклеточного железа для бактерии. Муцин-сульфатазы, выделяемые микроорганизмами из ВСС разрушают фактор защиты муцин на поверхности эпителиоцитов респираторного тракта, гидролизуя этот белок до углеводов и аминокислот, используемых в метаболизме самой бактериальной клетки. Далее высвобождаются лецитиназы – внеклеточные ферменты из группы липаз, гидролизующие эфирные связи лецитинов (фосфотидилхолинов и серинфосфатидов) – важных компонентов фосфолипидов мембран. В результате воздействия лецитиназы С (холинспецифическая фосфолипаза С) разрушаются липиды мембран и высвобождаются жирные кислоты, в то время как активность лецитиназы А приводит к образованию α -лизокефалина, обладающего высокой гемолитической активностью [49, 91]. Помимо этого, наблюдается активный синтез протеолитических ферментов: эластазы и желатиназы (внеклеточная цинксодержащая протеиназа) – так же воздействуют на ткани, разрушая эластин и коллаген человека I, IV и V типов [48, 49, 138].

Другой распространенный среди больных МВ представитель НФГОБ *P.aeruginosa* также выделяет несколько протеолитических ферментов, таких как эластаза, щелочная протеаза, эндопротеазы PrpL, которые действуют не только на структуры клеток, но и на железосвязывающие белки тканей – лактоферрин, ферритин и трансферрин, способствуя доступности металла для микробной клетки [54, 94, 96].

Описанные выше ферментативные механизмы бактерий обеспечивают высвобождение основного внутриклеточного пула железа – ферритина. Структурно ферритин представляет собой крупную белковую молекулу (440

кДа), апопротеин которой является внешней оболочкой, покрывающей ядро из гидроксифосфата железа. Такое строение позволяет белку предотвращать возможное образование свободных радикалов, обеспечивая помимо депонирования железа еще и антиоксидантную функцию. В свою очередь бактерии, продуцируя сериновые протеиназы, повреждают структуру этого металлопротеина, что приводит к одновременному появлению большого количества атомов железа, усугубляя воспаление тканей оксидативным стрессом [51]. После высвобождения достаточного количества железа из внутриклеточных депо начинают работать специальные механизмы по захвату микроэлемента в окружающей среде – сидерофоры.

Сидерофоры представляют собой высокоафинные небольшие хелатирующие молекулы, синтез которых возрастает, когда бактерия попадает в железodefицитные условия. Они обычно классифицируются как сидерофоры катехолатного типа, которые связывают трехвалентное железо через гидроксильные группы, сидерофоры гидроксаматного типа, которые хелатируют трехвалентное железо через карбонильную группу с соседним азотом, и сидерофоры смешанного типа, которые имеют катехол- и гидроксаматсвязывающие фрагменты [13].

Бактерии из ВСС способны продуцировать до четырех сидерофоров: орнибактин (основной, наиболее значимый сидерофор), цепациахелин, пиохелин и цепабактин. После захвата железа сидерофоры связываются со специфическими пептидными рецепторами на поверхности бактерии, которые, при взаимодействии с сидерофорами, меняют свою конформацию, превращаясь в β -бочки (порины), обеспечивая тем самым поступление металла в периплазматическое пространство, который в дальнейшем и используется для нужд бактериальной клетки [76]. В дополнение к своей роли в получении железа, сидерофоры также могут играть роль в повреждении тканей. Было показано, что железо, связанное с пиохелином, является эффективным катализатором образования гидроксильных радикалов и увеличивает повреждение эпителиальных и эндотелиальных клеток в

результате воздействия супероксида и пероксида водорода [52, 133]. Также интересен факт конкуренции за железо с помощью сидерофоров между разными видами микроорганизмов. Например, сидерофоры синегнойной палочки увеличивают экспрессию генов синтеза орнибактина *Burkholderia ceposerasia*, что стимулирует последнюю к более агрессивному поведению в борьбе за железо с сопутствующей стагнацией роста и развития *P.aeruginosa* [99, 144, 152].

Синегнойная палочка в ответ на недостаток железа в окружающей среде в свою очередь может синтезировать два основных сидерофора: пиовердин и пиохелин. Пиовердин является сидерофором смешанного типа, имеет более высокое сродство к железу и влияет на процесс образования биопленки, в то время как синтез пиохелина наиболее активен в условиях железодефицита среды и требует больше энергии от бактерии [39, 57, 120]. Исследования, направленные на изучение сидерофоров, подтверждают прямую генотипическую и фенотипическую связь между возможностью приобретения железа микробной клеткой и степенью ее вирулентности [49, 88, 111].

Необходимо отметить, что микроорганизмы являются основными инициаторами выхода железа и железосвязывающих белков из тканей не только за счет продукции сидерофоров и протеаз – сам хронический и периодически обостряющийся процесс воспаления в респираторном тракте у пациентов с МВ приводит к деструкции легочной ткани и появлению микрокровоотечений, результатом которых является выход гемоглобина и трансферрина из сосудистого русла, что способствует формированию среды, богатой железом, ферритином и другими железосодержащими компонентами. В совокупности это создает дополнительные условия для колонизации клинически значимыми патогенами НДП у пациентов с МВ, а также селекции более вирулентных штаммов [45, 153]. Таким образом, формируется очередной «порочный круг» инфекционно-воспалительного процесса: вязкая мокрота приводит к инфицированию НДП

микроорганизмами, которые нуждаются в железе и высвобождают его из тканей. Обострение воспаления приводит к деструкции тканей и к увеличению высвобождаемого железа, что стимулирует рост и вирулентность бактерий.

1.9. Использование железа для выделения и культивирования неферментирующих грамотрицательных бактерий из материала от пациентов с муковисцидозом

Проблемы культивирования и идентификации НФГОБ в современной микробиологии все больше разрешаются в связи с появлением новых селективных питательных сред, совершенствованием методов биохимической идентификации, внедрением в практику MALDI-ToF масс-спектрометрии. В руководстве по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с МВ и в национальном консенсусе даны рекомендации по использованию стандартных и коммерческих селективных питательных сред для культивирования НФГОБ [20]. Однако, применение классических питательных сред (кровяной агар, шоколадный агар, среда Эндо, среда МакКонки) возможно только при работе с чистой культурой НФГОБ, так как при первичном посеве рост данных бактерий может быть замедлен или подавлен из-за конкуренции с другими микроорганизмами; наряду с этим, использование коммерческих селективных питательных сред при работе с материалом от пациентов с МВ подразумевает продленные сроки инкубации от 5 до 7 суток. Также процесс культивирования может осложняться из-за лечения антибактериальными препаратами, системно и ингаляционными формами. При этом необходимо помнить, что в случае обострения инфекционно-воспалительного процесса возникает потребность проведения микробиологической диагностики с получением результата для лечащего врача в течение двух суток. В связи с этим целесообразно рассмотреть возможность применения железосодержащих добавок для культивирования НФГОБ с целью

повышения показателя продуктивности питательных сред, и, соответственно, сокращения сроков бактериологического исследования.

Постоянная доступность железа как в окружающей среде является одним из определяющих условий существования бактерий. Но при этом его количество должно быть оптимальным, потому как избыток этого микроэлемента при культивировании потенциально опасен для бактерии, так как может катализировать реакцию Фентона, которая приводит к образованию токсичных кислородных радикалов из нормальных продуктов аэробного метаболизма [37, 109]. Напротив, дефицит железа при культивировании НФГОБ может привести к бактериостатическому эффекту и замедлению проведения микробиологического исследования. С одной стороны количество железа в большинстве применяемых питательных сред может быть недостаточным или отсутствовать вовсе; с другой – при использовании некоторых классических питательных сред, например кровяного агара, оценить даже примерную концентрацию микроэлемента не представляется возможным.

Также может иметь важное значение форма железа: в рекомендуемых для выделения НФГОБ агаризованных питательных средах железо, если оно есть в составе, представлено в основном в виде неорганических соединений, таких как сульфат железа(II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и сульфат железа(III)-аммония ($(\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O})$). При этом, как описано выше, механизмы получения и захвата железа из окружающей среды у НФГОБ представлены по большей части сидерофор-опосредованным транспортом из металлопротеинов – органических структур. В связи с этим возникает вопрос разработки питательной среды не только с оптимальным содержанием железа, но еще и с поиском его подходящей органической формы. Помимо этого, применение предлагаемой питательной среды должно соответствовать требованиям стандартизации внутрилабораторного контроля качества.

Таким образом, инфекционные осложнения, вызванные НФГОБ в респираторном тракте у пациентов с муковисцидозом остаются комплексной

проблемой для клинико-лабораторной диагностики. Это обусловлено этиопатогенезом заболевания с его различными вариантами мутаций и формами клинических проявлений; метаболическими особенностями нетривиальных микроорганизмов, колонизирующих респираторный тракт больных и формирующих микрoэкологическую нишу со своим сложным межвидовыми взаимодействиями; индивидуальными особенностями макроорганизма, адаптирующегося к длительному, хроническому воспалению в НДП с периодическими обострениями. Обозначенные проблемы подталкивают специалистов клинико-диагностической лаборатории к поиску возможности использования альтернативного биологического материала в качестве дополнительного метода диагностики осложнений, а врача-микробиолога к изучению особенностей метаболизма специфических микроорганизмов с целью применения полученных данных для оптимизации бактериологических исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования проводились на базе клинико-диагностической лаборатории Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Материал от пациентов с диагнозом «Кистозный фиброз» (код по МКБ E84) поступал из Самарского областного центра по оказанию медицинской помощи больным муковисцидозом на базе инфекционного отделения ГБУЗ СОДКБ им. Н.Н. Ивановой.

Всего в исследовании использовался материал от 88 больных муковисцидозом, в возрасте от 5 до 34 лет. Критериями включения являлись лабораторно и клинически верифицированный диагноз, наличие свободно отделяемой мокроты. Критерием исключения из исследования являлось отсутствие свободно отделяемой мокроты. Материал от пациентов с диагнозами «Пневмония» (код по МКБ J15.9) и «Бронхит» (код по МКБ J40) поступал из отделения пульмонологии и аллергологии Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Критериями включения в группы обследования были наличие свободно отделяемой мокроты, лабораторные признаки острого воспаления: лейкоцитоз $>10 \cdot 10^9/\text{л}$, СРБ >5 мг/л, СОЭ >20 мм/ч, результаты микробиологического исследования, подтверждающие бактериальную этиологию заболевания.

2.1. Дизайн исследования

На первом этапе исследования был проведен анализ видового разнообразия микробиоты, выделенной из мокроты больных муковисцидозом в Самарской области. Отдельно проводилась оценка распространенности микроорганизмов, имеющих доказанное клиническое значение в развитии легочной патологии, в том числе неферментирующих грамотрицательных бактерий. Схема дизайна исследования приведена на рисунке 1.

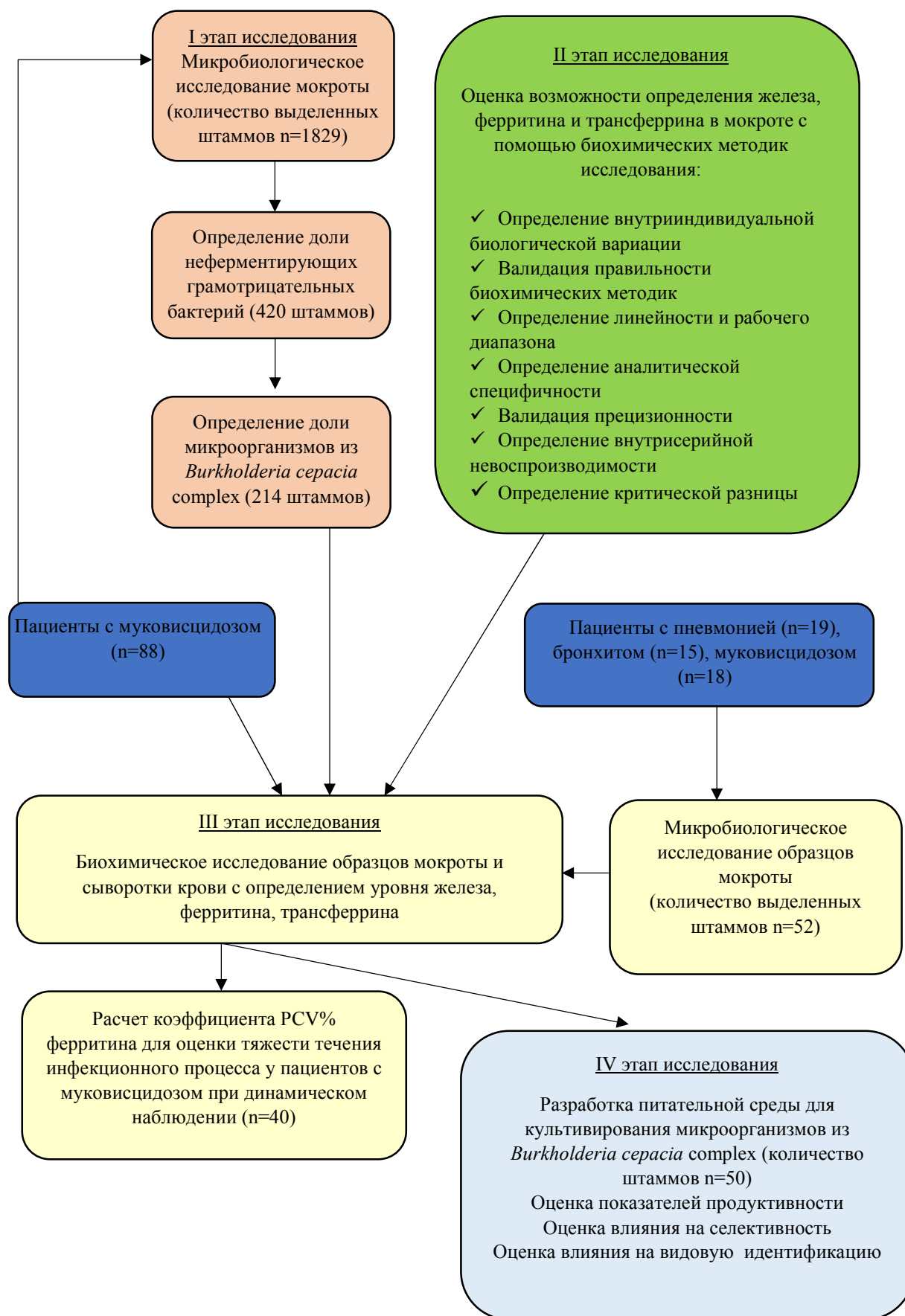


Рисунок 1 – Схема дизайна исследования

Второй этап исследования был посвящен проведению комплекса валидирующих мероприятий для биохимического исследования показателей обмена железа в мокроте с последующим определением коэффициента критической разницы (RCV%) для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении за изменением содержания данных аналитов в зависимости от состояния пациента.

На третьем этапе исследования был проведен биохимический анализ сыворотки крови и мокроты больных муковисцидозом, пневмонией и бронхитом с определением уровня железа и железосвязывающих белков. Дополнительно определена корреляция между микробиотой, выделенной из нижних дыхательных путей и показателями обмена железа в мокроте, а также с уровнем железа в сыворотке крови у пациентов с муковисцидозом. Определены критериальные значения коэффициента персональной разницы (PCV%) для ферритина в мокроте больных муковисцидозом в зависимости от течения инфекционного процесса.

На четвертом этапе исследования проводилась разработка селективной питательной среды с ростовой железосодержащей добавкой для повышения показателя продуктивности при культивировании микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex. Дополнительно оценены критерии селективности предлагаемой питательной среды и влияние железосодержащей добавки на результаты видовой идентификации с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

2.2. Сбор и подготовка к исследованию образцов мокроты

Сбор образцов мокроты проводился в соответствии с методическими указаниями 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». В целях соблюдения преаналитического этапа и исключения попадания в исследование образцов слюны проводилась предварительная микроскопическая оценка каждого поступившего в лабораторию образца мокроты. В соответствии с

руководством по лабораторным методам диагностики мокроту считают пригодной для проведения исследований, если в мазке, окрашенной по Граму при малом увеличении микроскопа (100×), обнаруживается более 25 лейкоцитов и менее 10 эпителиоцитов в поле зрения (А.А. Кишкун, 2009 г.).

После оценки качества поступившей мокроты проводился бактериологический посев, после чего отбиралась проба в количестве 5 мл и однократно замораживалась на 24 часа при температурном режиме -40°C. После размораживания в пробу вносился 1 мл раствора для обработки мокроты из набора РеалБест ДНК МВТС для выявления *Mycobacterium tuberculosis* complex (производитель АО «Вектор-Бест») с целью разжижения и гомогенизации материала. Далее исследуемый образец переносился в центрифужную пробирку и центрифугировался в режиме 1700 G в течение 5 минут. После этого из пробирки собирался супернатант и переносился в эппендорф, и проводилось повторное центрифугирование в режиме 4500 G в течение 5 минут. Далее супернатант повторно переносился в пробирку для последующего измерения показателей обмена железа на биохимическом анализаторе (Патент РФ № 2686052).

2.3. Методы проведения валидирующих мероприятий для биохимического исследования показателей обмена железа в мокроте

Проведение комплекса валидирующих мероприятий для последующего биохимического исследования железа и железосвязывающих белков в мокроте включало в себя определение соответствия критериям специфичности, линейности, прецизионности и правильности методик. За основу были взяты следующие нормативные документы:

1. Приказ № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»;
2. ГОСТ Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1

«Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях»;

3. ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»;

4. ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний».

5. CLSI EP5-A2. Evaluation Of Precision Performance Of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second edition (Оценка прецизионности количественных методов измерения; утвержденное руководство – второе издание);

6. CLSI EP-6A. Evaluation Of The Linearity Of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (Оценка линейности количественных процедур измерения: статистический подход; утвержденное руководство);

7. CLSI EP7-A2. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second edition (Тестирование интерференции в клинической химии; утвержденное руководство – второе издание);

8. CLSI EP15-A2. User Verification Of Performance For Precision And Trueness; Approved Guideline – Second Edition (Верификация пользователем прецизионности и правильности; утвержденное руководство – второе издание);

2.4. Сбор и подготовка к исследованию образцов сыворотки крови

Взятие образцов крови для исследования проводилось в утреннее время, натощак (последний прием пищи не позднее, чем за 12 часов до взятия), путем венопункции из локтевой вены. Для получения сыворотки взятие крови осуществлялось в вакуумные пробирки VACUETTE® с активатором свертывания крови и разделяющим гелем в объеме 3,5 мл с последующим центрифугированием в режиме 1200 G в течение 10 минут.

2.5. Биохимические методы исследования сыворотки крови и мокроты

Определение показателей обмена железа в мокроте и сыворотке крови проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400+ (Roche Diagnostics, Швейцария). Для выполнения исследований и проведения контроля качества также использовались коммерческие реактивы и наборы компании Roche Diagnostics (Швейцария).

Содержание железа определялось феррозиновым методом. В условиях кислой среды железо высвобождается из белков с последующим очищением детергентом. Аскорбиновая кислота восстанавливает ионы железа до двухвалентной формы, которые далее вступают в реакцию с феррозином и образуют окрашенные комплексы. Интенсивность формирования окрашенных комплексов прямо пропорциональна концентрации железа и определяется колориметрически при длине волны 552 нм.

Уровень ферритина в биологическом материале определялся с помощью иммунотурбидиметрического анализа с латексным усилением. Ферритин агглютинирует с частицами латекса, покрытыми антителами против ферритина. Далее преципитат измеряется турбидиметрически при длине волны 552 нм.

Для определения количества трансферрина также использовался иммунотурбидиметрический метод. Трансферрин образует комплекс со специфической антисывороткой, который определяется турбидиметрически при длине волны 340 нм.

2.6. Микробиологическое исследование мокроты

Для посева поступившей в лабораторию мокроты использовался метод секторных посевов на следующие плотные питательные среды: универсальная хромогенная среда (BioRad, США), 5% кровяной агар с бараньей кровью (HiMedia, Индия). Для культивирования дрожжеподобных и мицелиальных грибов применялся посев «в три точки» на агар Сабуро (HiMedia, Индия). При работе с материалом от пациентов с муковисцидозом

дополнительно проводился посев на селективную питательную среду *Burkholderia cepacia* selective agar (HiMedia, Индия) для выявления микроорганизмов из ВСС.

Все посеы инкубировались в течение 48 часов при аэробных условиях в термостате при температуре 37°C. При культивировании бактерий из ВСС применялась продленная инкубация 120 часов с ежедневным просмотром и оценкой роста.

Идентификация выросших колоний проводилась с помощью метода MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Все типы выросших колоний наносились на мишень прибора с последующим покрытием матрицей, в качестве которой использовалась α -циано-4-гидроксикоричная кислота. Далее мишень помещалась в прибор, где бактериальные клетки подвергались многократному воздействию лазерных импульсов, что приводило к высвобождению ионизации рибосомальных белков микроорганизмов, которые попадали во времяпролетный анализатор и двигались к детектору. Время пролета частиц оценивалось с помощью программного обеспечения прибора, которое преобразовывало полученную информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр), соответствующий отношению массы и заряда частиц в диапазоне от 2 000 Да до 20 000 Да. Масс-спектры, полученные при идентификации микроорганизмов, сравнивались с библиотекой, представляющую собой базу данных с референсными спектрами и на основании сходства белков и их массы происходила видовая идентификация микроорганизма. Одновременно проводилась оценка достоверности идентификации с применением программного обеспечения MALDI Biotyper RTC методом определения коэффициента совпадения (Score): если полученный Score соответствует диапазону от 0,000 до 1,699 результат идентификации рассматривается как низкодостоверный; Score от 1,700 до 1,999 свидетельствует о

высокодостоверной идентификации до рода; результат Score от 2,000 до 2,999 рассматривается как высокодостоверная идентификация до вида.

Идентификация мицелиальных грибов дополнительно проводилась по макро- и микроморфологическим признакам. При изучении макроморфологии выросших культур оценивались скорость роста, структура, цвет колонии и наличие на ее поверхности экссудата. Для изучения микроморфологических структур грибов применялся микроскопический метод. Для его проведения приготавливался препарат методом «раздавленная капля»: на предметное стекло наносили каплю жидкости, приготовленную из равных частей глицерина, этилового спирта и дистиллированной воды, в которую помещался кусочек колонии гриба, вырезанный скальпелем; далее препарат накрывался покровным стеклом и проводилась микроскопия при увеличении 100× и 400×. Дополнительно приготовленные препараты изучались методом люминесцентной микроскопии, путем добавления в них калькофлюора белого. Клеточные стенки грибов содержат полисахариды (хитин, целлюлоза), с которыми связывается краситель, что впоследствии проявляется свечением при микроскопии с использованием светофильтров.

2.7. Методы испытаний на повышение показателя продуктивности и селективность при разработке питательной среды для выделения

***Burkholderia cepacia* complex из клинического материала**

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

указаниями 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Для приготовления инокулюма были использованы контрольные штаммы Американской коллекции типовых культур (АТСС): *B.cerealis* АТСС 25416, *P.aeruginosa* АТСС 27853, *S.aureus* АТСС 6538, *E.coli* АТСС 25922, *E.faecalis* АТСС 29212.

Инокулюм приготавливался при помощи определения оптической плотности по стандарту МакФарланда с применением денситометра BioSan (Латвия). Исходная взвесь микроорганизмов соответствовала 0,5 по стандарту МакФарланда с количеством бактериальных клеток 10^8 КОЕ/мл и далее путем десятикратного разведения из нее приготавливался инокулюм с нужной концентрацией микроорганизмов. Алгоритм приготовления инокулюма с соответствующей концентрацией микроорганизмов представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Приготовление инокулюма с определенной концентрацией микроорганизмов

№ пробирки	Объем физиологического раствора	Объем переносимой суспензии	Количество микробных клеток в 1 мл взвеси	Количество микробных клеток в 0,1 мл взвеси
1	4,5 мл	0,5 мл из исходной взвеси 10^8 КОЕ/мл	10^7	1 000 000
2	4,5 мл	0,5 мл из пробирки №1	10^6	100 000
3	4,5 мл	0,5 мл из пробирки №2	10^5	10 000
4	4,5 мл	0,5 мл из пробирки №3	10^4	1 000

5	4,5 мл	0,5 мл из пробирки №4	10^3	100
---	--------	--------------------------	--------	-----

По результатам испытаний рассчитывался показатель продуктивности. Критерий селективности оценивался путем визуального осмотра и отсутствия роста нецелевых микроорганизмов на питательной среде.

2.8. Методы анализа белковых профилей *Burkholderia cepacia complex*

Белковые профили, полученные при проведении видовой идентификации микроорганизмов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии анализировались с использованием программного обеспечения flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Для оценки полученных масс-спектров применялся алгоритм детекции пиков Centroid. Порог сигнала к шуму был установлен на уровне 2. Порог относительной интенсивности – 0 %, минимальная интенсивность порога – 600 условных единиц, максимальное количество анализируемых пиков – 300. Для вычисления базовой линии использовался метод TopHat, сглаживание спектров проводилось по алгоритму SavitzkyGolay с массой 5 m/z за один цикл.

Визуализация результатов статистического протеомного сравнения полученных масс-спектров проводилась с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 Offline Classification (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

При проведении исследований анализ масс-спектров соответствовал официальным рекомендациям производителя MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

2.9. Методы статистической обработки полученных результатов

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2013, MedCalc (version 11.3.0) и StatTech (version 2.4.3, разработчик ООО "Статтех", Россия).

Анализ формы распределения исследованных показателей проводили с помощью визуальной оценки гистограмм распределения данных: оценивались показатели скошенности и крутизны, отражающие асимметрию распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Большинство из изученных показателей имели отличную от нормальной форму распределения, поэтому в дальнейшем применялись как параметрические, так и непараметрические методы анализа. В качестве описательных статистик использовались следующие показатели: среднее арифметическое (M) и его стандартная ошибка ($M \pm m$), медианы (Me) и квартили ($Q1-Q3$).

Сравнения групп выполняли с помощью непараметрического дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с последующими парными сравнениями по критерию Манна-Уитни-Вилкоксона.

Взаимосвязь между значениями PCV (personal change value) для ферритина в мокроте у пациентов с МВ с течением инфекционного процесса устанавливалась с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистическая значимость связи определялась исходя из уровня значимости p . При $p \leq 0,05$ связь считалась статистически значимой.

Для установления пороговых значений PCV для ферритина в мокроте у пациентов с муковисцидозом для определения риска обострения инфекционного процесса использовался ROC-анализ, а также были установлены уровни чувствительности и специфичности выбранных пороговых значений.

Для оценки различий в результатах продуктивности питательных сред с наличием и отсутствием ростовой добавкой для выделения микроорганизмов *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала использовали χ^2 критерий Пирсона. Если полученное значение критерия χ^2 было больше критического, делался вывод о наличии статистической взаимосвязи между определенной концентрацией ростовой добавки и показателем продуктивности среды при соответствующем уровне значимости.

ГЛАВА 3. ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

На сегодняшний день в ежегодно обновляющемся регистре больных муковисцидозом в Российской Федерации дана информация по федеральным округам о микробиологическом профиле респираторного тракта пациентов по основным возбудителям, имеющим клиническое значение: *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *B.cereacia* complex, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenzae* и *Achromobacter* spp. Однако, ввиду неучтенности в регистре данных по ряду других возбудителей с доказанным клиническим значением для пациентов с МВ, а также регулярному появлению информации о новых микроорганизмах, участвующих в инфекционно-воспалительном процессе в НДП, существуют данные о целесообразности ранжирования микроорганизмов по их клиническому значению [26]. В связи с этим было принято решение проанализировать видовое разнообразие микробиоты, выделенной из нижних дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом в Самарской области за 2017-2019 годы.

3.1. Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из мокроты у пациентов с муковисцидозом в Самарской области

В период с 2017 по 2019 годы было проведено 613 микробиологических исследований мокроты от 88 пациентов с муковисцидозом. У всех обследованных пациентов был выявлен рост микроорганизмов из материала. Всего было выделено и идентифицировано 1829 штаммов микроорганизмов, которые впоследствии были разделены на следующие группы согласно их клиническому значению:

1. К первой группе отнесены бактерии, имеющие доказанное клиническое значение в развитии легочной инфекции у пациентов с МВ и выделенные из

дыхательных путей в любом количестве: *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp.. Также к этой группе относятся *S.pneumoniae* и представители порядка *Enterobacterales*, в случае если они были выделены в монокультуре и титре $\geq 10^5$.

2. Вторую группу составили микроорганизмы, роль которых в развитии инфекционно-воспалительных осложнений в респираторном тракте больных МВ возможна, но не установлена ввиду недостаточного количества данных по наблюдению за пациентами во всем мире. К этой группе относятся остальные представители НФГОБ, а также микроорганизмы из *Nocardia* spp. и *Gordonia* spp.

3. *Staphylococcus* spp. (кроме *S.aureus*), *Streptococcus* spp. (кроме *S.pneumoniae*), *Neisseria* spp., *Rothia* spp., *Corynebacterium* spp., *Gemella* spp. и другие представители нормальной микробиоты слизистых оболочек и кожного покрова, а также бактерии, выделяемые из окружающей среды включены в третью группу микроорганизмов, не имеющих клинического значения в развитии легочной патологии у пациентов с МВ. Грибы были выделены в отдельную группу.

Бактерии, не имеющие клинического значения, оказались доминирующей группой, представленной 1060 штаммами и 58% в общей структуре выделенных микроорганизмов. К этой же группе были отнесены 37 штаммов *S.pneumoniae* и 80 штаммов представителей порядка *Enterobacterales*, так как данные микроорганизмы были выделены в титрах 10^2 - 10^4 КОЕ в различных ассоциациях с бактериями других родов, что является сомнительным критерием их участия в инфекционно-воспалительном процессе. Однако, 9 штаммов *S.pneumoniae* и 17 штаммов бактерий порядка *Enterobacterales* были выделены в двухкомпонентных ассоциациях с представителями нормальной микробиоты слизистых оболочек, в количестве 10^5 - 10^6 , что позволяет говорить о незначительной контаминации пробы при сборе материала пациентом, поэтому нельзя

исключать причастность данных микроорганизмов к развитию воспаления. В остальных случаях были выявлены многокомпонентные ассоциации представителей нормальной микробиоты слизистых оболочек и кожного покрова, а также сапрофитных микроорганизмов окружающей среды в различных титрах, что может говорить о необходимости контроля соблюдения преаналитического этапа и оценке поступившего материала – зачастую в лаборатории поступает не мокрота, а ротовая жидкость или носоглоточное отделяемое. Особенно с учетом того, что авторы многих исследований не рекомендуют проводить микроскопию мокроты перед исследованием от пациентов с МВ для оценки качества ее сбора [26].

Общее количество штаммов микроорганизмов представителей разных групп за все время исследования представлено на рисунке 2.

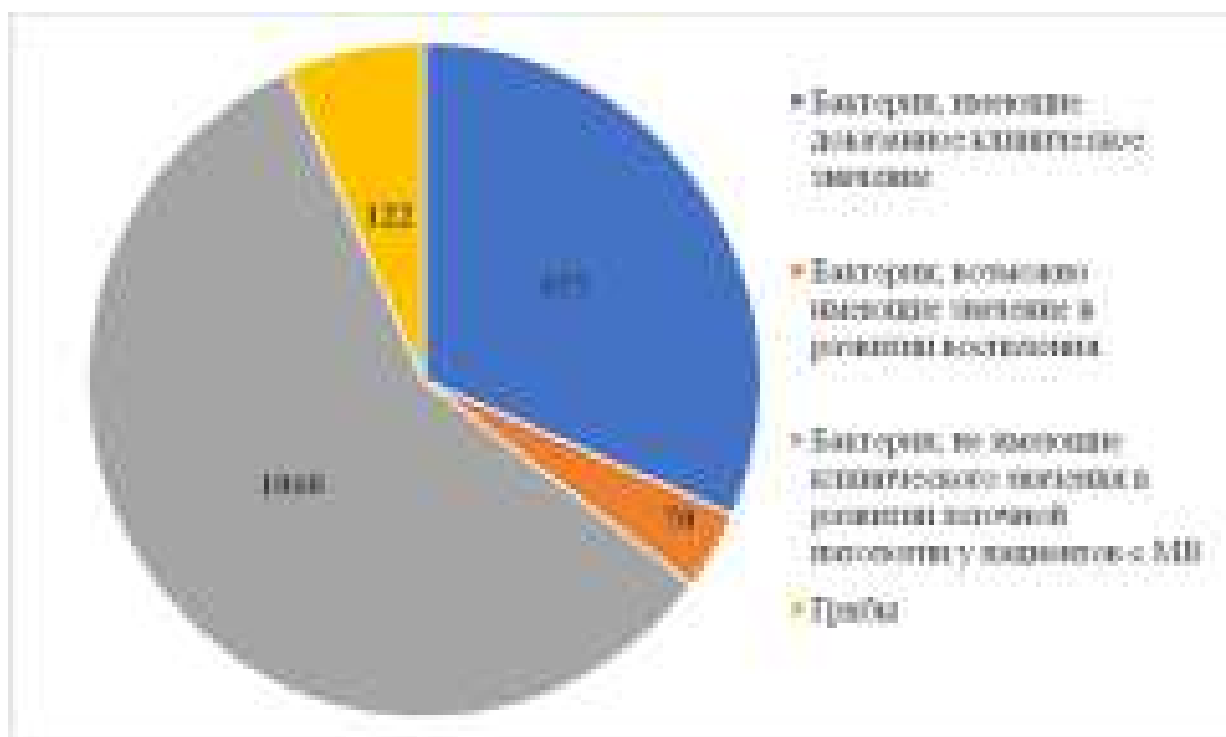


Рисунок 2 – Видовое разнообразие микробиоты, выделенной из мокроты у пациентов с муковисцидозом в Самарской области за 2017-2019 годы, по группам в соответствии с их клинической значимостью в абсолютных значениях

Видовой состав и разнообразие микроорганизмов третьей группы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Видовой состав бактерий, не имеющих доказанного клинического значения, выделенных из мокроты от пациентов с муковисцидозом в Самарской области за 2017-2019 годы.

Род микроорганизма	Количество		Вид микроорганизма	Количество	
	Абс	%*		Абс	%**
<i>Streptococcus</i> spp.	619	58,4	<i>S. oralis</i>	169	27,3
			<i>S. vestibularis</i>	178	28,8
			<i>S. salivarius</i>	128	20,7
			<i>S. parasanguinis</i>	46	7,4
			<i>S. mitis</i>	80	12,9
			<i>S. pseudopneumoniae</i>	1	0,2
			<i>S. agalactiae</i>	5	0,8
			<i>S. anginosus</i>	12	1,9
			<i>S. pneumoniae***</i>	37	6,0
<i>Neisseria</i> spp.	150	14,15	<i>N. subflava</i>	100	66,7
			<i>N. flavescens</i>	41	27,3
			<i>N. perflava</i>	3	2,0
			<i>N. mucosa</i>	6	4,0
<i>Haemophilus</i> spp.	6	0,57	<i>H. parainfluenzae</i>	4	66,7
			<i>H. parahaemolyticus</i>	2	33,3
<i>Lactococcus</i> spp.	1	0,09	<i>L. lactis</i>	1	100,0
<i>Corynebacterium</i> spp.	6	0,57	<i>C. striatum</i>	4	66,7
			<i>C. propinquum</i>	2	33,3
<i>Granulicatella</i> spp.	3	0,28	<i>G. adiacens</i>	3	100,0
<i>Gemella</i> spp.	8	0,75	<i>G. sanguinis</i>	5	62,5
			<i>G. haemolysans</i>	3	37,5
<i>Actinomyces</i> spp.	2	0,19	<i>A. oris</i>	2	100,0
<i>Rothia</i> spp.	112	10,57	<i>R. mucilaginosa</i>	106	94,6

			<i>R. dentocariosa</i>	6	5,4
<i>Staphylococcus</i> spp.	53	5	<i>S.epidermidis</i>	26	49,1
			<i>S.haemolyticus</i>	10	18,9
			<i>S.hominis</i>	10	18,9
			<i>S. capitis</i>	3	5,7
			<i>S.warneri</i>	4	7,6
<i>Lactobacillus</i> spp.	14	1,32	<i>L.paracasei</i>	7	50,0
			<i>L.plantarum</i>	4	28,6
			<i>L.fermentum</i>	2	14,3
			<i>L.rhamnosus</i>	1	7,1
Представители порядка <i>Enterobacteriales</i> ***					
<i>Escherichia</i> spp.	30	2,83	<i>E. coli</i>	30	100,0
<i>Klebsiella</i> spp.	21	1,98	<i>K.pneumoniae</i>	13	62,0
			<i>K. oxytoca</i>	7	33,3
			<i>K. variicola</i>	1	4,8
<i>Enterobacter</i> spp.	35	3,3	<i>E.cloacae</i>	33	94,3
			<i>E. kobei</i>	2	5,7
			<i>E. asburiae</i>	4	11,4
Всего	1060	100,0			
*Доля в видовом разнообразии микроорганизмов, не имеющих доказанного клинического значения для пациентов с МВ.					
**Доля от числа микроорганизмов в подгруппе.					
***Бактерии отнесены к группе не имеющих клинического значения, так как были выделены в ассоциациях с микроорганизмами других родов					

Кроме сапрофитной и нормальной микрофлоры у пациентов с МВ в исследовании были выделены бактерии, имеющие доказанное клиническое значение для пациентов с МВ – 577 штаммов (31,5% в общей структуре выделенных микроорганизмов). В данной группе преобладающим является

вид *S.aureus*, что сопоставимо с данными регистра больных муковисцидозом в РФ [24]. Выявлено 223 штамма *S.aureus*, что составляет долю 38,6% среди клинически значимых патогенов и 12,2% в общей структуре микроорганизмов. Из литературных источников хорошо известно, что данный вид обычно первым инфицирует респираторный тракт пациентов с МВ еще в раннем детском возрасте и по мере взросления зачастую либо сменяется на более агрессивную грамотрицательную флору, либо сохраняется с ней в ассоциации [25]. Следует отметить, что в нашем исследовании не было выявлено метициллин-резистентных изолятов *S.aureus* (MRSA), что является эпидемиологически благоприятным фактором для региона.

На втором месте по частоте выделения в группе бактерий, имеющих доказанное клиническое значение, были бактерии из ВСС, составив 37,1% в данной группе, и представленные 214 штаммами, что в целом составило 11,7% от общего числа микроорганизмов.

На третьем месте по частоте встречаемости был также важный с точки зрения формирования хронической инфекции в НДП у пациентов с МВ микроорганизм – *P.aeruginosa*, его количество составило 109 штаммов и 6% среди общего числа микроорганизмов, а также 18,9% в группе бактерий, имеющих доказанное клиническое значение.

Stenotrophomonas maltophilia, *Achromobacter xylosoxidans* и *Haemophilus influenzae* были представлены 20, 7 и 4 штаммами соответственно, что в совокупности составило 5,4% в группе микроорганизмов, имеющих доказанное клиническое значение и 1,7% в общей структуре.

Бактерии, значение в воспалительном процессе которых однозначно не определено составили меньшую по количеству группу – 70 штаммов или 3,8% от общего числа выявленных микроорганизмов. Все представители данной группы являлись представителями различных родов НФГОБ.

Грибы, выделенные в отдельную группу, составили долю в 6,7% в общей структуре микроорганизмов и были представлены 122 штаммами. В

данной группе доминирующими оказались представители рода *Candida*, их количество составило 115. Ожидаемо, по частоте встречаемости на первом месте был вид *Candida albicans*, представленный 103 штаммами. Третье место были идентифицированы виды *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr* и единично выделены *Candida blankii*, *Candida lusitanae* и *Candida krusei*. Дрожжеподобные грибы рода *Candida* не имеют доказанного клинического значения для пациентов с муковисцидозом, однако необходимо уделять внимание редко встречаемым видам, особенно при хронический высевах из материала от одного пациента с целью накопления информации об их значимости в инфекционно-воспалительном процессе.

Помимо дрожжеподобных грибов из *Candida* spp. также были идентифицированы мицелиальные грибы, представленные родом *Aspergillus*. *Aspergillus fumigatus* был выявлен чаще других – в 4 случаях, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* и *Aspergillus flavus* выделены из мокроты по одному разу. Согласно рекомендациям национального консенсуса, хроническое выявление грибов рода *Aspergillus* в 50 и более процентах образцов мокроты в течение 6 и более месяцев одного года при отсутствии инструментальных признаков ухудшения легочной функции свидетельствует о колонизации дыхательных путей больных МВ, в остальных случаях можно говорить о явлении транзитного носительства [20]. При этом в настоящее время отсутствуют доказательства отрицательного влияния колонизации различными представителями *Aspergillus* spp. дыхательных путей на легочную функцию пациентов с МВ, поэтому в подобных случаях показаний для назначения противогрибковой терапии нет. Однако, при выявлении колонизации респираторного тракта микромицетами из *Aspergillus* spp. больным МВ необходимо обязательно проводить дополнительную диагностику с целью исключения нередко развивающихся осложнений, таких как аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА), хронический аспергиллез легких и инвазивный аспергиллез. Без лечения данные состояния

приводят к необратимой дыхательной недостаточности, ухудшению качества жизни пациентов с МВ и увеличению летальности [2, 20].

Таким образом, в видовом разнообразии микробиоты, выделенной из мокроты у пациентов с муковисцидозом в Самарской области за 2017-2019 годы преобладали микроорганизмы, не имеющие доказанного клинического значения в развитии легочной инфекции, представленные 1060 штаммами бактерий и 122 штаммами грибов, что в совокупности составило долю в 64,6% от общего числа выделенных микроорганизмов. Все они являются представителями нормальной микробиоты слизистых оболочек верхних дыхательных путей, что свидетельствует, по-видимому, о контаминации мокроты в процессе её сбора. Бактерии, имеющие доказанное клиническое значение, составили группу в 577 штаммов или 31,5% от общего числа микроорганизмов, что является значимым показателем для региона. Группу бактерий, возможно имеющих значение в развитии инфекционно-воспалительного процесса, составили 70 штаммов различных родов НФГОБ. Представителей *Nocardia* spp. и *Gordonia* spp. выявлено не было.

3.2. Видовое разнообразие неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных из нижних дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом

Микроорганизмы из группы НФГОБ являются наиболее значимыми для больных МВ [44, 73, 104, 122]. В нашем исследовании было выделено и идентифицировано 420 штаммов НФГОБ, что составило 23% от общего числа микроорганизмов. В свою очередь среди НФГОБ преобладали бактерии из *Burkholderia cepacia* complex, составив половину от общего числа микроорганизмов данной группы – 214 штаммов (51%), среди которых было идентифицировано 4 штамма с мукоидными свойствами. Вторыми по частоте встречаемости среди НФГОБ оказались бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa*, их количество составило 109 штаммов (25,8%), среди которых 19

являлись штаммами мукоидного типа. Также не было выявлено штаммов, резистентных к полимиксину. Как мы видим, из всех выявленных НФГОБ более 75% штаммов являются первостепенными по клинической значимости микроорганизмами для больных МВ. Еще одни представители НФГОБ, имеющие доказанное клиническое значение при выделении из легких больных МВ – *Stenotrophomonas maltophilia* и *Achromobacter xylosoxidans*, были представлены 20 и 7 штаммами соответственно. Последнее время все больше работ предоставляется отечественными и зарубежными учеными о значении данных микроорганизмов в воспалительных процессах и снижении функции дыхания у пациентов с МВ, а также сложностях их эрадикации ввиду природной резистентности к ряду антибиотиков.

Бактерии рода *Acinetobacter* были представлены 40 штаммами и составили большую часть среди НФГОБ, роль которых в развитии легочной патологии пациентов с МВ пока не установлена. Были выявлены следующие виды *Acinetobacter* spp.: 10 штаммов *A.junii*, по 7 штаммов *A.pittii* и *A.baumannii*, 6 штаммов *A.bereziniae*, и по 5 штаммов *A.lwoffii* и *A.ursungii*. Оставшуюся часть НФГОБ составили 11 штаммов рода *Chryseobacterium*, 7 из которых были идентифицированы как *Chryseobacterium indologenes*, 4 – как *Chryseobacterium gleum*, 10 штаммов *Pseudomonas* spp.: 6 штаммов *Pseudomonas putida*, 3 штамма *Pseudomonas monteilii* и 1 штамм *Pseudomonas fragi*, а также единичные штаммы представителей других родов: *Brevundimonas diminuta*, *Elizabethkingia miricola*, *Sphingobacterium multivorum*, *Delftia acidovorans*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Comamonas kerstersii*. Видовой состав представителей НФГОБ, выделенных за период исследования представлен на рисунке 3.

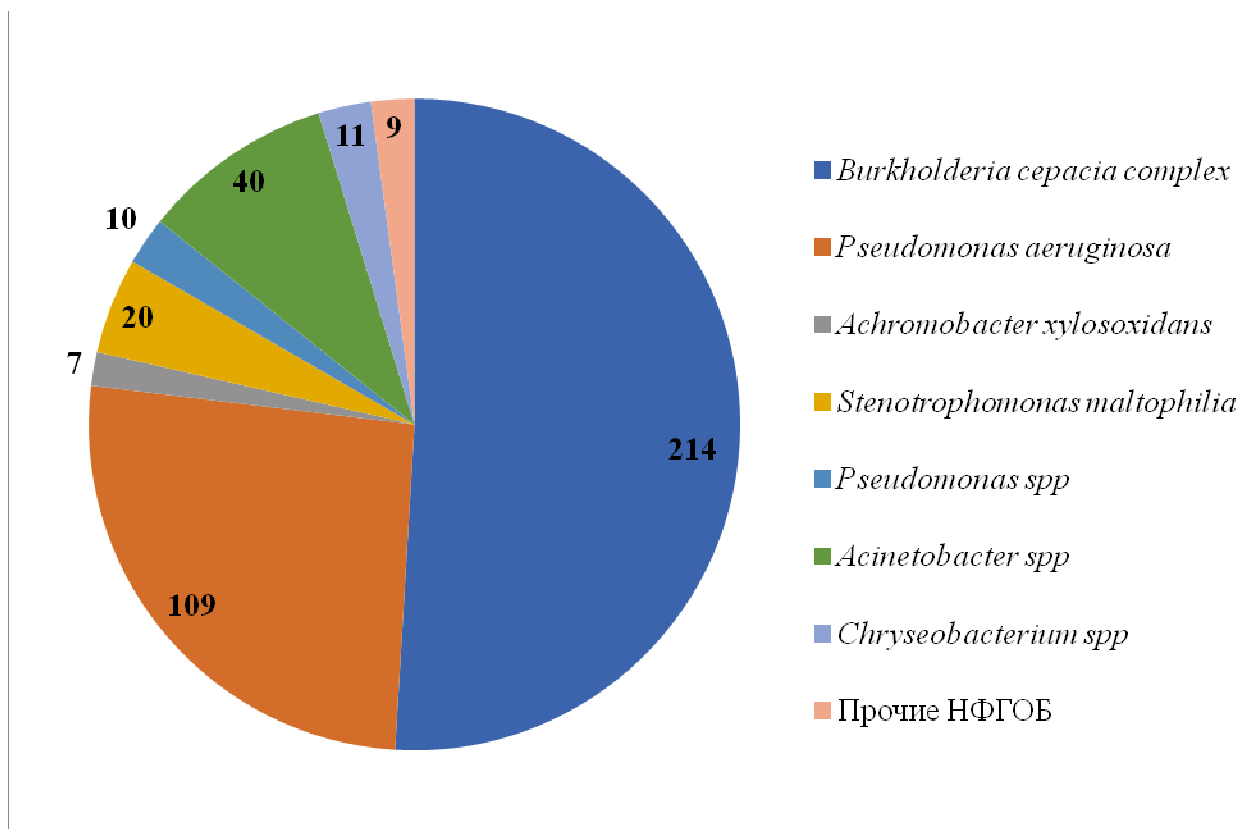


Рисунок 3 – Видовой состав неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных из мокроты от пациентов с муковисцидозом в Самарской области за 2017-2019 годы в абсолютных значениях

В результате, в структуре НФГОБ отмечается доминирование клинически значимых для пациентов с МВ микроорганизмов, количество которых составило 350 штаммов, или 83,3% в данной группе, при этом лидирующие позиции заняли представляющие угрозу для жизни пациентов бактерии из ВСС и синегнойная палочка.

Выявление вышеприведенных микроорганизмов в таких количествах позволяют поднимать вопрос о необходимости фиксирования ежегодных данных в регистре больных муковисцидозом в Российской Федерации отдельно по каждому региону, как это практиковалось до 2015 года [23]. Это необходимо для мониторинга структуры микробиоты и полноценного представления эпидемиологической ситуации в конкретном субъекте страны. Количество НФГОБ, роль которых в развитии инфекционно-воспалительного

процесса легких у больных МВ на сегодняшний день остается сомнительной, составило 70 штаммов. Выделение и точная видовая идентификация бактерий данной группы, по нашему мнению, у больных МВ является обязательной, так как нельзя исключить приобретения ими возможного патогенного потенциала в будущем, как это случилось с бактериями из ВСС, а накопленная информация об их распространенности, антибиотикорезистентности, фенотипической изменчивости может помочь в борьбе с инфекционными осложнениями.

3.3. Распространенность бактерий, имеющих доказанное клиническое значение в развитии легочной патологии среди пациентов с муковисцидозом в Самарской области

Микробиологическое обследование пациентов с МВ существенно отличается от работы с материалом от пациентов с другими нозологиями. Важными являются не только своевременная и точная видовая идентификация возбудителей, но и регулярность обследований, выявление транзиторного носительства, хронической и интермиттирующей инфекции, межвидовых ассоциаций и фенотипической изменчивости.

Среди бактерий, имеющих доказанное клиническое значение *Staphylococcus aureus* выделялся наиболее часто (223 штамма) и был выявлен у 62 пациентов (70,5% от общего числа обследованных). У 47 пациентов отмечен хронический высева *S.aureus* от 3 и более случаев, у 5 пациентов был выделен двукратно, у 12 пациентов отмечены единичные случаи высева. За время исследования не было выявлено случаев высева *S.aureus* в монокультуре, отмечены двух- и более компонентные ассоциации с другими видами. У большинства пациентов (49 обследуемых) со *S.aureus* были выявлены ассоциации с представителями нормальной орофарингеальной флоры и грибами рода *Candida*.

Нужно отметить, что отдельное внимание необходимо оказывать пациентам со случаями хронического высева НФГОБ, имеющих доказанное

клиническое значение, таких как *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, так как именно данный спектр микроорганизмов является основной причиной длительного хронического воспалительного процесса в легких и снижения функции дыхания у пациентов с МВ. Согласно модифицированному критерию (Leeds criteria), принятому в городе Лидс (Великобритания), пациент считается хронически инфицированным грамотрицательными микроорганизмами, если результат 50% посевов мокроты в течение последних 12 месяцев будет положительным [20, 71].

Среди обследованных пациентов у 36 выделялась *Pseudomonas aeruginosa*, при этом у 23 отмечался хронический высев. У 2 пациентов с хронической синегнойной инфекцией дважды выявлялась единовременная ассоциация немуроидного штамма с мукоидным, высев которого носил интермиттирующий характер. Лишь у 3 пациентов синегнойная палочка выделялась из мокроты в монокультуре. Наиболее часто встречались ассоциации с *Staphylococcus aureus* и представителями нормальной микробиоты слизистых оболочек – 16 и 11 случаев соответственно. У 8 пациентов наблюдалась ассоциация с бактериями из ВСС. Также были выявлены единичные ассоциации с *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Aspergillus fumigatus*. Во всех остальных случаях наблюдались многокомпонентные ассоциации с 3 и более микроорганизмами различных родов.

Бактерии из ВСС были выделены у 33 пациентов (37,5% от общего числа обследованных), что является эпидемиологически значимым показателем для региона. В период исследования отличалась кратность обследования пациентов, у которых выявлялись бактерии из ВСС: 5 пациентов сдавали мокроту менее трех раз, 10 пациентов обследовались трехкратно, 11 пациентов обследовались шестикратно раз, мокрота от 6 пациентов поступала в лабораторию 9 раз и 1 пациент обследовался 13 раз.

Всего за период исследования было выделено и идентифицировано 214 штаммов из ВСС. В 36 случаях было выявлено 2 морфотипа микроорганизмов из материала от одного пациента. В большинстве случаев микроорганизмы из ВСС состояли в ассоциациях с представителями других родов: 181 штамм или 84,6% состояли в двух-, трех- и многокомпонентных ассоциациях. Также у одной пациентки в 4 случаях был выявлен мукоидный штамм в двухкомпонентной ассоциации с немучоидным. В 35 случаях наблюдались ассоциации бактерий из ВСС с двумя и более микроорганизмами из разных родов, включая микроорганизмы из групп с доказанным и сомнительным значениями для пациентов с МВ, что позволяет поднимать вопрос: какой именно из выделенных возбудителей может являться причиной потенциального обострения в легких? Также у пациентов с длительным хроническим инфицированием отмечалась тенденция к диссоциации бактерий из ВСС на 2 морфотипа, которые впоследствии становятся истинно доминирующими возбудителями, реже выделяясь в ассоциациях с представителями других родов. Различные ассоциации бактерий из ВСС представлены на рисунке 4.

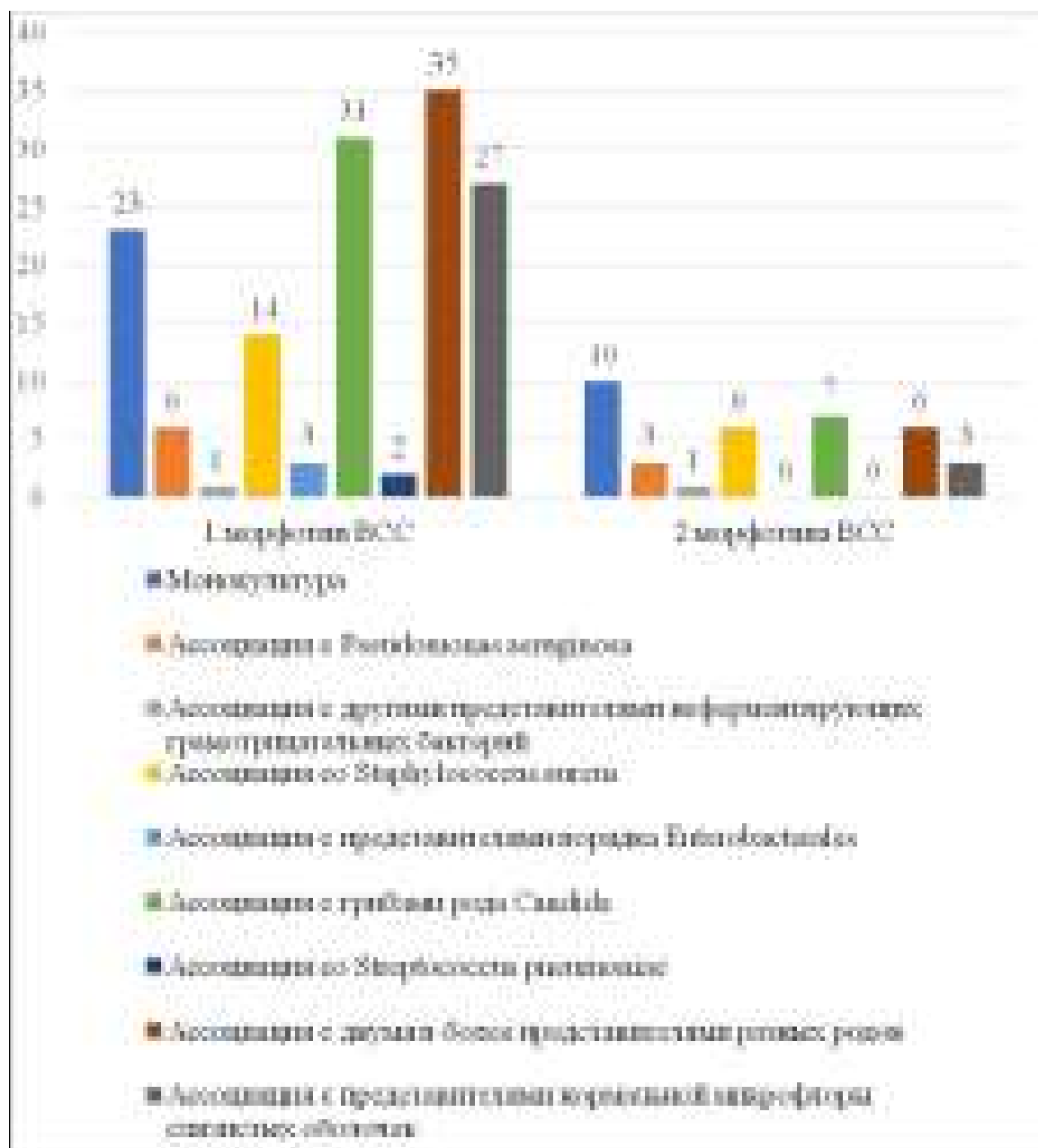


Рисунок 4 – Ассоциации бактерий из *Burkholderia cepacia* complex с микроорганизмами других родов в абсолютных значениях

В связи со значительным преобладанием выделенных ВСС в ассоциациях был проведен анализ скорости роста данной группы микроорганизмов в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующей микробиоты, результаты которого представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сроки появления роста *Burkholderia cepacia* complex при посеве клинического материала.

Показатель	Категории	Сутки			p
		Me	Q ₁ – Q ₃	n	
Вариант роста	Монокультура	4	3 – 5	33	0,139
	Ассоциации	4	3 – 5	145	

Полученные данные позволяют сделать предположение об отсутствии значительного влияния сопутствующей микробиоты на скорость роста штаммов ВСС, выделенных от пациентов с МВ. Данный факт актуализирует поиск других причин замедленного роста наиболее значимого патогена с точки зрения развития фатальных инфекционных осложнений в данной группе пациентов.

Нормативными документами определено, что практически с самого рождения пациенты с МВ должны регулярно, не менее 4 раз в год, проходить микробиологическое обследование для выявления возможных патогенов, дебютного инфицирования эпидемиологически значимыми штаммами и своевременной коррекции антибиотикотерапии [20, 26]. Несомненно, бактериологический посев мокроты дает возможность выделить и идентифицировать возбудителя, определить его количество и оценить чувствительность к антибактериальным препаратам, однако данный вид исследования не позволяет точно говорить о выделенном микроорганизме как о причине ухудшения состояния пациента и оценить тяжесть течения инфекционно-воспалительного процесса в нижних дыхательных путях, оставляя без ответа целый ряд вопросов, возникающих у врача-клинициста: связано ли текущее обострение с выделенным микроорганизмом? Так как существует целый ряд инфекционных агентов вирусной, грибковой и альтернативной неферментирующим грамотрицательным микроорганизмам бактериальной этиологии, способных вызвать воспаление в дыхательных

путях пациента. Ожидать ли тяжелых осложнений? Например, при развитии «серасiа syndrome», приводящего к летальному исходу за несколько дней временной ресурс может быть критически важным для пациента, а микробиологическое исследование, даже при использовании современных методов диагностики и участия опытных врачей-бактериологов может продолжаться от трех до семи дней. Можно ли говорить о том, что пик обострения пройден и состояние пациента стабилизируется? Все же симптоматической картины и инструментальных методов исследования может быть недостаточно для оценки состояния НДП. Таким образом, возникает проблема поиска маркеров и предикторов осложнений, вызванных НФГОБ в респираторном тракте пациентов больных муковисцидозом, исследование которых будет доступно, краткосрочно, и, желательно, без проведения инвазивных манипуляций. Возможным субстратом для исследования в достижении данных задач может послужить мокрота и методы ее биохимического исследования.

ГЛАВА 4. ПРОВЕДЕНИЕ ВАЛИДИРУЮЩИХ МЕРОПРИЯТИЙ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА В МОКРОТЕ

Исследование нового биологического субстрата в лабораторной диагностике требует обязательного проведения стандартизации используемых методов для гарантии достоверности получаемых результатов. В нашем исследовании использовались лабораторные методы биохимического анализа с определением содержания железа, ферритина и трансферрина в мокроте от пациентов с МВ, что требовало предварительного проведения комплекса валидирующих мероприятий, необходимых для оценки приемлемости проведения биохимического исследования мокроты на анализаторах, предназначенных для другого биологического материала.

Валидацию используемых методик проводили в соответствии со следующими нормативными документами:

1. Приказ № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»;
2. ГОСТ Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях»;
3. ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»;
4. ГОСТ Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний».
5. CLSI EP5-A2. Evaluation Of Precision Performance Of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second edition (Оценка

прецизионности количественных методов измерения; утвержденное руководство – второе издание);

6. CLSI EP-6A. Evaluation Of The Linearity Of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (Оценка линейности количественных процедур измерения: статистический подход; утвержденное руководство);

7. CLSI EP7-A2. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second edition (Тестирование интерференции в клинической химии; утвержденное руководство – второе издание);

8. CLSI EP15-A2. User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline – Second Edition (Верификация пользователем прецизионности и правильности; утвержденное руководство – второе издание).

4.1. Определение внутрииндивидуальной биологической вариации содержания железа и железосвязывающих белков в мокроте

В течение одного временного периода один и тот же показатель у одного пациента может значительно изменяться ввиду различных причин – характер питания, возраст, физическая активность, вредные привычки, процедурный стресс и прочее. Содержания любого аналита непостоянно и может меняться в большую или меньшую сторону, совершая колебания относительно «гомеостатической точки» (индивидуальное значение средней величины), однако размах колебаний у здоровых людей всегда будет примерно одинаков [4]. По этой причине перед проведением валидирующих мероприятий необходимо определить внутрииндивидуальную биологическую вариацию (intra-individual biological variation) и рассчитать коэффициент внутрииндивидуальной вариации содержания железа, ферритина и трансферрина в мокроте.

Ввиду того, что мокрота является патологическим секретом и в отсутствии раздражающих факторов её отхождения не происходит, нами

было принято решение провести расчет биологической вариации по результатам обследования клинически здоровой группы курильщиков. В данную группу вошли 10 мужчин в возрасте от 20 до 35 лет со стажем курения от 5 лет, ежедневно выкуривающие от 15 до 25 сигарет. Критериями включения были ежедневное отхождение небольшого количества мокроты слизистого характера и следующие показатели спирометрии: форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) $>80\%$, объем форсированного выдоха за первую секунду манёвра форсированного выдоха (ОФВ₁) $>75\%$. Критериями исключения стали наличие острых и хронических болезней органов дыхания и сердечно-сосудистой системы, прием антибактериальных препаратов, а также выявление бактериального компонента в мокроте при проведении микробиологического исследования. Обследуемые сдавали мокроту ежедневно, в течение пяти дней.

Первоначально, для оценки стабильности и изменчивости показателей обмена железа в мокроте проводилась их статистическая обработка. На рисунках 5-7 представлены медиана и межквартильный размах показателя железа, ферритина, трансферрина.

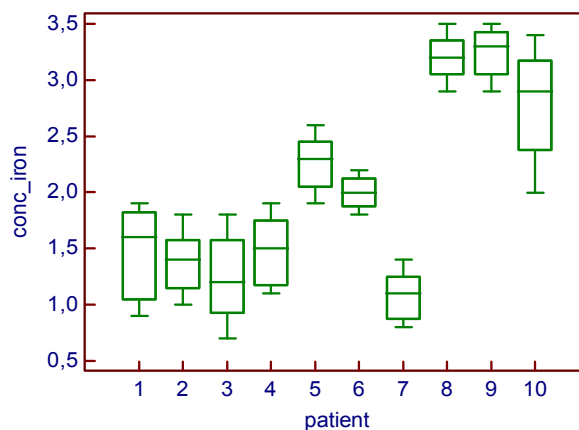


Рисунок 5 – Среднее значение и межквартильный размах железа в мокроте

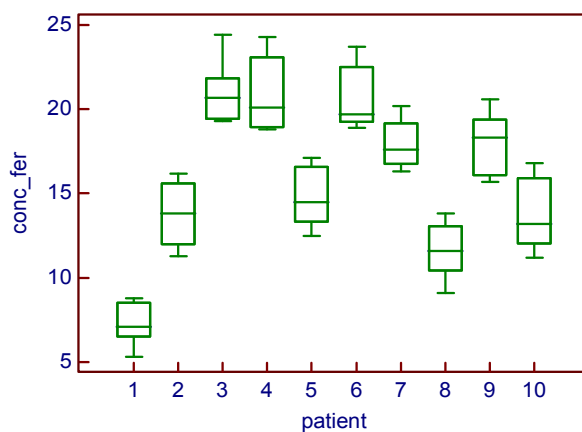


Рисунок 6 – Среднее значение и межквартильный размах ферритина в мокроте

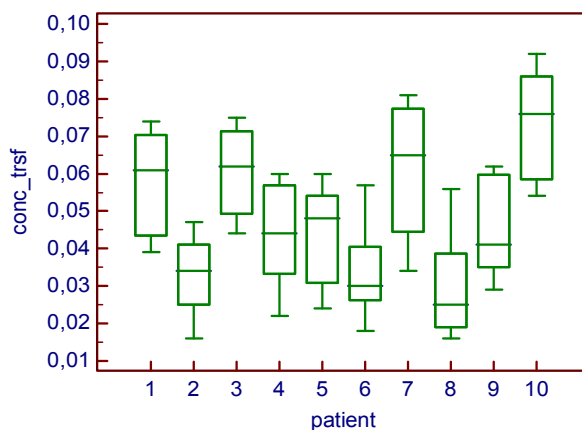


Рисунок 7 – Среднее значение и межквартильный размах трансферрина в мокроте

Также был определен разброс значений показателей железа, ферритина, трансферрина в мокроте (Рисунки 8-10).

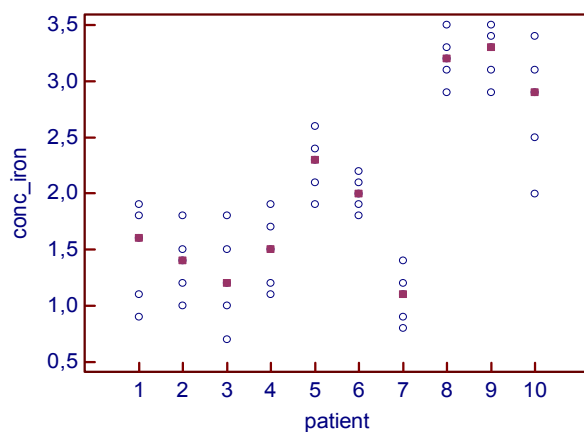


Рисунок 8 – Разброс значений показателей железа в мокроте

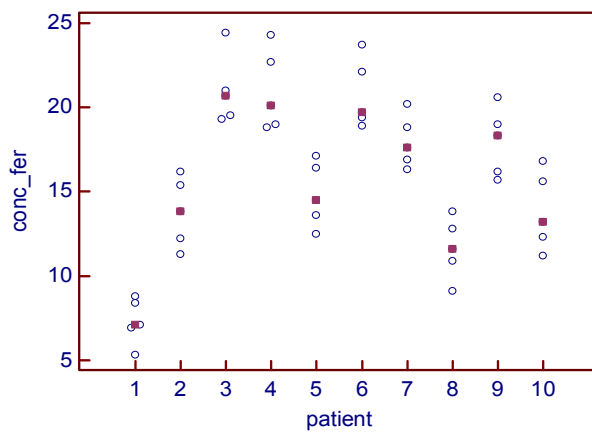


Рисунок 9 – Разброс значений показателей ферритина в мокроте

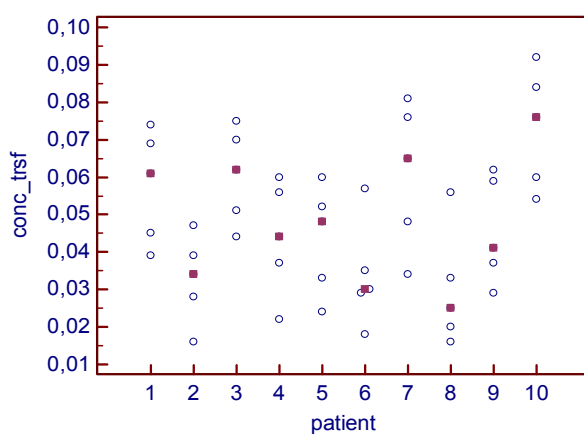


Рисунок 10 – Разброс значений показателей трансферрина в мокроте

Полученные статистические значения позволили определить коэффициент внутрииндивидуальной вариации, который рассчитывался по формуле:

$$CV_i = \frac{\sqrt{MS \text{ within groups}}}{\text{mean}}$$

где: CV_i – коэффициент внутрииндивидуальной вариации (в %);

MS within groups – среднеквадратичное отклонение индивидуального наблюдения от индивидуального среднего;

mean – среднее значение показателя.

Рассчитанные коэффициенты внутрииндивидуальной вариации характеризуют разброс (колебания) значений определяемых аналитов в пробах, взятых от одного и того же пациента в разное время. В таблице 4 представлены результаты статистической обработки полученных данных по уровню железа, ферритина и трансферрина в мокроте и рассчитанный по ним коэффициент внутрииндивидуальной вариации.

Таблица 4 – Расчет коэффициента внутрииндивидуальной вариации показателей обмена железа в мокроте

Показатели	MS within groups	Mean	CV _i %
Железо	0,114	2,012	16,8
Ферритин	3,93	16	12,4
Трансферрин	0,000063	0,0518	15,3

Полученные коэффициенты внутрииндивидуальной вариации позволяют рассчитать общую аналитическую ошибку, что необходимо для дальнейшей валидации биохимических методик определения показателей обмена железа в мокроте.

4.2. Валидация правильности биохимических методик исследования показателей обмена железа в мокроте (расчет общей аналитической ошибки)

Валидация правильности биохимических методик по определению содержания в мокроте железа, ферритина и трансферрина проводилась на основе алгоритмов протокола CLSI EP15-A2. В соответствии с протоколом было проведено тестирование 20 проб валидируемым нами методом по каждому из исследуемых параметров, содержание которых входило в рабочий диапазон метода. Параллельно с этим, в этих же пробах проводили измерение показателей обмена железа используя методы сравнения: железо определялось спектрофотометрическим методом реакции с хромазуолом В (производитель «Chema Diagnostica», Италия), ферритин с помощью иммуноферментной тест-системы «Ферритин-ИФА-БЕСТ» (производитель АО «Вектор-Бест», Россия), трансферрин с помощью тест-системы «NS-Plus» (производитель Alfresa Pharma Corporation, Япония). Далее была рассчитана разница между парными результатами тестирования и построен график различий для каждого из показателей: на оси X отображены результаты, полученные при помощи метода сравнения, на оси Y – полученная разница (Рисунки 11-13).



Рисунок 11 – График различий по полученным концентрациям железа в мокроте между валидируемым методом и методом сравнения

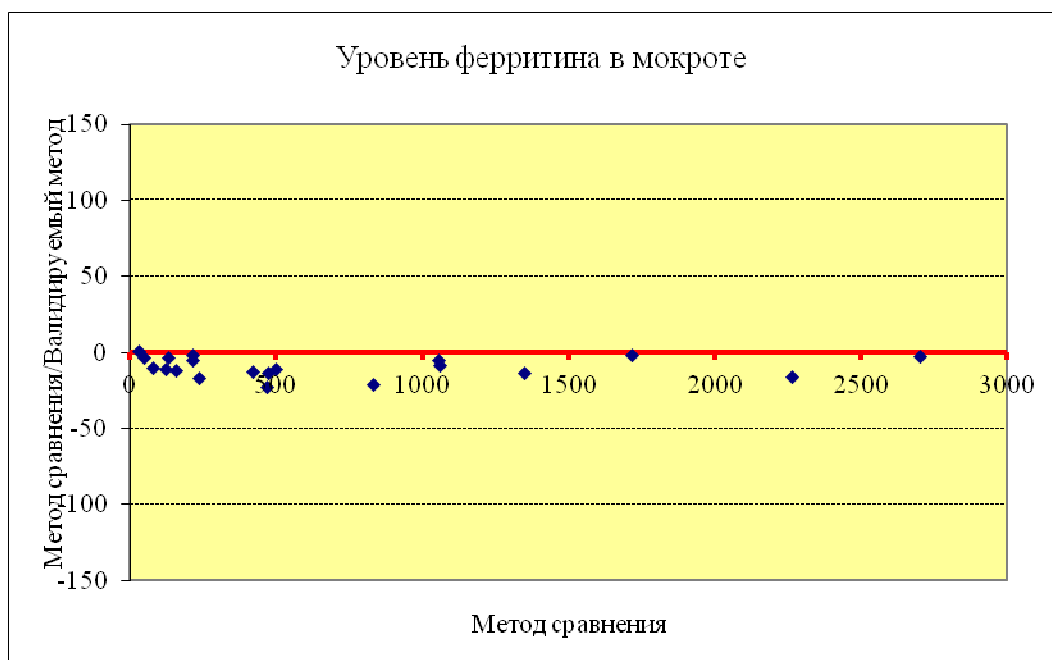


Рисунок 12 – График различий по полученным концентрациям ферритина в мокроте между валидируемым методом и методом сравнения

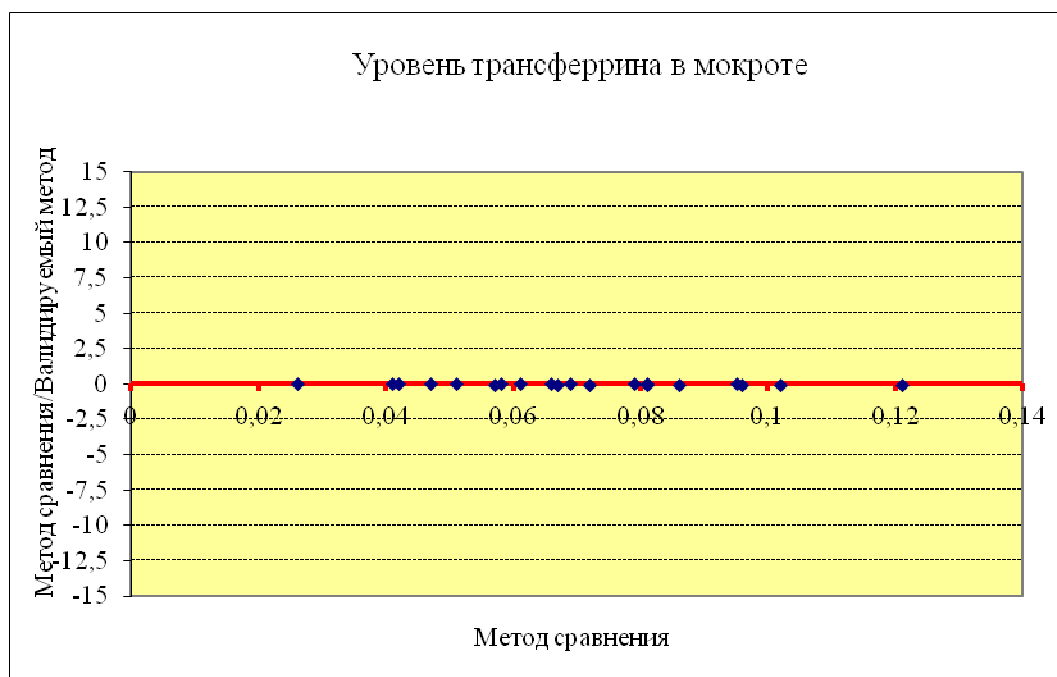


Рисунок 13 – График различий по полученным концентрациям трансферрина в мокроте между валидируемым методом и методом сравнения

Далее полученные данные были использованы для определения аналитического смещения (показатель средней разницы между методами) и стандартного отклонения различий, что позволило рассчитать статистику парного t-теста и определить доверительные границы валидируемой методики. Все результаты расчетов представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты значений, полученные при валидации правильности биохимических методик определения показателей обмена железа в мокроте.

Аналит	Аналитическое смещение (B)	Стандартное отклонение различий (SD)	t-критическое	Доверительные границы	
				Верхняя	Нижняя
Железо	-1,39	0,85	2,845	-0,85	-1,93
Ферритин	-9,395	6,75	2,845	-5,10	-13,69
Трансферрин	-0,01545	0,01	2,845	-0,01	-0,02

Таким образом, мы делаем вывод, что величина полученного аналитического смещения (В) находится в пределах доверительных границ по всем исследуемым анализам, что говорит об успешном проведении валидации правильности биохимических методик исследования мокроты и дает возможность рассчитать обязательный показатель качества проводимых измерений – общую аналитическую ошибку.

Общая аналитическая ошибка (*allowable Total Error, TEa*) отражает интервал значений аналита в распределении результатов его измерений, включающий влияние допустимой случайной и систематической ошибок. В соответствии с ГОСТом Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях» общую аналитическую ошибку рассчитали по формуле:

$$TEa = B\% + 1,96 \cdot CVi$$

где В% – показатель аналитического смещения;

CVi – коэффициент внутрииндивидуальной вариации (в %);

1,96 – множитель, обеспечивающий приемлемый 95% доверительный интервал для допустимой ошибки.

Таким образом, общая аналитическая ошибка для железа составила 34,3%, для ферритина 33,7% и для трансферрина 30%.

4.3. Определение линейности и рабочего диапазона биохимической методики исследования показателей обмена железа в мокроте

В лабораторной диагностике метод считается линейным, если имеется прямо пропорциональная зависимость между концентрацией аналита в исследуемом образце и величиной аналитического сигнала (оптической плотностью, степенью рассеивания и поглощения светового потока, интенсивность свечения и прочее). Рабочий диапазон определяется целью

применения конкретной количественной методики и может включать в себя полный линейный диапазон, либо охватывать лишь его часть, являясь по сути интервалом между верхней и нижней концентрацией аналита в образце, для которого показано, что применяемая методика имеет приемлемый уровень точности, правильности и линейности. Для определения линейности и рабочего диапазона измерений использовался протокол CLSI EP-6A, основанный на расчете полиномиальной регрессии с последующим построением графической модели.

Для проведения эксперимента, следуя протоколу исследования, было подготовлено два пула образцов: первый – с минимальной концентрацией исследуемого аналита, приблизительно равной величине нижнего предела детекции метода; второй – с концентрацией исследуемого аналита, максимально приближенной к верхнему пределу диапазона линейности метода. После этого приготавливалось еще пять пулов образца путем последовательного разбавления второго первым. Далее дважды проводилось определение концентрации аналита в пяти получившихся пулах.

На основании полученных результатов были рассчитаны статистические параметры полиномиальной регрессии в виде коэффициентов полиномов первого, второго и третьего порядка, а также стандартная ошибка регрессии (S_{yx}) для них. Схема приготовления пулов, коэффициенты полиномов, стандартная ошибка регрессии, диапазон и графические модели линейности показаны на рисунках 14-16.



Рисунок 14 – Определение линейного диапазона измерений железа в мокроте

CLSI EP06-A : Verification Working Range

Parameter	Ferritin	Replicates	2	Levels	5
Units	µg/L	Days	1	Operator	Kozlov

Experimental and Input Data

N	Dilution Scheme	Repeat 1	Repeat 2	Mean	Diff	Diff ² /2	%Diff	%Diff ² /2	Pooled SD
1	L	22,4	21,5	22,0	0,9	0,405	4,10	8,406	3,1
2	0,75L+0,25H	93	97	95,0	-4	8	4,21	8,864	Pooled CV
3	0,50L+0,50H	164	169	166,5	-5	12,5	3,00	4,509	
4	0,25L+0,75H	227	233	230,0	-6	18	2,61	3,403	Allowable TEa
5	H	293	297	295,0	-4	8	1,36	0,919	33,7

Polynomial Regression Analysis

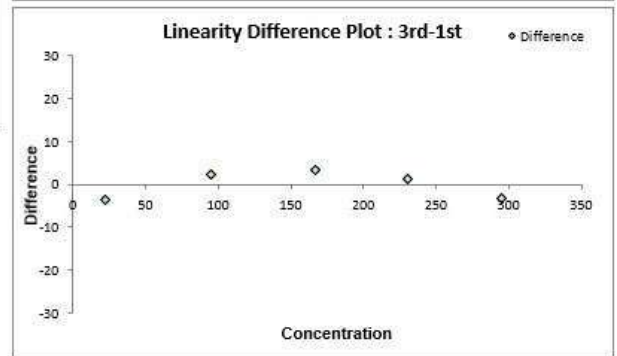
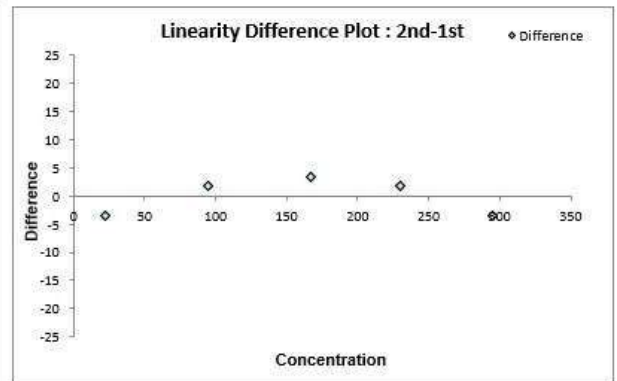
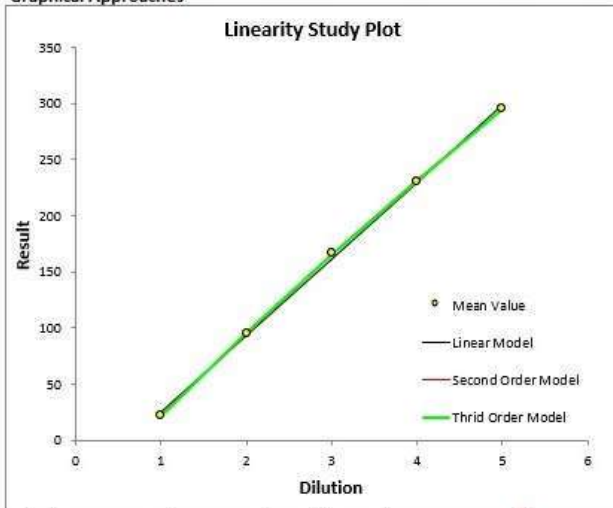
Order	b1	b0		
First Order	68,11	-42,64		
Second Order	b2	b1	b0	
Order	-1,72	78,44	-54,69	
Third Order	b3	b2	b1	b0
Order	0,25	-4,01	84,44	-58,96

Model	(Syx)	Select Model
First Order	3,9	Model
Second Order	1,2	Not Select
Third Order	1,1	Select

Analysis & Clinical Evaluation Degree of NonLinearity

Mean Value	Predicted 1st-order	Predicted 2nd-order	Difference 2nd-1st	Difference %	1/2 Allowable TEa	Predicted 1st-order	Predicted 3rd-order	Difference 3rd-1st	Difference %	1/2 Allowable TEa
22,0	25,5	22,0	-3,4	13,5	16,9	25,5	21,7	-3,7	14,7	16,9
95,0	93,6	95,3	1,7	1,8	16,9	93,6	95,9	2,3	2,5	16,9
166,5	161,7	165,1	3,4	2,1	16,9	161,7	165,1	3,4	2,1	16,9
230,0	229,8	231,5	1,7	0,7	16,9	229,8	230,9	1,1	0,5	16,9
295,0	297,9	294,5	-3,4	1,2	16,9	297,9	294,8	-3,1	1,1	16,9

Graphical Approaches



Calculator expected concentrations of the pools

Pool N	Vol.Pool 1	Vol.Pool 5	Concentration (Units)
1	600		21
2	450	150	88
3	300	300	156
4	150	450	223
5	600		290

Рисунок 15 – Определение линейного диапазона измерений ферритина в мокроте

CLSI EP06-A : Verification Working Range

Parameter	Transferrin	Replicates	2	Levels	5
Units	g/L	Days	1	Operator	Kozlov

Experimental and Input Data

N	Dilution Scheme	Repeat 1	Repeat 2	Mean	Diff	Diff ² /2	%Diff	%Diff ² /2	Pooled SD
1	L	0,019	0,015	0,017	0,004	0,000008	23,53	276,817	0,0
2	0,75L+0,25H	0,029	0,033	0,031	-0,004	0,000008	12,90	83,247	Pooled CV
3	0,50L+0,50H	0,051	0,048	0,050	0,003	4,5E-06	6,06	18,365	9,3
4	0,25L+0,75H	0,063	0,059	0,061	0,004	8E-06	6,56	21,500	Allowable TEa
5	H	0,077	0,071	0,074	0,006	0,000018	8,11	32,871	30,0

Polynomial Regression Analysis

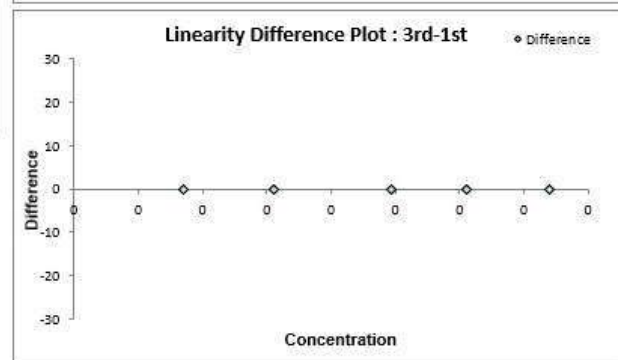
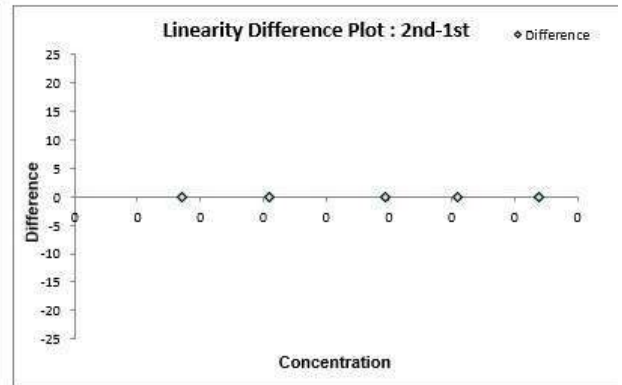
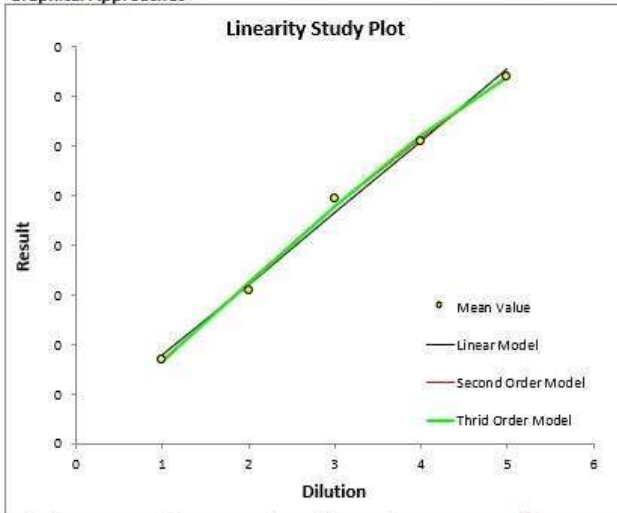
First Order	b1	b0		
	0,01	0,00		
Second Order	b2	b1	b0	
	0,00	0,02	0,00	
Third Order	b3	b2	b1	b0
	0,00	0,00	0,01	0,00

Model	(Syx)	Select Model
First Order	0,0	Not Select
Second Order	0,0	Not Select
Third Order	0,0	Select

Analysis & Clinical Evaluation Degree of NonLinearity

Mean Value	Predicted 1st-order	Predicted 2nd-order	Difference 2nd-1st	Difference %	1/2 Allowable TEa	Predicted 1st-order	Predicted 3rd-order	Difference 3rd-1st	Difference %	1/2 Allowable TEa
0,0	0,0	0,0	0,0	7,3	15,0	0,0	0,0	0,0	5,6	15,0
0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,1	15,0
0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	15,0	0,0	0,0	0,0	2,8	15,0
0,1	0,1	0,1	0,0	1,1	15,0	0,1	0,1	0,0	2,0	15,0
0,1	0,1	0,1	0,0	1,7	15,0	0,1	0,1	0,0	2,1	15,0

Graphical Approaches



Calculator expected concentrations of the pools

Pool N	Vol.Pool 1	Vol.Pool 5	Concentration (Units)
1	600		0,016
2	450	150	0,031
3	300	300	0,045
4	150	450	0,060
5	600		0,074

Рисунок 16 – Определение линейного диапазона измерений трансферрина в мокроте

Таким образом, определены рабочие диапазоны для данных биохимических методик: для железа они составили 2-72,5 мкмоль/л, для ферритина – 22-295 мкг/л, для трансферрина – 0,017-0,074 г/л. В связи с тем, что для пациентов с МВ характерно высокое содержание ферритина в мокроте, превышающее рабочий диапазон валидируемой методики, для некоторых образцов требовалось предварительное разведение 1:20 – 1:60.

Далее была проведена оценка клинической нелинейности диапазона измерения. Для этого проведено сравнение величины различий между рассчитанными результатами линейного (полином первого порядка) и «лучшего» нелинейного полинома и половины величины допустимой общей аналитической ошибки (TEa). Для всех аналитов эти различия оказались меньше величины $\frac{1}{2}$ TEa, следовательно диапазон измерения метода является клинически линейным, то есть приемлемым для клинического применения.

4.4. Определение аналитической специфичности биохимических методик при исследовании показателей обмена железа в мокроте (эксперимент на открытие)

Из-за присутствия в матриксе пробы (все компоненты пробы, кроме аналита) вещества, реагирующего с аналитом и конкурирующего с реагентом возможно возрастание пропорциональной систематической ошибки метода (эффект матрицы), величину которой определяли с помощью эксперимента на открытие, который проводили в соответствии с ГОСТом Р 51352-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний» и протоколом CLSI EP7-A2. Для этого были подготовлены два образца пулов с исследуемым аналитом: в базовом пуле смешивались мокрота и раствор аналита с известной концентрацией (калибратор), в контрольном – мокрота и водный стандарт в эквивалентных объемах. Далее восьмикратно определяли концентрацию аналита в приготовленных пулах и рассчитывали процент

открытия как отношение рассчитанной и полученной разниц концентрации аналита в базовой и контрольной пробах, выраженное в процентах. Средняя величина пропорциональной ошибки рассчитывалась как разница между 100%-ным «идеальным открытием» и полученным средним процентом открытия. Впоследствии сравнивали величину пропорциональной ошибки с общей аналитической ошибкой, рассчитанной ранее. Пример проведения эксперимента на открытие для ферритина представлен на рисунке 17.

Аналит	Ферритин	Концентрация калибратора	150 мкг/л		
Концентрация	55 мкг/л	TEa%	33,7%		
Метод	Иммунотурбодиметрия				
Партия реагента	111992				
Номер калибратора	7474555				
Повторы	8				
Анализатор	Cobas Integra 400+				
Исполнитель	Козлов А.В.				
№ образца	Концентрация проб базовой серии	Концентрация проб контрольной серии	Разница в мкг/л	Процент открытия	
1	70	54,9	15,1	100%	
2	69,5	54,7	14,8	98%	
3	68,1	53,2	14,9	99%	
4	69,9	54,8	15,1	100%	
5	70,1	55,1	15	100%	
6	70	55	15	100%	
7	68,4	53,9	14,5	96%	
8	69,4	54,8	14,6	97%	
Статистические значения					
Среднее	69,4	54,6			
Стандартное отклонение	0,7	0,6			
CV%	1%	1,1%			
Рассчитанное открытие					
Конц. добавленного аналита	0,1*150 = 15 мкг/л				
Средний % открытия	98,7%				
Пропорциональная ошибка	100% - 98,7% = 1,3%				
Выводы					
Аналитическая специфичность	TEa (33,7%) > 1,3%				
	Общая аналитическая ошибка больше пропорциональной ошибки				
	Характеристики метода соответствуют критериям приемлемости				

Рисунок 17 – Эксперимент на открытие для ферритина

Итоговые результаты проведения эксперимента на открытие для показателей обмена железа в мокроте представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты проведения эксперимента на открытие

Показатель	% открытия	Пропорциональная ошибка	TEa	TEa > пропорциональная ошибка
Железо	95,75%	4,25%	34,3	+
Ферритин	98,7%	1,3%	33,7	+
Трансферрин	97,25%	2,75%	30	+

Таким образом, значение процента открытия для всех анализов находится в пределах 90-100%, что соответствует требованиям ГОСТа, следовательно, характеристики методик соответствуют критериям приемлемости.

4.5. Валидация прецизионности биохимических методик исследования показателей обмена железа в мокроте

Для обеспечения большей статистической достоверности используют величину долгосрочной вариации, которая рассчитывается в соответствии с протоколом CLSI EP5-A2. Долгосрочность вариации должна составлять не менее 20 дней, поэтому в течение указанного интервала времени нами проводилось измерение показателей обмена железа в образце мокроты от одного пациента дважды в день, рассчитав таким образом по полученным результатам межсерийный коэффициент вариации (CV), который для железа составил 4,65%, для ферритина 2,56%, для трансферрина 6,02%. Теперь, зная коэффициент вариации, значения общей аналитической ошибки и аналитического смещения, можно определить аналитическую эффективность методики с помощью ее сигмаметрической оценки по формуле:

$$\text{Sigma} = \frac{\text{TEa}\% - \text{B}\%}{\text{CV}\%}$$

с дальнейшей интерпретацией результатов: <2 Sigma – неприемлемый уровень; 2-3 Sigma – плохой уровень; 3-4 Sigma – пограничный уровень; 4-5 Sigma – хороший уровень; 5-6 Sigma – превосходный уровень; >6 Sigma – мировой класс.

Таким образом, для железа и ферритина установлен превосходный уровень приемлемости, тест с трансферрином продемонстрировал хороший уровень приемлемости (Рисунки 18-20).

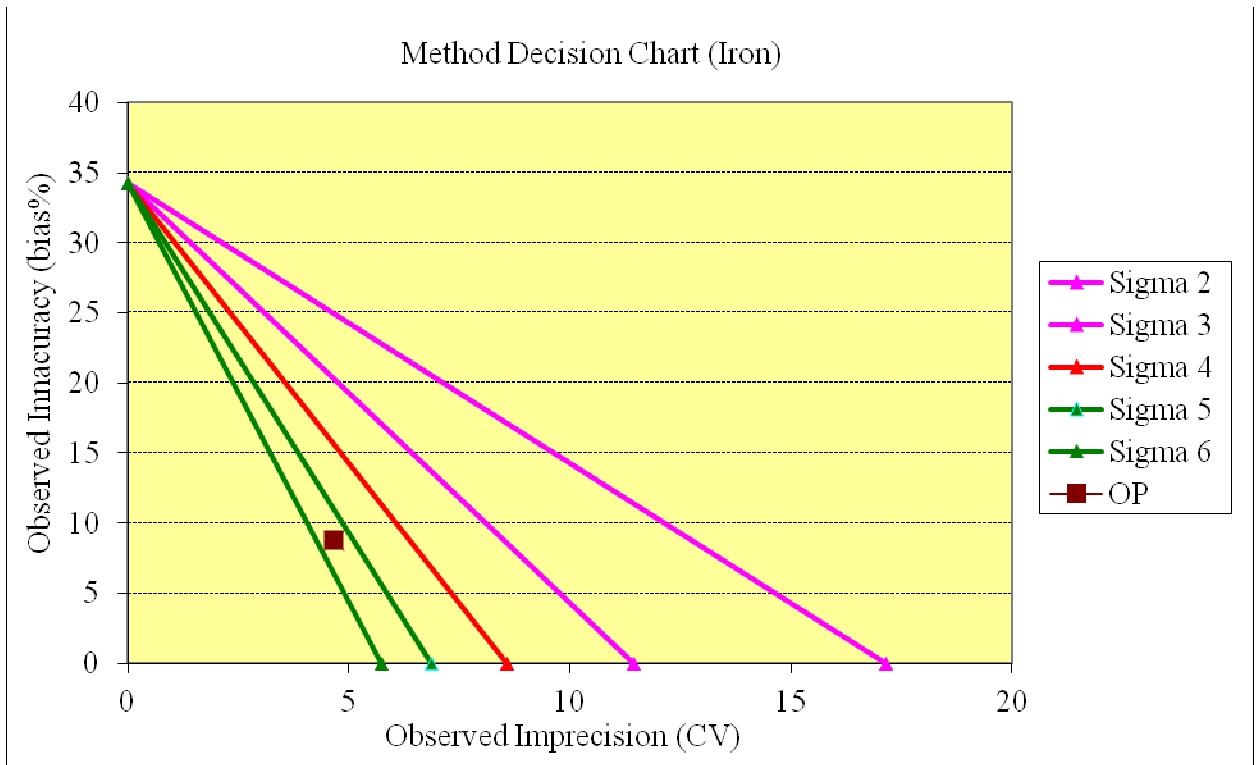


Рисунок 18 – Результаты сигаметрической оценки измерений железа

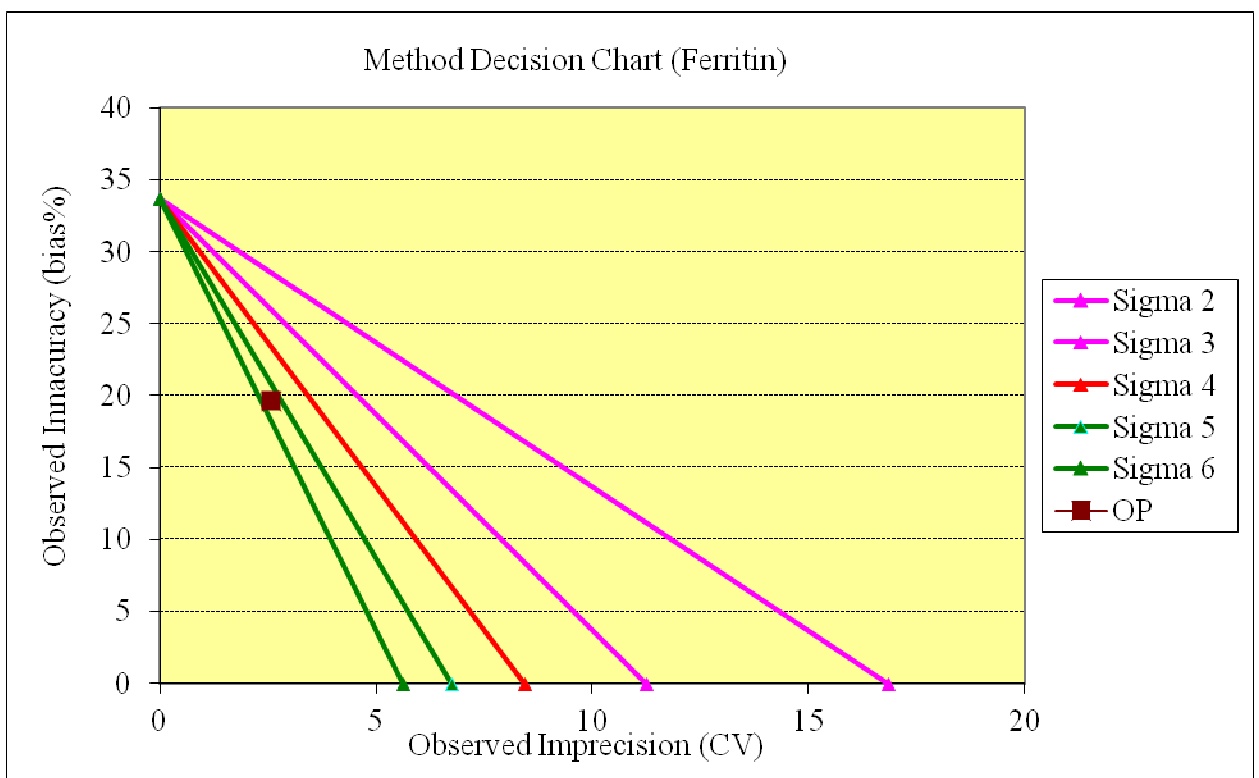


Рисунок 19 – Результаты сигаметрической оценки измерений ферритина

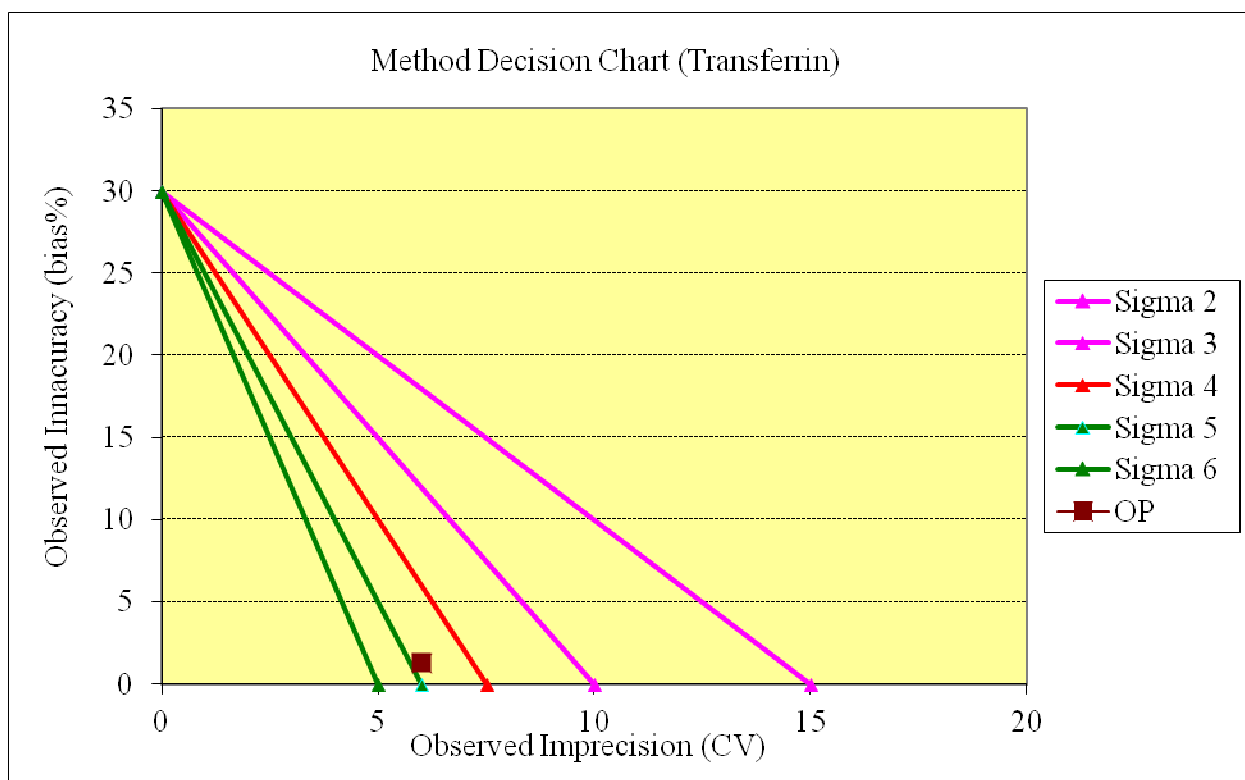


Рисунок 20 – Результаты сигмаметрической оценки измерений трансферрина

4.6. Определение внутрисерийной невоспроизводимости метода исследования показателей обмена железа в мокроте

Соответствие внутрисерийной невоспроизводимости нормам точности проводили согласно Приказу № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». Для этого было проведено 10 измерений определяемого аналита в одном и том же образце мокроты в рамках одной аналитической серии. На основании полученных данных рассчитан внутрисерийный коэффициент вариации (CV_{BC}). Далее проведено сравнение полученных коэффициентов с предельно допустимыми значениями коэффициента общей аналитической вариации для 10 измерений (CV_{10}), установленных Приказом № 45 или ГОСТом Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей

результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях». Поскольку справочных данных о значениях CV_{10} для аналитов в мокроте отсутствуют, было принято решение провести оценку внутрисерийной невоспроизводимости метода относительно соответствующих значений для сыворотки крови. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты оценки внутрисерийной невоспроизводимости

Аналит	n	Mean	SD	CV_{BC}	CV_{10}	$CV_{BC} \leq 0,5 * CV_{10}$
Железо, мкмоль/л	10	13,93	0,19	1,36%	19%*	Условие выполнено
Ферритин, мкг/л	10	44,6	1,63	3,64%	10,2%**	Условие выполнено
Трансферрин, г/л	10	0,063	0,001	1,02%	2,1%**	Условие выполнено
*Приложение 3 к приказу № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации»						
**Приложение Б к ГОСТ Р 53133.1-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях						

Таким образом, полученные нами статистические данные внутрисерийной невоспроизводимости методик определения показателей обмена железа в мокроте оказались сопоставимы нормам точности, установленным для данных аналитов в сыворотке крови.

4.7. Определение критической разницы для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении изменений показателей обмена железа в мокроте

Поскольку мокрота является биологической жидкостью, отсутствующей у здоровых лиц, понятие «референтные интервалы» для ее аналитов неприменимо. Однако для пациентов с МВ определение показателей обмена железа в мокроте, особенно в динамике может иметь диагностическую ценность для прогноза обострений инфекционно-воспалительного процесса и оценки тяжести состояния. В связи с этим необходимо рассчитать коэффициент критической разницы (RCV% – reference critical value) для оценки достоверности различий при динамическом наблюдении, согласно ГОСТу Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов»:

$$RCV\% = 2,77 \times \sqrt{CV_A^2 + CV_i^2}$$

Результаты расчета RCV% для показателей обмена железа в мокроте представлены в таблице 8.

Таблица 8. Критическая разница показателей обмена железа в мокроте при динамическом наблюдении

Аналит	CV _A	CV _i	RCV
Железо	4,65%	16,8%	48,3%
Ферритин	2,56%	12,4%	35,1%
Трансферрин	6,02%	15,3%	45,5%

Оценка результатов, полученных у пациента в динамике, проводится путем сравнения RCV% с коэффициентом PCV% (personal change value), рассчитываемым как разность между более поздним и более ранним содержанием аналита, выраженная в процентах:

$$PCV\% = (A_2 - A_1)/A_1 * 100,$$

где A1 – более раннее содержание аналита;

A2 – более позднее содержание аналита.

Далее полученный PCV% коэффициент сравнивается с уже известным коэффициентом RCV% и делается вывод клинической значимости изменения содержания аналита в мокроте при динамическом наблюдении за состоянием пациента:

$PCV\% > RCV\%$ – изменение клинически значимо;

$PCV\% < RCV\%$ – изменение клинически не значимо.

Проведенные валидирующие мероприятия позволяют в дальнейшем использовать метод биохимического исследования мокроты для определения железа и железосодержащих белков, что предоставляет возможность дополнительно оценить тяжесть течения инфекционно-воспалительного процесса, вызванного неферментирующими грамотрицательными микроорганизмами в легких у пациентов с МВ.

ГЛАВА 5. БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА В МОКРОТЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ

С целью поиска возможных маркеров воспаления при помощи микробиологического и биохимического исследований были обследованы 19 пациентов с пневмонией, 15 пациентов с бронхитом и 18 пациентов с муковисцидозом. Проводилось определение показателей обмена железа в сыворотке крови и мокроте, с ее предварительным бактериологическим анализом. Все пациенты находились на стационарном лечении.

5.1. Биохимическое исследование показателей обмена железа в мокроте и сыворотке крови у пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы

В исследуемых образцах мокроты были определены следующие показатели: железо, трансферрин, ферритин. Сравнения групп выполнены с помощью дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с последующими попарными сравнениями по критерию Манна-Уитни-Вилкоксона. Полученные результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты биохимического исследования мокроты у пациентов с пневмонией, бронхитом, муковисцидозом. Представлены медиана и межквартильный интервал

Исследуемый аналит	Пневмония n=19	Бронхит n=15	Муковисцидоз n=18	pK-W	p1-2	p1-3	p2-3
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)				
Железо, мкмоль/л	2,80 (2,20–4,50)	2,40 (2,30–3,60)	14,10 (2,93–37,20)	<0,001	0,639	<0,001	<0,001
Ферритин, мкг/л	26,60 (22,90–37,00)	32,00 (23,86–48,60)	1477,75 (70,80–5837,15)	<0,001	0,257	<0,001	<0,001

У пациентов с муковисцидозом уровень железа в мокроте по медиане составил 14,10 (1,93–37,20) мкмоль/л, что было значительно выше, чем у пациентов с пневмонией и бронхитом, в группе которых данный показатель составил 2,80 (2,20–4,50) мкмоль/л и 2,40 (2,30–3,60) мкмоль/л соответственно. Аналогичная ситуация сложилась при определении количества ферритина: при обследовании пациентов с муковисцидозом уровень данного железосвязывающего белка составил 1477,75 (70,80–5837,15) мкг/л, в группе пациентов с пневмонией 26,60 (22,90–37,00) мкг/л, у больных бронхитом 32,00 (23,86–48,60) мкг/л. Трансферрин в мокроте был обнаружен только у одного пациента с пневмонией и трех пациентов с муковисцидозом. После статистической обработки полученных данных были выявлены достоверные различия в группе пациентов с муковисцидозом по сравнению с другими нозологиями: железо ($p < 0,01$), ферритин ($p < 0,01$).

Далее было проведено биохимическое исследование крови у всех трех групп пациентов с определением содержания железа и железосвязывающих белков. По результатам исследования отмечается корреляция в группе пациентов с муковисцидозом: при высоком содержании железа и ферритина в мокроте, уровень этих же показателей в сыворотке крови оказался ниже и составил по медиане для железа 7,25 мкмоль/л, ферритина 41,65 мкг/л. Оба показателя оказались ниже аналогичных в группах пациентов с пневмонией и бронхитом, полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты биохимического исследования крови у пациентов с пневмонией, бронхитом, муковисцидозом

Исследуемый аналит	Пневмония n=19	Бронхит n=15	МВ n=18	pK-W	p1-2	p1-3	p2-3
	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)	Me (Q1-Q3)				
Железо, мкмоль/л	14,10 (10,05–16,98)	12,40 (10,43–18,83)	7,25 (4,60–11,80)	<0,05	0,97	<0,05	<0,05
Ферритин, мкг/л	121,00 (101,50–126,93)	116,90 (95,25–123,18)	41,65 (34,60–56,40)	<0,001	0,31	<0,001	<0,001
Трансферрин, г/л	2,95 (2,69–3,25)	2,85 (2,51–3,55)	3,06 (2,68–3,26)	0,99	0,92	0,93	0,57

При этом по уровню трансферрина в сыворотке крови достоверных различий выявлено не было: в группе пациентов с пневмонией количество трансферрина по медиане составило 2,95 г/л, в группе пациентов с бронхитом 2,85 г/л, среди пациентов с МВ 3,06 г/л.

5.2. Микробиологическое исследование мокроты у пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы

При анализе результатов микробиологического исследования было отмечено, что в мокроте у пациентов с пневмонией преобладали представители грамположительной флоры: у семи больных был выявлен *S.pneumoniae*, у двоих *S.aureus*. В шести случаях были выявлены представители грамотрицательных микроорганизмов: у четверых пациентов обнаружены штаммы *K.pneumoniae*, еще у двоих *E.coli*. Микроорганизмы из НФГОБ были обнаружены у четверых обследуемых: по два случая *P.aeruginosa* и *A.baumannii*.

В группе пациентов с бронхитом также преобладали грамположительные микроорганизмы, однако клинически значимые бактерии были выделены только у четверых пациентов – три штамма

Streptococcus pneumoniae и один *S.aureus*. В пяти случаях были идентифицированы грамположительные представители нормальной микробиоты слизистых оболочек (*S.vestibularis*, *S.oralis* и три штамма *S.salivarius*), что позволяет говорить о том, что причиной заболевания был инфекционный агент небактериальной природы. В трех случаях были выявлены НФГОБ: два штамма *P.aeruginosa* и один штамм *A.baumannii*. Также у троих пациентов были идентифицированы представители порядка *Enterobacterales* – 2 штамма *E. coli* и *K.pneumoniae*.

Среди больных МВ доминирующими оказались представители НФГОБ – в четырех случаях были идентифицированы микроорганизмы из ВСС, трижды *P.aeruginosa* и по одному случаю *A.xylosoxidans* и *S.maltophilia*. У троих пациентов были высеяны грамположительные представители нормальной микробиоты слизистых оболочек (*S.mitis* и два штамма *S.vestibularis*), еще у троих *S.aureus*. Трижды были выделены грамотрицательные бактерии: у двоих пациентов *H.influenzae*, у одного *E.cloacae*.

5.3. Оценка зависимости уровня показателей обмена железа в мокроте от выделенной микробиоты у пациентов с различными заболеваниями бронхолегочной системы

Проанализировав данные по показателям железа и ферритина в мокроте среди пациентов трех нозологий и сопоставив их с выделенной микробиотой, было выявлено что самый высокий уровень железа в мокроте наблюдался у больных муковисцидозом с НФГОБ и составил по медиане 37,80 (21,00–46,80) мкмоль/л. У пациентов той же группы с грамположительной и грамотрицательной флорой уровень железа был значительно ниже и составил 3,90 (1,00–12,00) и 0,75 (0,50–1,10) мкмоль/л соответственно. Среди пациентов с пневмонией данный показатель был относительно равный и составил 0,85 (0,20–16,10) мкмоль/л у пациентов с НФГОБ, 0,85 (0,10–1,00) мкмоль/л с грамотрицательной микробиотой и 0,20 (0,00–3,10) мкмоль/л с

грамположительной микробиотой. Наименьшие значения железа выявлены у пациентов с бронхитом: 0,10 (0,00–0,60) мкмоль/л в группе с НФГОБ, 1,25 (0,75–1,75) мкмоль/л с грамположительными возбудителями и 0,10 (0,00–1,00) мкмоль/л с грамотрицательными (Рисунок 21).

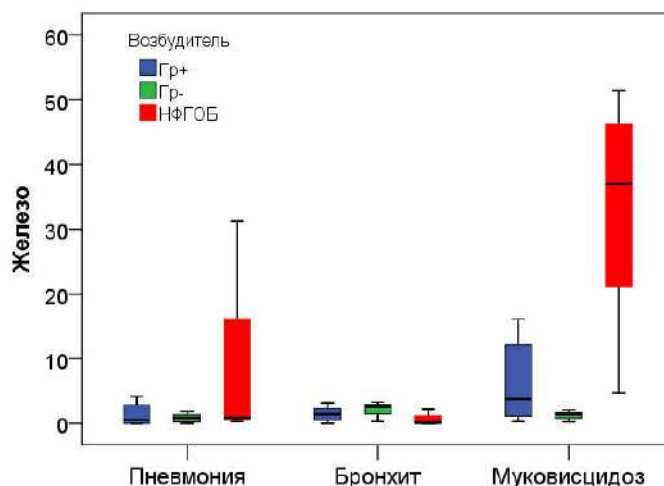


Рисунок 21 – Уровень железа в мокроте у пациентов с различными нозологиями с учетом выявленной микробиоты

Уровень ферритина в мокроте также значительно преобладал у пациентов с МВ с высевом НФГОБ и составил по медиане 4050,00 (2350,00–7150,00) мкг/л, при крайне низком в сравнении этом же показателе у пациентов с грамположительной и грамотрицательной флорой, где он составил 37,65 (15,60–67,10) мкг/л и 44,15 (28,10–79,90) мкг/л соответственно. В группе с пневмонией уровень ферритина по медиане у пациентов с НФГОБ составил 29,60 (5,75–2360,90) мкг/л, у пациентов с грамположительными бактериями (0,00–19,60) мкг/л, с грамотрицательными (0,00–41,80) мкг/л. У пациентов с бронхитом количество ферритина в мокроте также было самым низким среди пациентов, составив по медиане 6,80 (0,75–11,90) мкг/л при НФГОБ, 10,70 (2,00–19,10) мкг/л при грамотрицательной флоре, 8,20 (0,00–31,50) мкг/л при грамположительной (Рисунок 22).

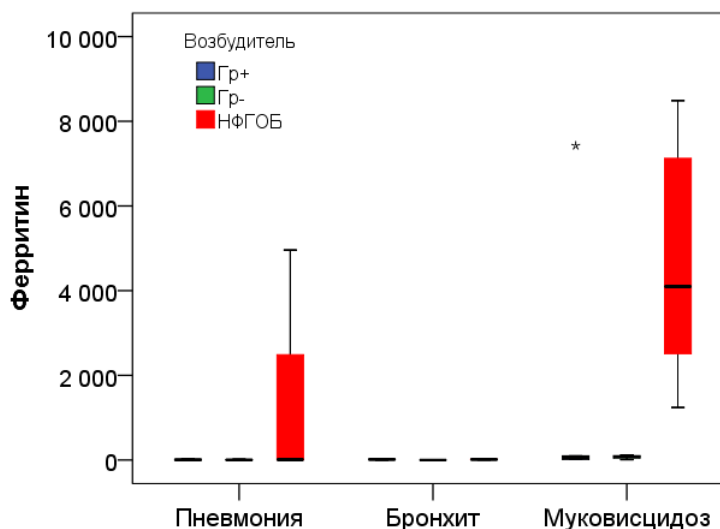


Рисунок 22 – Уровень ферритина в мокроте у пациентов с различными нозологиями с учетом выявленной микробиоты

Трансферрин в мокроте определялся в единичных случаях в группе пациентов с МВ с высевом НФГОБ, его уровень не превышал 0,06 г/л. При других патологиях трансферрин не был определен.

5.4. Показатели обмена железа в крови и мокроте у пациентов с муковисцидозом

В связи с получением достоверных различий показателей обмена железа в мокроте в группе пациентов с муковисцидозом по сравнению с группами пациентов с другими заболеваниями было принято решение обследовать большее количество больных муковисцидозом с целью поиска возможной корреляции уровня железа и железосвязывающих белков в мокроте с выявленной микробиотой и состоянием пациента, а также с показателями обмена железа в крови.

Всего за период с 2017 по 2019 годы было обследовано 88 пациентов с муковисцидозом. Исследование включало микробиологический посев мокроты, биохимическое исследование крови и мокроты. Также получены данные по общему анализу крови.

По результатам бактериологического исследования мокроты обследуемые были разделены на 2 группы: первую группу составили больные, инфицированные НФГОБ, с доказанным клиническим значением в развитии легочной патологии у пациентов с МВ; ко второй когорте были отнесены пациенты, в мокроте у которых были обнаружены микроорганизмы других групп. Первая группа была представлена 67 пациентами с выделенными из мокроты НФГОБ, у них были идентифицированы следующие виды микроорганизмов: бактерии из ВСС, *P.aeruginosa*, *A.xylooxidans*, *S.maltophilia*. Вторую группу составили остальные 21 пациентов, из мокроты которых были выделены грамположительные (*S.pneumoniae*, *S.aureus*) и другие грамотрицательные микроорганизмы (*K.pneumoniae*, *E.coli*, *E.cloacae*, *H.influenzae*).

По результатам биохимического исследования мокроты выявлена статистическая достоверность различий показателей обмена железа между группой пациентов с НФГОБ и пациентами, у которых в мокроте обнаружены микроорганизмы других групп. Уровень железа в группе с НФГОБ по медиане составил 16,10 (6,60–37,80) мкмоль/л, ферритина 831,60 (207,50–4609,10) мкг/л; трансферрин обнаружен не был, либо его содержание было ниже пороговых значений применяемого метода. В группе пациентов с прочей микробиотой показатели обмена железа в мокроте значительно ниже, уровень железа по медиане был равен 3,05 (2,15–4,53) мкмоль/л, ферритина 45,35 (24,00–95,35) мкмоль/л; трансферрин также не был обнаружен.

По результатам биохимического исследования крови статистически значимые различия были выявлены по содержанию железа. У пациентов, инфицированных НФГОБ уровень железа в крови по медиане составил 10,00 (6,75–16,30) мкмоль/л, что оказалось достоверно ниже, чем у пациентов, инфицированных микроорганизмами других групп, содержание железа у которых по медиане составило 14,45 (11,41–21,25) мкмоль/л. Показатели обмена железа в мокроте и сыворотке крови у пациентов с муковисцидозом с

учетом результатов микробиологического исследования мокроты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Показатели обмена железа в мокроте и сыворотке крови у пациентов с муковисцидозом с учетом результатов микробиологического исследования мокроты

Показатель	Возбудитель		p
	НФГОБ	Прочая флора	
Мокрота			
Железо мкмоль/л	16,10 (6,60–37,80)	3,05 (2,15–4,53)	<0,001
Ферритин мкг/л	831,60 (207,50–4609,10)	45,35 (24,00–95,35)	<0,001
Сыворотка крови			
Железо мкмоль/л	10,00 (6,75–16,30)	14,45 (11,41–21,25)	<0,05
Ферритин мкг/л	39,40 (21,10–112,73)	23,35 (8,68–50,28)	0,055
Трансферрин г/л	3,11 (2,70–3,56)	3,13 (3,03–3,57)	0,743

Результаты биохимического исследования показали, что у пациентов с МВ содержание железа и железосвязывающих белков в мокроте значительно выше, в сравнении с пациентами с бронхитом и пневмонией. При этом в крови уровень данных показателей был достоверно ниже, чем у пациентов с другими заболеваниями бронхолегочной системы.

Полученные данные показывают корреляционную зависимость между содержанием показателей обмена железа в мокроте у больных МВ и микробиотой, выделенной из НДП: у пациентов, инфицированных НФГОБ эти показатели достоверно и значительно выше, чем у пациентов, из мокроты которых были выделены микроорганизмы других групп. Интересна также тенденция к снижению сывороточного железа у пациентов, из респираторного тракта которых были выделены НФГОБ, которая позволяет предположить, что причиной развития железодефицитной анемии у

пациентов с МВ может быть определенный видовой спектр инфицирующих их микроорганизмов.

5.5. Применение расчета коэффициента PCV% для ферритина в динамическом наблюдении за состоянием пациентов с муковисцидозом

В главе 4 были обозначены рассчитанные коэффициенты RCV% для оценки значимости изменений показателей обмена железа в мокроте, что позволяет рассчитать коэффициент PCV%, используемый как дополнительный индивидуальный критерий оценки состояния пациента. Также критериальные значения PCV% можно применить для прогнозирования ухудшения состояния больного МВ и развития «цепация-синдрома». Необходимым условием является первоначальное определение коэффициента PCV% для показателей обмена железа у пациента вне обострения инфекционного процесса.

Критериальные значения PCV% для ферритина в мокроте больных МВ были определены при обследовании 40 пациентов; на первом этапе проводили определение содержания ферритина в мокроте и оценку течения инфекционного процесса пациента, включающего в себя: сбор анамнеза, измерение ЧДД, оценку ФВД, пульсоксиметрию, рентгенографию грудной клетки, термометрию, определение уровня лейкоцитов и С-реактивного белка в крови. В дальнейшем, согласно полученным данным, исследуемые были разделены на 4 группы: 1 – пациенты без обострения инфекционного процесса (n=10), 2 – обострение без высева микроорганизмов из ВСС (n=10), 3 – обострение с высевом микроорганизмов из ВСС (n=10), 4 – с «цепация-синдромом» (n=10). Всем включенным в исследование было проведено биохимическое исследование мокроты согласно предлагаемому способу с определением PCV% для ферритина. Коэффициент PCV% рассчитывался как разность между более поздним и более ранним содержанием ферритина в мокроте, выраженное в процентах. Оказалось, что имеются достоверные различия в увеличении значений PCV% ферритина в мокроте у пациентов с МВ при различном течении инфекционного процесса. В таблице 12

представлены значения PCV% для ферритина в мокроте у пациентов с МВ в зависимости от течения инфекционного процесса.

Таблица 12 – Средние значения PCV ферритина в мокроте пациентов с муковисцидозом в зависимости от течения инфекционного процесса

Инфекционн ый процесс	Вне обостре ния	Обострен ие без ВСС	Обостр ение с ВСС	Цепа ция- синд ром	p1-2	p1-3	p1-4
	1 Me	2 Me	3 Me	4 Me	p-коэффициента Манна- Уитни		
PCV для ферритина	34,1	42,0	71,9	85,3	<0,05	<0,001	<0,001

Проведенный корреляционный анализ выявил достоверные сильные корреляционные связи значений PCV для ферритина в мокроте у пациентов с МВ с течением инфекционного процесса (коэффициент корреляции Спирмена составил 0,895; $p < 0,001$).

Проведенный ROC-анализ продемонстрировал высокую прогностическую способность определения PCV для ферритина в мокроте у пациентов с МВ для определения риска обострения инфекционного процесса, а также позволил установить оптимальные пороговые значения данного показателя и приемлемые уровни чувствительности и специфичности для выбранных пороговых значений, указанных в способе оценки риска осложнения инфекционного процесса у пациентов с МВ.

Сущность предложенного метода заключается в следующем: данная процедура проводится в динамике с расчетом коэффициента PCV (разность между более поздним и более ранним содержанием ферритина в мокроте, выраженное в процентах): увеличение значения PCV для ферритина в

мокроте менее чем на 37,2% включительно соответствует отсутствию обострения инфекционного процесса; от 37,3% до 45,7% включительно соответствует обострению без участия микроорганизмов из ВСС; от 45,8% до 78,3% соответствует обострению обусловленному микроорганизмами из ВСС; увеличение значения PCV выше 78,3% соответствует «цепация-синдрому».

Клинический пример 1.

Пациентка Т., 11 лет экстренно поступила в областной центр муковисцидоза 17.10.2018 с диагнозом: муковисцидоз, легочно-кишечная форма, тяжелое течение, обострение. В анамнезе хронический высеv бактерий из *Burkholderia cepacia* complex. В период предыдущего пребывания в стационаре, во время плановой госпитализации был проведен биохимический анализ мокроты: содержание железа составило 4,1 мкмоль/л, ферритина 1113 мкг/л, трансферрина 0,017 г/л. На момент поступления предъявляла жалобы на периодическое повышение температуры до 40°C, одышку, кашель и затруднение отхождения мокроты; температура тела 37,9 °C, SaO₂ 91% при постоянной ингаляции кислородной смесью, ЧДД 38 в минуту. Общее состояние тяжелое, нестабильное. По результатам бактериологического посева мокроты на момент поступления выявлен штамм *Burkholderia cenocepacia* 10⁵, резистентный к фторхинолонам, цефалоспорином IV поколения, ингибиторозащищенным пенициллинам и цефалоспорином. По результатам биохимического исследования мокроты, на момент экстренной госпитализации уровень железа составил 16,1 мкмоль/л, ферритина 5023,8 мкг/л, трансферрина 0,054 г/л. Рассчитаны коэффициенты PCV% по исследуемым показателям:

PCV железа 74,5% > RCV железа 48,3% – изменение клинически значимо;

PCV ферритина 77,8% > RCV ферритина 35,1% – изменение клинически значимо;

PCV трансферрина 68,5% > RCV трансферрина 45,5% – изменение клинически значимо.

На фоне проводимой терапии улучшений не наблюдалось, через пять дней состояние пациентки ухудшилось, переведена в отделение реанимации и интенсивной терапии. Температура тела 38,1 °С, SaO₂ 87% при постоянной ингаляции кислородной смесью, ЧДД 44 в минуту. Общее состояние тяжелое, нестабильное, переведена на ИВЛ. Повторный посев мокроты выявил штамм *Burkholderia cenocepacia* 10⁴ с таким же фенотипом резистентности. По результатам повторного биохимического исследования мокроты уровень железа составил 48,9 мкмоль/л, ферритина 17441,9 мкг/л, трансферрина 0,061 г/л. Рассчитаны коэффициенты PCV% по исследуемым показателям:

PCV железа 91,6% > RCV железа 48,3% – изменение клинически значимо;

PCV ферритина 93,6% > RCV ферритина 35,1% – изменение клинически значимо;

PCV трансферрина 72,1% > RCV трансферрина 45,5% – изменение клинически значимо.

Полученные результаты расчета коэффициента PCV% оказались клинически значимыми по всем трем показателям, что говорит об ухудшении состояния и возможном развитии осложнений, в частности «цепацисиндрома». Значение PCV% ферритина на момент поступления соответствует обострению инфекционно-воспалительного процесса в бронхолегочной системе с высевом микроорганизмов из ВСС. Значение PCV% ферритина, исследуемое повторно соответствовало «цепацисиндрому». Случай закончился летальным исходом на восьмые сутки пребывания в стационаре в результате развития «цепацисиндрома» и острой дыхательной недостаточности.

Клинический пример 2.

Пациент Р., 8 лет поступил на плановую госпитализацию в областной центр муковисцидоза 23.04.2018 с диагнозом: муковисцидоз, легочно-кишечная форма, тяжелое течение. Температура тела 36,8 °С, SaO₂ 95%, ЧДД 26 в минуту. Общее состояние средней тяжести, стабильное. По результатам микробиологического исследования мокроты на момент поступления выделен штамм *Staphylococcus aureus* 10⁵, чувствительный ко всем тестируемым антибактериальным препаратам. По результатам биохимического исследования мокроты уровень железа составил 3,7 мкмоль/л, ферритина 97,6 мкг/л, уровень трансферрина не определялся.

На пятый день госпитализации общее состояние пациента удовлетворительное, температура тела 36,6 °С, SaO₂ 98%, ЧДД 22 в минуту. В результате повторного бактериологического анализа мокроты также выявлен *Staphylococcus aureus* 10⁵, чувствительный ко всем тестируемым антибактериальным препаратам. По результатам повторного биохимического исследования мокроты уровень железа составил 3,1 мкмоль/л, ферритина 112 мкг/л, уровень трансферрина также не определялся. Рассчитаны коэффициенты PCV% по исследуемым показателям:

PCV железа -16,2% < RCV железа 48,3% – изменение клинически не значимо;

PCV ферритина 12,8% < RCV ферритина 35,1% – изменение клинически не значимо.

Полученные результаты расчета коэффициента PCV% оказались клинически не значимыми, вероятность развития осложнений низкая. Через двенадцать дней после проведенной терапии выписан с улучшением состояния.

Клинический пример 3.

Пациентка М., 14 лет экстренно поступила в областной центр муковисцидоза 06.05.2018 с диагнозом: муковисцидоз, легочно-кишечная форма, тяжелое течение, обострение. В анамнезе хронический высев бактерий из *Burkholderia cepacia* complex. В период предыдущего пребывания в стационаре, во время плановой госпитализации был проведен биохимический анализ мокроты: содержание железа составило 6 мкмоль/л, ферритина 533 мкг/л, трансферрин не определялся. На момент поступления предъявляла жалобы на периодическое повышение температуры до 40°C, боль за грудиной, затрудненное дыхание, одышку, ощущение «неполного вдоха», усиление кашля и затруднение отхождения мокроты; температура тела 39,1°C, SaO₂ 93% при постоянной ингаляции кислородной смесью, ЧДД 40 в минуту. Общее состояние тяжелое, нестабильное. По результатам бактериологического посева мокроты на момент поступления выявлено два штамма *Burkholderia cepacia* 10⁵ с резистентностью к фторхинолонам, цефалоспорином IV поколения, ингибиторозащищенным пенициллинами и цефалоспорином. По результатам биохимического исследования мокроты уровень железа составил 25,7 мкмоль/л, ферритина 1222 мкг/л, уровень трансферрина не определялся.

PCV железа 76,6% > RCV железа 48,3% – изменение клинически значимо;

PCV ферритина 56,3% > RCV ферритина 35,1% – изменение клинически значимо.

Полученные результаты расчета коэффициента PCV% оказались клинически значимыми по двум показателям, что говорит о возможном ухудшении состояния и сохранении риска развития осложнений, в частности «цепация-синдрома». Значение PCV% ферритина на момент поступления соответствует обострению инфекционно-воспалительного процесса в бронхолегочной системе с высевом микроорганизмов из ВСС.

На пятые сутки проведения терапии в стационаре состояние без изменения, тяжелое, нестабильное. Температура тела 38,6 °С, SaO₂ 98% при постоянной ингаляции кислородной смесью, ЧДД 28 в минуту. По результатам повторного бактериологического посева мокроты также выявлено два штамма *Burkholderia cenocepacia* 10⁵ с таким же фенотипом резистентности. По результатам биохимического исследования мокроты уровень железа составил 52,4 мкмоль/л, ферритина 1901 мкг/л, уровень трансферрина не определялся. Рассчитаны коэффициенты PCV% по исследуемым показателям:

PCV железа 88,5% > RCV железа 48,3% – изменение клинически значимо;

PCV ферритина 72% > RCV ферритина 35,1% – изменение клинически значимо.

Полученные результаты расчета коэффициента PCV% остаются клинически значимыми по двум показателям, что говорит о возможном ухудшении состояния и сохранении риска развития осложнений, в частности «цепация-синдрома».

На десятые сутки пребывания в стационаре состояние пациентки улучшилось, температура тела 36,7 °С, SaO₂ 96% без ингаляции кислородной смесью, ЧДД 24 в минуту, жалоб на одышку, боли за грудиной и кровохарканье не предъявляла. Третий посев мокроты аналогично выявил 2 штамма *Burkholderia cenocepacia* 10⁵ с таким же фенотипом резистентности. При проведении третьего биохимического исследования мокроты показатели железа и ферритина снизились до 11,5 мкмоль/л и 807 мкг/л соответственно; трансферрин не определялся. Также рассчитаны коэффициенты PCV% по исследуемым показателям:

PCV железа 47,8% < RCV железа 48,3% – изменение клинически не значимо;

PCV ферритина 34% < RCV ферритина 35,1% – изменение клинически не значимо.

Полученные результаты расчета коэффициента PCV% оказались клинически не значимыми, вероятность развития осложнений, в том числе «цепация-синдрома» низкая. Выписана на шестнадцатые сутки пребывания в стационаре. На момент выписки общее состояние средней степени тяжести, стабильное.

Использование биохимического метода исследования мокроты у пациентов с МВ с последующим расчетом показателя PCV% может применяться для оценки тяжести течения инфекционно-воспалительного процесса в легких и прогнозирования риска обострения хронического инфекционного процесса, в частности развития «цепация-синдрома».

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА СЕЛЕКТИВНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX

В главе 1 были представлены литературные данные о железе как о необходимом эссенциальном факторе метаболизма бактерий из ВСС, а также как об одном из ключевых звеньев развития осложнений инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте у пациентов с МВ. Известно, что доступность данного субстрата в окружающей среде является ростовым фактором для бактерий из ВСС, что может иметь значение для культивирования данных микроорганизмов. При работе с материалом от пациентов с МВ рекомендуется использовать коммерческие селективные питательные среды, такие как OFPBL Agar (Oxidation Fermentation Polymyxin Bacitracin Lactose Agar) или ВССА (*Burkholderia cepacia* selective agar) [26], при этом выдерживать срок культивирования не менее 5 суток. Однако, при исследовании материала от пациента с обострением инфекционного процесса или при подозрении у больного «цепация-синдрома» временной ресурс ограничен и даже лишние сутки, потраченные на диагностику, могут иметь важное значение. Помимо этого, период культивирования может увеличиться подавления роста ВСС другими НФГОБ или ввиду приема пациентом антибиотиков. В связи с этим, разработка и применение новых агаризованных питательных сред с добавлением в них железа может позволить повысить показатель продуктивности среды, и, как следствие, сократить сроки культивирования.

6.1. Разработка селективной питательной среды с ростовой добавкой для выделения *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала

В лабораториях, выполняющих микробиологические исследования часть сред, а в некоторых случаях все используемые среды приготавливаются средним медицинским персоналом из коммерческих ингредиентов,

ответственность за качество которых лежит непосредственно на производителе. Однако, сам процесс и соблюдение технологии приготовления питательных сред, а также условия их хранения подлежат обязательному внутрिलाбораторному контролю качества. Предлагаемые в качестве альтернативы классическим новые питательные среды, приготовленные (сконструированные) в лаборатории, также подлежат стандартизации по контролю качества для доказательства возможности их использования на практике. Также, если предлагаемая питательная среда является селективной или дифференциально-диагностической, то ее применение должно соответствовать расширенным требованиям к качеству питательных сред с оценкой селективности и продуктивности, так как незначительные модификации приготовления и состава питательных сред могут повлиять на воспроизводимость результатов микробиологических исследований.

Для проведения эксперимента по повышению показателя продуктивности агаризованных питательных средств были отобраны 50 штаммов микроорганизмов из ВСС, выделенных из клинического материала от пациентов с МВ. В питательные среды железо вносилось в следующих концентрациях: 10 мг/л, 20 мг/л, 40 мг/л, 80 мг/л и 120 мг/л. С целью имитации естественных условий для бактерий из ВСС использовалась добавка в виде железа (III) гидроксид полимальтозата, имеющего сходную структуру с физиологическим депо железа человека – ферритином. Данный комплекс стабилен, имеет общую молекулярную массу 50 кДа, а форма Fe^{3+} , входящая в его состав, в отличии от соединений простых солей Fe^{2+} , не обладает прооксидантными свойствами, что исключает угрозу перекисного окисления структур бактериальной клетки [3].

Агаризованные питательные среды для проведения эксперимента готовились следующим образом: 38 г агара Мюллера-Хинтона растворялось и размешивалось в 1000 мл воды, далее нагревалось до кипения. После этого проводилась стерилизация автоклавированием 15

минут при температуре 121°C с последующим охлаждением до 45-50°C. Далее добавлялась селективная добавка, содержащая 150000 ЕД полимиксина Б, 5 мг гентамицина и 100 мг тикарциллина из расчета на 100 мл готовой питательной среды. Затем дополнительно вносилось количество железа (III) гидроксид полимальтозата, соответствующего необходимой концентрации железа. В таблице 13 приведены количества используемого комплекса железа (III) гидроксид полимальтозата, добавляемого на 1000 мл агаризованной среды, соответствующие содержанию железа.

Таблица 13 – Соответствие количества добавляемого комплекса железа (III) гидроксид полимальтозата концентрации железа на 1000 мл агаризованной среды

Количество железа (III) гидроксид полимальтозата	Соответствующая концентрация железа
35,72 мг/л	10 мг/л
71,44 мг/л	20 мг/л
142,88 мг/л	40 мг/л
285,76 мг/л	80 мг/л
428,64 мг/л	120 мг/л

С целью оценки влияния ростовой добавки, содержащей органическую соль железа, была проведена оценка продуктивности разработанной питательной среды.

6.2. Оценка показателей продуктивности селективной питательной среды с ростовой добавкой для выделения *Burkholderia ceracia complex* из клинического материала

Из каждого отобранного штамма микроорганизмов из ВСС приготавливался инокулюм с концентрацией бактериальных клеток 10^3 КОЕ/мл. Посев приготовленного инокулюма проводился в объеме 0,1 мл на

агаризованные питательные среды с добавкой с последующей инкубацией при температуре 37°C в течение 48 часов. В качестве контрольной среды был использован OFPBL Agar без добавления железа (III) гидроксид полимальтозата, на который засеивались те же отобранные штаммы. Оценка роста с фиксацией появления видимых колоний проводилась каждые 24 часа с последующим подсчетом колоний на каждой используемой среде.

Далее оценивался критерий продуктивности питательной среды. Для этого давшие видимый рост клетки подсчитывались, а их количество выражалось в процентах по трем показателям: менее 50%, 50–69%, 70% и более от общего количества клеток в инокулюме. Показатели продуктивности питательной среды на первые и вторые сутки культивирования микроорганизмов из ВСС представлены в таблицах 14 и 15.

Таблица 14 – Показатели продуктивности предлагаемой питательной среды в сравнении с OFPBL Agar на первые сутки культивирования

Показатель продуктивности	Предлагаемая питательная среда с различной концентрацией железа										OFPBL Agar	
	10 мг/л		20 мг/л		40 мг/л		80 мг/л		120 мг/л			
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
<50%	66	33	90	45	82	41	56	28	44	22	82	41
50–69%	22	11	0	0	18	9	20	10	32	16	10	5
≥70%	12	6	10	5	0	0	24	12	24	12	8	4

Таблица 15 – Показатели продуктивности предлагаемой питательной среды в сравнении с OFPBL Agar на вторые сутки культивирования

Показатель продуктивности	Предлагаемая питательная среда с различной концентрацией железа										OFPBL Agar	
	10 мг/л		20 мг/л		40 мг/л		80 мг/л		120 мг/л			
	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
<50%	54	27	38	19	36	18	24	12	28	14	52	26
50–69%	26	13	30	15	32	16	24	12	42	21	30	15
≥70%	20	10	32	16	32	16	52	26	30	15	18	9

n – количество штаммов в абсолютных значениях; % – доля от общего количества штаммов на среде с данной концентрацией.

После первых суток культивирования статистически достоверные различия ($p < 0,01$, при расчете критерия χ^2) были получены по предлагаемой питательной среде с концентрациями железа 80 мг/л и 120 мг/л по отношению к OFPBL Agar без добавки, содержащей железо и питательным средам с концентрацией железа 20 мг/л и 40 мг/л. На вторые сутки культивирования статистически достоверные различия ($p < 0,01$, при расчете критерия χ^2) были получены по предлагаемой питательной среде с концентрацией железа 80 мг/л по отношению к OFPBL Agar без добавки, содержащей железо и питательным средам с концентрацией железа 10 мг/л.

Проводя сравнение показателя продуктивности среды с железосодержащей добавкой в концентрациях 80 мг/л и 120 мг/л в первые и вторые сутки культивирования были получены данные о большем количестве штаммов ВСС в категории по продуктивности $\geq 70\%$ для среды, содержащей железо в концентрации 80 мг/л. Результаты сравнения по продуктивности сред с анализируемыми концентрациями приведены в таблицах 16 и 17.

Таблица 16 – Показатели продуктивности предлагаемой питательной среды с концентрацией 80 мг/л в первые и вторые сутки культивирования

Показатель продуктивности	Сутки		p
	1	2	
Менее 50	28 (56,0)	12 (24,0)	0,003
50-69	10 (20,0)	12 (24,0)	
Более или равно 70	12 (24,0)	26 (52,0)	

Таблица 17 – Показатели продуктивности предлагаемой питательной среды с концентрацией 120 мг/л в первые и вторые сутки культивирования

Категории	Сутки		p
	1	2	
Менее 50	22 (44,0)	14 (28,0)	0,248
50-69	16 (32,0)	21 (42,0)	
Более или равно 70	12 (24,0)	15 (30,0)	

Таким образом, можно сделать вывод, что использование добавки соответствующей концентрации железа 80 мг/л достоверно позволяет повысить показатель продуктивности агаризованных питательных сред для культивирования микроорганизмов ВСС на вторые сутки культивирования.

Полученные результаты продуктивности предлагаемой питательной среды подтвердили предположение о том, что использование органических форм железа позволяет сократить сроки культивирования микроорганизмов. Однако, при тестировании питательной среды были использованы чистые культуры бактерий из ВСС, но на практике из материала от пациентов с МВ могут выделяться десятки видов микроорганизмов различных родов, а добавление дополнительных компонентов может снизить показатель селективности питательных сред. В связи с этим необходимо провести испытания на селективность предлагаемой питательной среды в соответствии с клиническими рекомендациями 2014 года «Внутрилабораторный контроль

качества питательных сред для клинических микробиологических исследований».

6.3. Оценка влияния ростовой добавкой на селективность питательной среды для выделения *Burkholderia cepacia complex*

Для оценки селективности в чашку Петри с предлагаемой питательной средой с концентрацией железа 80 мг/л вносился инокулом суспензированных нецелевых микроорганизмов в количестве 10^6 КОЕ/мл. Нецелевыми микроорганизмами называют микроорганизмы, подавление роста которых требуется для обеспечения оптимального роста целевых микроорганизмов – в нашем случае представителей ВСС на приготовленной селективной питательной среде. Для контроля качества приготовленных инокулюмов и использованных штаммов нецелевых микроорганизмов параллельно осуществлялся посев на соответствующие неселективные плотные питательные среды (агар Мюллера-Хинтона, кровяной агар). В качестве контрольных штаммов нецелевых микроорганизмов были использованы коллекционные культуры *B.cepacia* ATCC 25416, *P.aeruginosa* ATCC 27853, *S.aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 25922, *E.faecalis* ATCC 29212. Результаты теста на селективность предлагаемой питательной среды для культивирования бактерий из ВСС и сравнение со стандартными питательными средами представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты испытания селективности предлагаемой питательной среды

Питательная среда	Условия, время и температура культивирования	Контрольные штаммы	Результат
Предлагаемая питательная среда	Аэробные, 48 часов, 37 °С	<i>B.cepacia</i> ATCC 25416	Рост
		<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Отсутствие роста

		<i>S.aureus</i> ATCC 6538	Отсутствие роста
		<i>E.coli</i> ATCC 25922	Отсутствие роста
		<i>E.faecalis</i> A TCC 29212	Отсутствие роста
Мюллера- Хинтона агар	Аэробные, 120 часов, 37 °С	<i>B.ceracia</i> ATCC 25416	Рост
		<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Рост
		<i>S.aureus</i> ATCC 6538	Рост
		<i>E.coli</i> ATCC 25922	Рост
		<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	Рост
Кровяной агар	Аэробные, 120 часов, 37 °С	<i>B.ceracia</i> ATCC 25416	Рост
		<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Рост
		<i>S.aureus</i> ATCC 6538	Рост
		<i>E.coli</i> ATCC 25922	Рост
		<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	Рост

По результатам испытания селективности предлагаемой питательной среды на вторые сутки культивирования был выявлен рост контрольного

штамма *B.ceracia* ATCC 25416 в количестве 10^6 КОЕ/мл, роста других контрольных штаммов отмечено не было. На стандартных питательных средах детектировался рост всех контрольных штаммов в количестве 10^6 КОЕ/мл, что отвечает стандартам качества оценки селективных питательных сред.

Тестирования предлагаемой питательной среды по критериям продуктивности и селективности были проведены с использованием коллекционных штаммов, либо чистых культур патогенов, выделенных из клинического материала пациентов с МВ. Однако, по результатам нашего исследования выявлено, что при бактериологическом посеве мокроты больных МВ в большинстве случаев микроорганизмы с доказанным клиническим значением выделяются в многокомпонентных ассоциациях с другими патогенами или представителями нормальной микрофлоры слизистых оболочек, что также может повлиять на сроки культивирования. В связи с чем дополнительно была проведена оценка скорости роста *Burkholderia ceracia* complex, выявляемых непосредственно при посеве клинического материала (мокроты) от 33 больных МВ с хроническим высевом ВСС на предлагаемую питательную среду и на коммерческий агар (OFPBL Agar). Полученные результаты сравнения сроков появления роста представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты сравнения сроков культивирования *Burkholderia ceracia* complex на коммерческом агаре и предлагаемой питательной среде при посеве мокроты от больных муковисцидозом

Вариант питательной среды	Сутки			p
	Me	Q ₁ – Q ₃	n	
Среда без железосодержащей добавки	4	3 – 5	33	< 0,001
Среда с железосодержащей добавкой	2	1 – 2	33	

В результате выявлено, что сроки культивирования при использовании питательной среды с железосодержащей добавкой составили по медиане 2 суток, что достоверно ниже, чем при использовании коммерческого агара без ростовой добавки, содержащей органическую соль железа (медиана сроков культивирования 4 суток).

6.4. Влияние железосодержащей ростовой добавки на результаты видовой идентификации представителей *Burkholderia cepacia complex* методом MALDI-ToF масс-спектрометрии

Добавление ростовых добавок при изготовлении питательных сред может повлиять не только на показатели продуктивности и селективности среды, но и на конечный результат видовой идентификации возбудителя. Доступность питательного субстрата, как и его недостаток могут послужить сигналом для бактериальной клетки, стимулируя адаптационные механизмы и повышая активность ферментативных систем, таким образом изменив белковый профиль микроорганизма. В связи с этим было принято решение оценить влияние ростовой добавки в виде железа (III) гидроксид полимальтозата на результат видовой идентификации бактерий из ВСС с помощью метода MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Для проведения исследования были отобраны 50 штаммов патогенов ВСС, выделенных из клинического материала пациентов с МВ с последующим посевом на два типа сред: коммерческую селективную OFPBL Agar без добавки и с железосодержащей добавкой. После 48 часов культивирования при температуре 37°C колонии штаммов, выросших на обеих средах, были нанесены на мишень прибора с последующим покрытием матрицей (α -циано-4-гидроксикоричная кислота) и идентификацией в автоматическом режиме.

По результатам идентификации с помощью программ flexAnalys 3.0 и MALDI Biotyper 3.0 Offline Classification были оценены два критерия:

количество пиков в полученных масс-спектрах и уровень коэффициента совпадения (Score).

После проведения анализа установлено, что при идентификации микроорганизмов, культивируемых на среде с анализируемой ростовой добавкой, количество полученных пиков оказалось достоверно больше и составило по медиане 94 (87–100), чем при идентификации патогенов, выращенных на коммерческой питательной среде, с количеством пиков по медиане 93 (78–95) ($p = 0,034$). Результат сравнения пиков, полученных при идентификации микроорганизмов, культивируемых на средах с добавкой и без добавки представлен на рисунке 23.

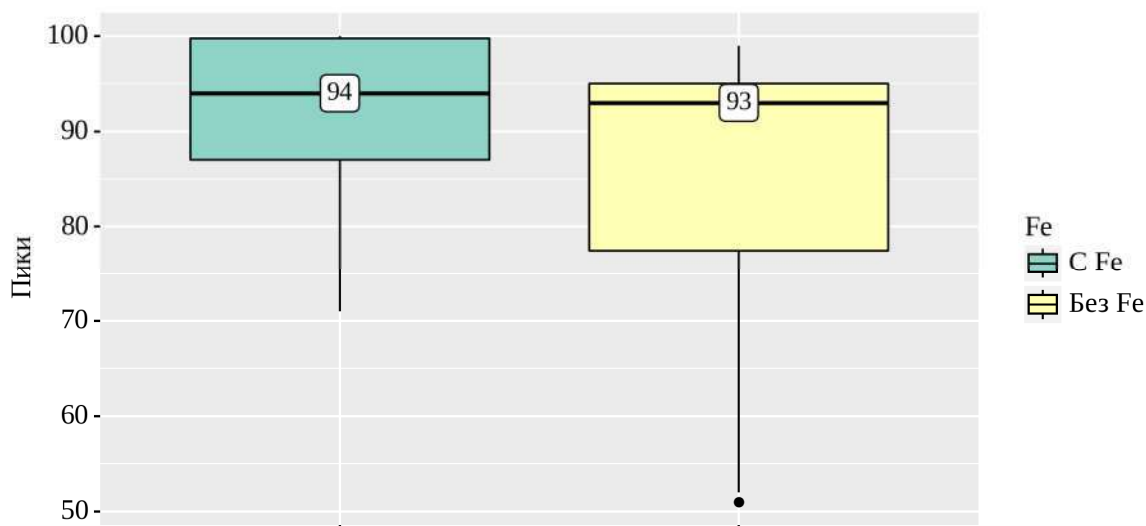


Рисунок 23 – Сравнение количества пиков в масс-спектрах, полученных при идентификации микроорганизмов из *Burkholderia ceracia* complex, культивированных на средах с железосодержащей добавкой и без добавки

Дополнительно был проведен анализ уровня коэффициента совпадения (Score), который также показал статистически значимые различия при сравнении идентификации штамм ВСС, культивированных на разных питательных средах. При определении видовой принадлежности всех включенных в эксперимент штаммов были получены уровни Score в диапазоне от 2,000 до 2,999, что соответствует критерию высокодостоверной

идентификации для вида. Однако, при проведении субтипирования по протеомным масс-спектрам, даже небольшая разница Score может иметь важное значение. Результаты сравнения Score, полученных при идентификации микроорганизмов ВСС, культивированных на средах с железосодержащей добавкой и без добавки представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты сравнения уровней коэффициента совпадения (Score) полученных при идентификации микроорганизмов из *Burkholderia ceracia* complex, культивированных на средах с железосодержащей добавкой и без добавки

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

Таким образом, для использования в микробиологической практике предложена питательная среда, содержащая в своем составе добавку в виде органической формы железа (III) гидроксид полимальтозата, являющегося эссенциальным фактором для роста и размножения некоторых групп бактерий. Концентрации железа 80 мг/л достоверно повышают показатель продуктивности питательной среды по сравнению с применяемыми на практике коммерческими селективными средами, при этом, не нарушая критериев селективности, что позволяет сократить сроки культивирования возбудителей ВСС, сохраняя их культуральные свойства. Также достоверно установлено, что использование ростовой добавки позволяет повысить качество идентификации методом MALDI-ToF масс-спектрометрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекционно-воспалительные осложнения в бронхолегочной системе по-прежнему остаются основной причиной смертности пациентов с МВ [16, 20, 74]. Описанные патогенетические особенности заболевания приводят к образованию вязкой, густой, трудноотделяемой мокроты, способствуя колонизации поверхности дыхательных путей больного различными микроорганизмами. Микробиота, выделяемая из респираторного тракта больных МВ, характеризуется значительным видовым разнообразием, что требует от врача-бактериолога особенного подхода к методам культивирования и идентификации [27, 65, 66].

Наиболее важным является своевременное выявление в респираторном тракте пациентов с МВ неферментирующих грамотрицательных бактерий как с уже доказанным клиническим значением, так и микроорганизмов, роль которых в развитии легочной патологии пока не установлена. В частности, первостепенное значение имеет высеивание представителей *Burkholderia cepacia* complex, являющихся одними из самых опасных патогенов для больных МВ. Природная резистентность к антибактериальным препаратам различных групп, приобретение устойчивости к новым антибиотикам и дезинфектантам, быстрая адаптация к изменениям условий окружающей среды, богатый «арсенал» факторов патогенности, способность к распространению среди пациентов за короткий период времени, в том числе и во внутрибольничных условиях – все эти свойства бактерий из ВСС способствуют хроническому инфицированию больных МВ с периодическими обострениями и вероятностью развития «цепация-синдрома» [42, 44, 87].

Безусловно, за последние годы методы микробиологических исследований значительно расширились и усовершенствовались, в том числе и для диагностики инфекционных осложнений при МВ: перечень используемых питательных сред расширяется, пополняясь коммерческими селективными и хромогенными агарам, а в рутинной практике все чаще используется метод MALDI-ToF масс-спектрометрии для точной видовой

идентификации возбудителя [9, 26, 106, 129]. Однако, при работе с материалом от пациентов с МВ остается ряд факторов влияющих на проведение бактериологического исследования: необходимость приема пациентом антибактериальных препаратов, нарушение правил взятия и транспортировки биоматериала, метаболические особенности микроорганизма, конкуренция с представителями других родов при культивировании, возникновение гетерогенных популяций – это только часть причин способных значительно увеличить сроки инкубации посевов и ухудшить качество проводимой идентификации, что может радикальным образом повлиять на проведении терапии и организации противоэпидемических мероприятий.

Также стоит учитывать, что микробиологический анализ позволяет лишь определить потенциального возбудителя, вызвавшего инфекционно-воспалительные осложнения в легких. Нередко можно отметить случаи, когда клиницист получает схожие результаты посевов, с одним и тем же патогеном в одинаковом количестве, как вне обострения инфекционного процесса, так и в периоды ухудшения состояния пациента. Помимо этого, очевидно, что бактериологические исследования не позволяют оценить состояние пациента и локальные изменения в его бронхолегочной системе в динамике или в определенный период, а также спрогнозировать возможное ухудшение. В связи с этим возникает потребность поиска дополнительных клинико-лабораторных показателей инфекционно-воспалительного процесса, вызванного в первую очередь НФГОб, с возможностью оценки их изменений в динамике для возможного прогнозирования состояния пациента. Субстратом для поиска предполагаемых маркеров может служить мокрота, как локальный патологический секрет непосредственно трахеобронхиального дерева, а методом ее исследования – биохимический анализ [12, 19, 30, 63, 78, 85, 118, 127, 136]. Также в качестве исследуемых аналитов предложены показатели обмена железа, как одного из ключевых метаболитов НФГОб [45, 48, 49, 57, 88, 99, 114, 141].

В связи с вышеописанным, в задачи нашего исследования входила не только оценка положения представителей НФГОБ в структуре микробиоты респираторного тракта пациентов с МВ, но и изучение их влияния на состояние макроорганизма. Определение показателей обмена железа в мокроте и сыворотки крови может показывать корреляцию с инфицирующей флорой и степенью тяжести инфекционно-воспалительного процесса в легких, а применение органических солей железа в качестве ростовой добавки может иметь благоприятный эффект для оптимизации культивирования и улучшения идентификации микроорганизмов из ВСС.

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

При анализе полученных результатов было определено, что доминирующей группой являются бактерии, не имеющие клинического значения в развитии легочной патологии у пациентов с МВ, выделенные в количестве 1060 штаммов, что представляет долю в 58% от общего числа выделенных микроорганизмов. К данной когорте, в соответствии с руководством по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей пациентов с муковисцидозом также были отнесены 37 штаммов *S.pneumoniae* и 80 бактерии из порядка *Enterobacterales*, выделенные в многокомпонентных ассоциациях с представителями нормальной микробиоты слизистых оболочек, в титрах от 10^2 до 10^4 КОЕ включительно, что является сомнительным критерием участия данных патогенов в инфекционно-воспалительном процессе легких [26]. В случаях выявления в количестве $\geq 10^5$ КОЕ в монокультуре либо в двухкомпонентных ассоциациях с бактериями нормальной орофарингеальной флоры, данные

микроорганизмы могут быть расценены как клинически значимые при сопутствующих клинических проявлениях.

Большое количество случаев выявления представителей нормальной микробиоты слизистых оболочек, а также сапрофитных представителей окружающей среды может быть связано с особенностями этиопатогенеза МВ, обусловленными образованием вязкой мокроты, которая плохо эвакуируется из бронхолегочного дерева. Последствия нарушения мукоцилиарного клиренса приводят к повышенной концентрации орофарингеальной микробиоты в мокроте, которая становится дополнительным субстратом для ее размножения. Также следует учитывать, что несоблюдение правил сбора образцов мокроты, обозначенных в методических указаниях 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», может быть причиной недостоверных результатов культурального метода исследования [14]. Значительное преобладание нормальной орофарингеальной микробиоты также может оказывать негативное влияние на выделение клинически значимых микроорганизмов в рамках бактериологического исследования. Данная проблема, с одной стороны, решается путем использования селективных добавок, которые подавляют рост сопутствующей флоры (например, среды для выделения ВСС). С другой стороны, в научной литературе практически нет данных об использовании в составе селективных сред специфических ростовых компонентов, которые являются лимитирующими факторами роста для клинически значимых микроорганизмов и могут быть использованы для улучшения качества проведения микробиологических исследований [11].

Группа бактерий, имеющих доказанное клиническое значение для пациентов с МВ, по результатам нашего исследования, была представлена 577 штаммами, что составило 31,5% от общего числа микроорганизмов. Лидирующее положение в данной группе занимал *S.aureus*, выделенный в 223 случаях, что является долей в 38,6% от общего числа выявленных

клинически значимых возбудителей. По литературным данным и информации регистра *S.aureus* является самым распространенным выявляемым патогеном и одним из первых колонизаторов респираторного тракта среди больных МВ [25].

Сопоставимыми оказались данные по распространенности бактерий ВСС, которые являются основной причиной развития бронхолегочных осложнений и смертности среди пациентов с МВ [7, 16, 20]. В результате исследования бактерии из *Burkholderia cepacia* complex были идентифицированы в количестве 214 штаммов и составили 37,1% в группе микроорганизмов, имеющих доказанное клиническое значение. Следует отметить, что микроорганизмы не отличались по культуральным и другим свойствам в случае выделения от пациентов, сдавших мокроту во время обострения и в период ремиссии, что значительно затрудняет оценку их клинического значения в конкретный момент течения заболевания и не дает возможности оценить риск развития «цепация-синдрома».

Следующим по частоте встречаемости патогеном был вид *P.aeruginosa*, представленный 109 штаммами и 18,9% в структуре клинически значимых микроорганизмов. Хроническая синегнойная инфекция также является прогностически неблагоприятным фактором для больных МВ [61, 151, 156, 158].

Оставшаяся часть клинически значимых микроорганизмов была представлена 20 штаммами *S.maltophilia*, 7 штаммами *A.xylosoxidans* и 4 штаммами *H.influenzae*, что в целом составило 5,4% группы.

Таким образом, выявлено, что бактерии с доказанной клинической значимостью образуют подавляющее большинство (83,3%) в структуре всех НФГОБ, выделенных из мокроты больных МВ Самарской области. Показано, что данные возбудители не только имеют первостепенно значение в инфекционно-воспалительных процессах НДП, но и достоверно снижают функцию легких пациентов с МВ [28, 138]. В случае с микроорганизмами ВСС необходимо отметить, что данные возбудители по частоте

встречаемости на первом месте среди выявленных НФГОБ и на втором в структуре всех клинически значимых патогенов. В связи с этим важное значение имеет качественная и своевременная микробиологическая диагностика не только при обострениях хронического инфицирования и риске развития «цепация-синдрома», когда временной ресурс ограничен, но и при раннем выявлении патогена, когда клинические проявления еще отсутствуют и вероятность эрадикации возбудителя выше. Полученные результаты по распространенности НФГОБ среди пациентов с МВ обосновывают необходимость разработки новых методов оценки их участия в инфекционном процессе, в том числе, и на основании клинико-лабораторных данных.

Изучив литературные данные, посвященные метаболизму НФГОБ, а также вариантам использования альтернативных биосубстратов пациента в целях диагностики его состояния, было принято решение оценить возможности анализа мокроты с помощью биохимических методов исследования, определяя изменения показателей обмена железа для дальнейшего поиска их корреляции с состоянием пациента и инфицирующим патогеном [70, 78, 118]. Однако, исследования мокроты с использованием биохимических анализаторов, предназначенных для работы с другими видами биологического материала, требует предварительного проведения валидации используемых методов, гарантирующей достоверность получаемых результатов.

В практике лабораторной службы существует опыт использования автоматизированных биохимических анализаторов для работы с альтернативными биологическими жидкостями, с предварительным проведением валидирующих мероприятий [18, 19].

В связи с тем, что в рутинной практике мокрота не используется в качестве биологического материала для биохимических исследований, а также отсутствуют общепринятые референтные величины определяемых в ней показателей, первоначально были определены коэффициенты

внутрииндивидуальной биологической вариации ($CV_i\%$) для показателей обмена железа среди клинически здоровой группы курильщиков ($n=10$). Определение коэффициентов CV_i позволило в дальнейшем провести расчет общей аналитической ошибки и продолжить валидацию методик.

Валидация правильности биохимических методик исследования с расчетом общей аналитической ошибки проводилась на основании протокола CLSI EP15-A2. Проведен анализ 20 проб валидируемым нами методом и методами сравнения. Полученные результаты позволили определить аналитическое смещение и стандартное отклонение различий, что в свою очередь позволяет определить доверительные границы валидируемой методики. По итогу, в соответствии с ГОСТом Р 53133.1-2008 была рассчитана общая аналитическая ошибка ($Tea\%$), составившая для железа 34,3%, для ферритина 33,7% и для трансферрина 30%.

В соответствии с протоколом CLSI EP-6A были определены рабочие диапазоны биохимической методики исследования: для железа они составили 2-72,5 мкмоль/л, для ферритина – 22-295 мкг/л, для трансферрина – 0,017-0,074 г/л. Высокие значения ферритина, определяемые у пациентов с муковисцидозом, требуют предварительного разведения 1:20 – 1:60.

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

Для валидации прецизионности биохимических методик исследования показателей обмена железа в мокроте был использован протокол CLSI EP5-A2. Первоначально было необходимо вычислить межсерийный коэффициент вариации ($CV\%$), составивший для железа 4,65%, для ферритина 2,56%, для трансферрина 6,02%. Полученные результаты вместе с определенными до

этого значениями общей аналитической ошибки и аналитического смещения, позволили определить аналитическую эффективность методики, соответствующую превосходному уровню приемлемости для железа и ферритина, и хорошему уровню приемлемости для трансферрина.

Установлено соответствие внутрисерийной невоспроизводимости метода исследования показателей обмена железа в мокроте критериям Приказа № 45 от 07.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» и ГОСТа Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические, контроль качества клинических лабораторных исследований», часть 1 «Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях».

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

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

По результатам биохимического исследования мокроты было выявлено, что у пациентов с МВ содержание железа и ферритина в мокроте значительно выше, чем у пациентов с другими нозологиями ($p < 0,05$). При биохимическом анализе сыворотки крови были выявлены статистически значимые различия по уровню железа и ферритина, у пациентов с МВ эти показатели были достоверно ниже, чем у пациентов с бронхитом и пневмонией ($p < 0,05$). По наблюдениям зарубежных исследователей известно, что пациенты с МВ склонны к железodefицитным состояниям, при этом также отмечено высокое содержание железа и железосодержащих белков в НДП [95, 103]. Возможно, это связано с хроническим инфицированием респираторного тракта больных МВ специфическими НФГОБ, обычно не контаминирующими дыхательные пути здоровых людей и пациентов с другими заболеваниями. Особенности метаболизма НФГОБ могут быть причиной такого рода изменений содержания железа и железосвязывающих белков в мокроте и крови [67, 93]. В связи с этим нами был проведен анализ результатов бактериологического посева мокроты всех трех групп пациентов, выявивший преобладание НФГОБ у пациентов с МВ: у четырех пациентов выделены бактерии из ВСС, у троих идентифицированы штаммы *P.aeruginosa*, по одному – *A.xylosoxidans* и *S.maltophilia*. Наряду с этим, в группе пациентов с пневмонией было выделено четыре штамма НФГОБ – по два случая выявления *P.aeruginosa* и *A.baumannii*, а преобладающей микробиотой были представители грамположительных микроорганизмов ($n=9$). В группе пациентов с бронхитом также преобладали грамположительные возбудители ($n=9$), а НФГОБ были выделены лишь в трех случаях: определен один штамм *A.baumannii* и два штамма *P.aeruginosa*.

Полученные результаты позволяют предположить зависимость содержания железа и железосвязывающих белков в мокроте и сыворотке крови с выделенными микроорганизмами среди больных МВ. В связи с этим следующим этапом нашей работы было обследование большего количества пациентов с МВ.

За период проведения исследования было обследовано 88 пациентов с МВ Самарской области. Обследование также включало в себя предварительное микробиологическое исследование мокроты, по результатам которого пациенты бы ли разделены на 2 группы: к первой группе были отнесены пациенты, инфицированные НФГОб с доказанным клиническим значением (n=67), ко второй – пациенты, по результатам посева мокроты которых были выявлены другие микроорганизмы (n=21).

Проведенное биохимическое исследование показало достоверные различия между группами по содержанию железа и ферритина в мокроте: уровень железа в группе с НФГОб по медиане составил 16,10 (6,60–37,80) мкмоль/л, ферритина 831,60 (207,50–4609,10) мкг/л. Трансферрин в мокроте обнаружен не был, либо его содержание было ниже пороговых значений применяемого метода. В группе пациентов с высевом другой микробиоты показатели обмена железа в мокроте значительно ниже, уровень железа по медиане был равен 3,05 (2,15–4,53) мкмоль/л, ферритина 45,32 (24,00–95,35) мкмоль/л; трансферрин также не был обнаружен (Рисунок 24).



Рисунок 24 – Сравнение содержания железа и ферритина в мокроте пациентов с муковисцидозом по результатам микробиологического исследования

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



Рисунок 25 – Сравнение содержания железа, ферритина, трансферрина в сыворотке крови пациентов с муковисцидозом по результатам микробиологического исследования

По полученным результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что высокое содержание железа и железосвязывающих белков в мокроте больных МВ достоверно связано с выявлением НФГОб. Также, можно предположить, что хроническое инфицирование НФГОб может быть причиной железодефицита, а соответственно развития анемий у пациентов с МВ. Закономерно возникает вопрос можно ли использовать показатели

обмена железа для оценки активности инфекционно-воспалительного процесса в легких и прогноза развития осложнений?

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

С помощью проведения ROC-анализа установлены пороговые значения PCV для ферритина и приемлемые уровни чувствительности и специфичности в рамках оценки риска осложнения инфекционного процесса у пациентов с муковисцидозом (Рисунки 26-28).

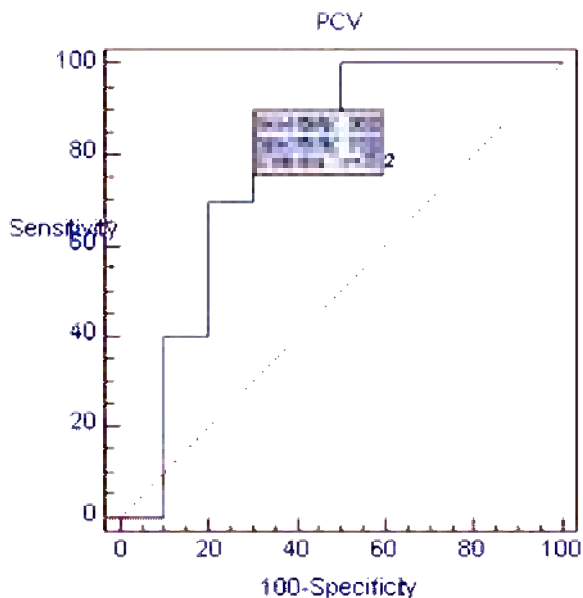


Рисунок 26 – ROC-кривая, характеризующая зависимость PCV для ферритина в мокроте у пациентов с муковисцидозом вне обострения и при обострении без высева микроорганизмов из ВСС (AUC-0,790; $p < 0,05$; пороговое значение: $\leq 37,2\%$)

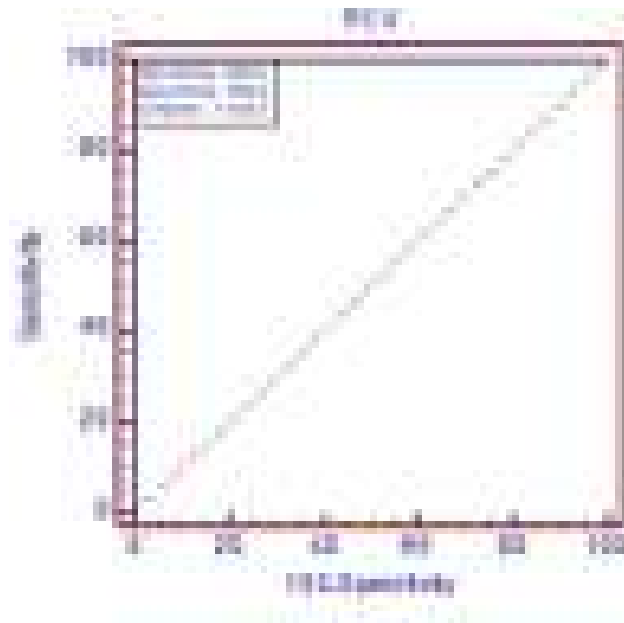


Рисунок 27 – ROC-кривая, характеризующая зависимость PCV для ферритина в мокроте у пациентов с муковисцидозом при обострении без высева микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex и при обострении с высевом микроорганизмов из *Burkholderia cepacia* complex (AUC-1,000; $p < 0,001$; пороговое значение: $\leq 45,7\%$)

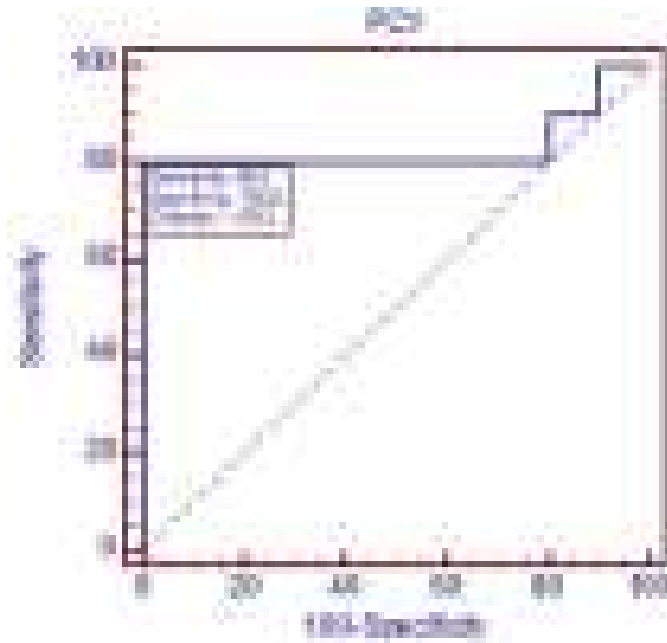


Рисунок 28 – ROC-кривая, характеризующая зависимость PCV для ферритина в мокроте у пациентов с МВ при обострении с высевом микроорганизмов из ВСС и при «цепация-синдроме» (AUC-0,830; $p < 0,05$; пороговое значение: $> 78,3\%$)

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

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

Известно, что железо является эссенциальным микроэлементом для бактерий ВСС, обеспечивающим процессы жизнедеятельности микробной клетки. Доступность железа в окружающей среде является лимитирующим фактором роста большинства микроорганизмов [36, 53, 98, 114]. Применение железа в качестве ростовой добавки может повысить показатель продуктивности питательной среды, что в свою очередь позволит сократить сроки культивирования патогенов из ВСС. Данный факт является одной из приоритетных задач при микробиологическом обследовании пациента с МВ в период ухудшения состояния. По результатам нашего исследования было предложено использование железа (III) гидроксид полимальтозата в качестве ростовой добавки при приготовлении селективных плотных питательных сред для выделения бактерий ВСС для первичного посева клинического материала от больных МВ. Добавление железа (III) гидроксид полимальтозата в количестве, соответствующем 80 мг или 120 мг железа на один литр агаризованной среды достоверно повышает показатель

продуктивности по сравнению с коммерческой селективной питательной средой OFPBL Agar ($p < 0,01$). Также, по результатам эксперимента, было установлено, что предлагаемая питательная среда соответствует критериям селективности, указанным в клинических рекомендациях 2014 года «Внутрилабораторный контроль качества питательных сред для клинических микробиологических исследований».

Далее проведена оценка влияния добавления железосодержащей ростовой добавки на результаты идентификации методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Проведенное исследование на 50 штаммах бактерий ВСС, выделенных из мокроты пациентов с МВ показало, что штаммы, культивируемые на питательных средах с предложенной добавкой, достоверно лучше проходят видовую идентификацию. При определении видовой принадлежности бактерий, культивированных на питательной среде с железосодержащей добавкой, получено большее количество масс-спектров, чем при идентификации штаммов, выращенных на коммерческой питательной среде OFPBL Agar, полученные различия статистически значимы ($p < 0,05$). Также достоверно определено повышение показателя Score в результате идентификации ВСС при использовании предлагаемой питательной среды в сравнении с применением коммерческой селективной питательной среды OFPBL Agar ($p < 0,001$). В литературных источниках также имеются достоверные данные, подтверждающие изменения качества идентификации микроорганизмов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии при использовании различных концентраций лимитирующих факторов роста в питательных средах [11].

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

Полученные результаты исследования позволяют предложить алгоритм обследования пациентов с муковисцидозом в состоянии обострения инфекционно-воспалительного процесса для верификации непосредственного участия в нем патогенов из *Burkholderia cepacia* complex. Алгоритм представлен на рисунке 29.

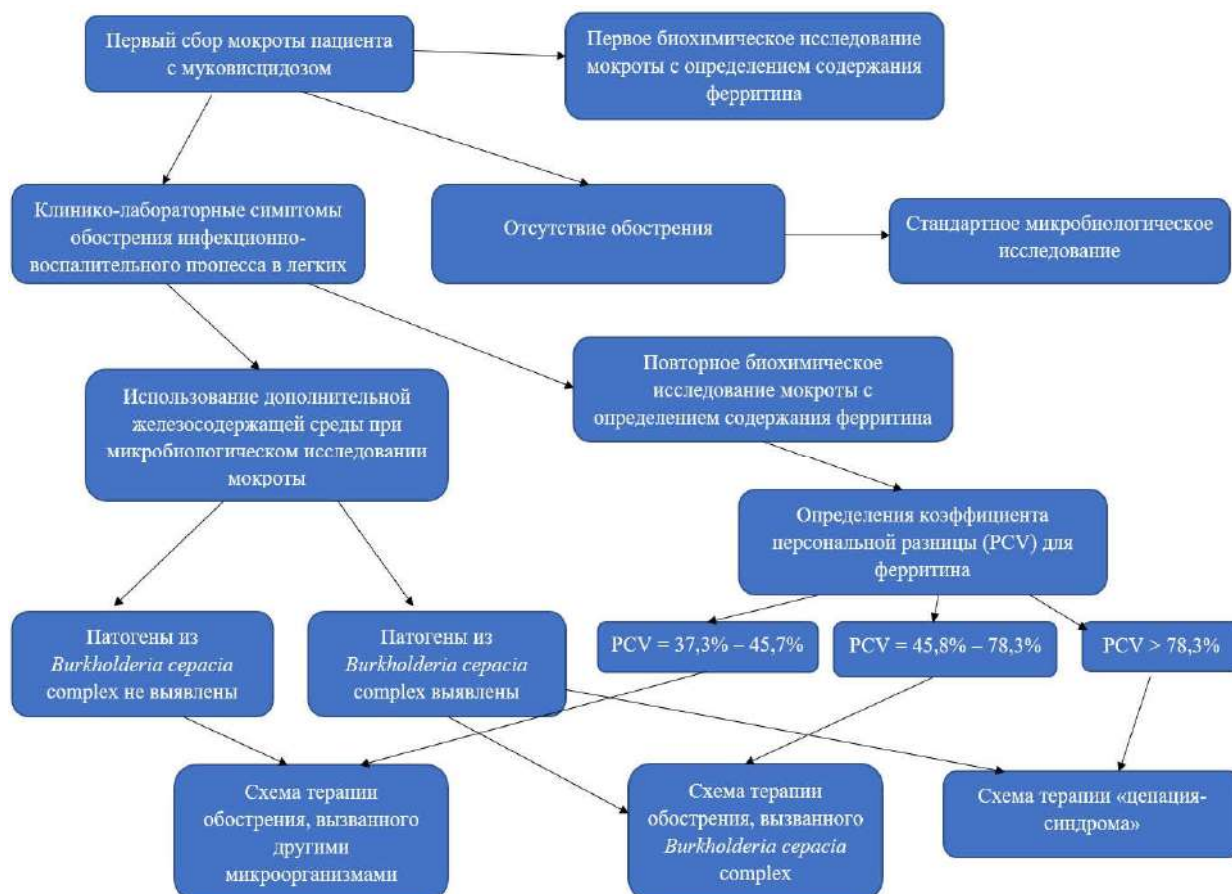


Рисунок 29 – Алгоритм обследования пациентов с муковисцидозом в состоянии обострения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте

Таким образом, предлагаемый алгоритм обследования пациентов с МВ основанный на использовании дополнительных клинико-лабораторных критериев диагностики инфекционно-воспалительных процессов в легких может быть использован для прогнозирования риска развития осложнений, вызванных представителям ВСС с последующим выбором схемы

антибактериальной терапии, а разработанная питательная среда, содержащая ростовую добавку в виде железа (III) гидроксида полимальтозата позволяет сократить сроки микробиологического обследования и может быть использована в случае развития обострения у пациентов с МВ.

ВЫВОДЫ

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для специалистов клинико-диагностических лабораторий рекомендовано применение биохимических исследований мокроты с использованием стандартизированной процедуры пробоподготовки при проведении преаналитического этапа (Патент РФ № 2686052).
2. Для оценки клинической значимости изменения уровня ферритина в мокроте больных муковисцидозом врачам-педиатрам и врачам-пульмонологам рекомендуется определять коэффициент персональной разницы (PCV%) с последующим ранжированием пациентов по течению инфекционного процесса (Патент РФ № 2789114).
3. Для врачей-бактериологов и медицинских микробиологов рекомендовано применение ростовой добавки в виде железа (III) гидроксид полимальтозата в количестве, соответствующем концентрации железа 80 мг/л для повышения показателя продуктивности плотной питательной среды и сокращения сроков выделения микроорганизмов *Burkholderia cepacia* complex из клинического материала от пациентов с муковисцидозом (Патент РФ № 2759831).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВДП	–	Верхние дыхательные пути		
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения		
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота		
ИРТ	–	Иммунореактивный трипсиноген		
КОЕ	–	Колониеобразующие единицы		
МВ	–	Муковисцидоз		
МВТР	–	Трансмембранный регулятор муковисцидоза		
НДП	–	Нижние дыхательные пути		
НФГОБ	–	Неферментирующие грамотрицательные бактерии		
цАМФ	–	Циклический аденозинмонофосфат		
АТСС	–	American Type Culture Collection		
ВСС	–	<i>Burkholderia cepacia</i> complex		
CFTR	–	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator		
CLSI	–	Clinical and Laboratory Standards Institute		
MALDI-ToF	–	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight		
PCV	–	Personal change value		
RCV	–	Reference	critical	value

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активация антипротеиназ в бронхиальном регионе – фактор толерантности формирования хронической обструктивной болезни легких у здоровых злостных курильщиков / Г. Э. Черногорюк, А. А. Михайлова, С. В. Федосенко [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2010. – Т. 30, № 3. – С. 124–129.
2. Аспергиллез легких у больных муковисцидозом в Российской Федерации / Я. И. Козлова, Ю. В. Борзова, О. В. Шадринова [и др.] // Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10, № 2. – С. 48–54.
3. Атаджанян, А. С. Сравнительная эффективность внутривенных и таблетированных препаратов железа у беременных с анемией / А. С. Атаджанян, М. С. Зайнулина, Е. А. Малаховская // Журнал акушерства и женских болезней. – 2019. – Т. 68, № 2. – С. 23–32.
4. Биологическая вариация: от теории к практике / Каллум Г. Фрейзер ; пер. с англ. И. А. Арефьевой. – Москва : Медиздат, 2010. – 168 с. : ил.
5. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза / ред. Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов. – Санкт–Петербург : Интермедика, 2002. – 256 с.
6. Зорин, Н. А. Роль белков семейства макроглобулинов в регуляции воспалительных реакций / Н. А. Зорин, В. Н. Зорина, Р. М. Зорина // Биомедицинская химия. – 2006. – Т. 52, № 3. – С. 229–238.
7. Инфицирование респираторного тракта микроорганизмами *V.серасiа complex* как неблагоприятный прогностический фактор у больных муковисцидозом / С. А. Красовский, М. В. Афанасьева, Е. Л. Амелина [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2019. – № 2(116). – С. 89–94.
8. Капранов, Н. И. Муковисцидоз. Современные достижения и актуальные проблемы : методические рекомендации / Н. И. Капранов, Н. Ю. Каширская. – изд. 4-е. – Москва : Медико-генетический научный центр РАМН, 2011. – 124 с.

9. Кондратенко, О. В. Комплексный подход к микробиологической диагностике бактериальных осложнений при муковисцидозе : специальность 03.02.03 «Микробиология» : диссертация на соискание степени доктора медицинских наук / Кондратенко Ольга Владимировна ; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. – Самара, 2020. – 264 с.
10. Кондратенко, О. В. Особенности биологических свойств и факторов патогенности неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделенных от пациентов с муковисцидозом / О. В. Кондратенко // Аспирантский вестник Поволжья. – 2012. – № 1–2. – С. 251–253.
11. Лямин, А. В. Новые подходы к культивированию и идентификации кислотоустойчивых представителей порядка Actinomycetales, выделенных из клинического материала : специальность 03.02.03 «Микробиология» : диссертация на соискание степени доктора медицинских наук / Лямин Артем Викторович ; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. – Челябинск, 2020. – 240 с.
12. Миелопероксидаза и лактоферрин у больных муковисцидозом / Е. А. Суркова, Т. В. Булгакова, Т. С. Сологуб [и др.] // Медицинская иммунология. – 2004. – Т. 6, № 1–2. – С. 67–74.
13. Микробные сидерофоры: строение, свойства и функции / В. В. Леонов, А. Ю. Миронов, И. В. Ананьина [и др.] // Астраханский медицинский журнал. 2016. – Т. 11, № 4. – С. 24–37.
14. МУ 4.2.2039-05 Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории : методические указания : утверждены и введены в действие Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 23 декабря 2005 г. – Текст : электронный // Техэксперт. Консорциум Кодекс. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200044664> (дата обращения: 23.11.2021).

15. Муковисцидоз (клиническая картина, диагностика, лечение, реабилитация, диспансеризация) : учебное пособие для врачей / А. В. Орлов, О. И. Симонова, Е. А. Рославцева [и др.]. – Санкт–Петербург : СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2014. – 160 с.
16. Муковисцидоз / под ред. Н. И. Капранова, Н. Ю. Каширской. – Москва : Медпрактика-М, 2014. – 672 с.
17. Муковисцидоз: генетика, клиника, патогенез, диагностика, лечение, профилактика : методическое пособие / ред. В. Г. Вахарловский. – Санкт–Петербург, 2012. – 35 с.
18. Мурский, С. И. Роль биохимических показателей спермальной плазмы в лабораторной диагностике репродуктивной функции у мужчин : специальность 14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика» : диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук / Мурский Сергей Иванович ; ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС России. – Санкт–Петербург, 2020. – 197 с.
19. Мурский, С. И. О возможности использования рутинных биохимических методик для исследования альтернативных биологических жидкостей человека / С. И. Мурский // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 4, № 35(410). – С. 54–57.
20. Национальный консенсус. Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия / под ред. Е. И. Кондратьевой, Н. Ю. Каширской, Н. И. Капранова. – Москва : Компания БОРГЕС, 2016. – 205 с.
21. Основные тенденции в изменении разнообразия буркхолдерий, инфицирующих российских больных муковисцидозом / О. Л. Воронина, Н. Н. Рыжова, М. С. Кунда [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2019. – № 2. – С. 89–94.

22. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология / А. В. Лазарева, И. В. Чеботарь, О. А. Крыжановская [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 170–186.
23. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации (2013 год) / коллектив авторов. – Москва : Медпрактика–М, 2015. – 64 с.
24. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации (2018 год) / под ред. Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой [и др.]. – Москва : Медпрактика–М, 2020. – 68 с.
25. Респираторная инфекция нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом в Российской Федерации по данным Национального регистра (2014) / С. А. Красовский, Е. Л. Амелина, Е. И. Кондратьева [и др.] // Пульмонология. – 2016. – Т. 26, № 4. – С. 421–435.
26. Руководство по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом / С. В. Поликарпова, С. В. Жилина, О. В. Кондратенко [и др.]. – Тверь, 2019. – 128 с.
27. A Phylogeny-Informed Proteomics Approach for Species Identification within the *Burkholderia cepacia* Complex / H. Wang, O. H. Cissé, T. Bolig [et al.]. – Text : electronic // Journal of clinical microbiology. – 2020. – Oct. 21, vol. 58(11). – e01741–20. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32878952/> (date of access: 19.09.2021).
28. A practical molecular identification of nonfermenting Gram-negative bacteria from cystic fibrosis / C. Capizzani, N. C. Caçador, E. A. Marques [et al.] // Brazilian journal of microbiology. – 2018. – Vol. 49(2). – P. 422–428.
29. *Achromobacter* Infections and Treatment Options / B. Isler, T. J. Kidd, A. G. Stewart [et al.]. – Text : electronic // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2020. – Vol. 64(11). – e01025-20. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32816734/> (date of access: 19.09.2021).

30. Acute effects of combined exercise and oscillatory positive expiratory pressure therapy on sputum properties and lung diffusing capacity in cystic fibrosis: a randomized, controlled, crossover trial / T. Radtke, L. Böni, P. Bohnacker [et al.]. – Text : electronic // BMC pulmonary medicine. – 2018. – Jun. 14, vol. 18(1). – 99. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29898704/> (date of access: 09.03.2020).
31. Aerosol phage therapy efficacy in Burkholderia cepacia complex respiratory infections / D. D. Semler, A. D. Goudie, W. H. Finlay [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2014. – Vol. 58, N 7. – P. 4005–4013.
32. Airway iron and iron-regulatory cytokines in cystic fibrosis / D. W. Reid, Q. T. Lam, H. Schneider [et al.] // The European respiratory journal. – 2004. – Vol. 24(2). – P. 286–291.
33. Airway Mucins Inhibit Oxidative and Non-Oxidative Bacterial Killing by Human Neutrophils / A. M. Cantin, C. Ouellet, A. Cloutier [et al.]. – Text : electronic // Frontiers in pharmacology. – 2020. – Sep. 30, vol. 11. – 554353. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33101020/> (date of access: 19.09.2021).
34. Akil, N. Biology and management of methicillin resistant Staphylococcus aureus in cystic fibrosis / N. Akil, M. S. Muhlebach // Pediatric pulmonology. – 2018. – Vol. 53(S3). – P. S64–S74.
35. Alves, C. Cystic fibrosis-related diabetes: an update on pathophysiology, diagnosis, and treatment / C. Alves, T. Della-Manna, C. Albuquerque // Journal of pediatric endocrinology & metabolism. – 2020. – Vol. 33(7). – P. 835–843.
36. Bacterial iron detoxification at the molecular level / J. M. Bradley, D. A. Svistunenko, M. T. Wilson [et al.] // The Journal of biological chemistry. – 2020. – Vol. 295(51). – P. 17602–17623.
37. Bacterial resistance in pneumonia in developing countries—a role for iron chelation / S. Islam, M. J. Chisti, M. Ahmed [et al.]. – Text : electronic // Tropical Medicine and Infectious Disease. – 2019. – Vol. 4, N 2. – 59. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30974759/> (date of access: 19.09.2021).

38. Biogeochemical forces shape the composition and physiology of polymicrobial communities in the cystic fibrosis lung / R. A. Quinn, Y. W. Lim, H. Maughan [et al.]. – Text : electronic // *mBio*. – 2014. – Vol. 5(2). – e00956-13. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24643867/> (date of access: 19.09.2021).
39. Biosynthesis of albomycin $\delta 2$ provides a template for assembling siderophore and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitor conjugates / Y. Zeng, A. Kulkarni, Z. Yang [et al.] // *ACS Chemical Biology*. – 2012. – Vol. 7(9). – P. 1565–1575.
40. Blanchard, A. C. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease / A. C. Blanchard, V. J. Waters // *Semin. Respir. Crit. Care Med*. – 2019. – Vol. 40(06). – P. 727–736.
41. Boucher, R. C. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy / R. C. Boucher // *Annual review of medicine*. – 2007. – Vol. 58. – P. 157–170.
42. Branstetter, J. W. Management of Cepacia Syndrome With a Combination of Intravenous and Inhaled Antimicrobials in a Non-Cystic Fibrosis Pediatric Patient / J. W. Branstetter, A. Yarbrough, C. Poole // *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics*. – 2020. – Vol. 25(8). – P. 730–734.
43. Brown, S. D. Keep them breathing: Cystic fibrosis pathophysiology, diagnosis, and treatment / S. D. Brown // *Journal of the American Academy of Physician Assistants*. – 2017. – Vol. 30(5). – P. 23–27.
44. Burkholderia cenocepacia Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches / V. C. Scoffone, L. R. Chiarelli, G. Trespidi [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Aug. 22. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01592/full> (date of access: 19.09.2021).
45. Burkholderia cenocepacia utilizes ferritin as an iron source / P. W. Whitby, T. M. Vanwagoner, J. M. Springer [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – Vol. 55. – P. 661–668.

46. Burkholderia cepacia complex: clinical course in cystic fibrosis patients / T. W. Folescu, C. H. da Costa, R. W. Cohen [et al.]. – Text : electronic // BMC pulmonary medicine. – 2015. – Vol. 15. – 158. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26642758/> (date of access: 19.09.2021).
47. Burkholderia cepacia Sepsis in a Previously Healthy Full-Term Infant / C. Jr. Carmona, A. Marante, F. Levent [et al.]. – Text : electronic // Case reports in pediatrics. – 2020. – Oct. – 8852847. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/344866836> (date of access: 19.09.2021).
48. Butt, A. T. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of Burkholderia complex / A. T. Butt, M. S. Thomas // Biometals. – 2008. – Vol. 21(1). – P. 105–106.
49. Butt, A. T. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of Burkholderia Species / A. T. Butt, M. S. Thomas. – Text : electronic // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2017. – Nov. 6, vol. 7. – 460. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29164069/> (date of access: 19.09.2021).
50. Castellani, C. Cystic fibrosis: a clinical view / C. Castellani, B. M. Assael // Cellular and molecular life sciences. – 2017. – Vol. 74(1). – P. 129–140.
51. Caza, M. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans / M. Caza, J. W. Kronstad. – Text : electronic // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2013. – Nov. 19, N. 3. – 80. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312900/> (date of access: 19.09.2021).
52. Cezard, C. Chemistry and biology of pyoverdines, pseudomonas primary siderophores / C. Cezard, N. Farvacques, P. Sonnet // Current Medicinal Chemistry. – 2015. – Vol. 22(2). – P. 165–186.
53. Chandrangsu, P. Metal homeostasis and resistance in bacteria. Nature reviews / P. Chandrangsu, C. Rensing, J. D. Helmann // Microbiology. – 2017. – Vol. 15(6). – P. 338–350.
54. Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in Pseudomonas aeruginosa / P. J. Wilderman, A. I. Vasil, Z. Johnson [et al.] // Infection and Immunity. – 2001. – Vol. 69, N 9. – P. 5385–5394.

55. Chedevergne, F. Prevention of osteoporosis in cystic fibrosis / F. Chedevergne, I. Sermet-Gaudelus // *Current opinion in pulmonary medicine*. – 2019. – Vol. 25(6). – P. 660–665.
56. Chodorowska, G. C-reactive protein and α 2-macroglobulin plasma activity in medium-severe and severe psoriasis / G. Chodorowska, D. Wojnowska, M. Juskiewicz-Borowiec // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2004. – Vol. 18(2). – P. 180–183.
57. Cornelis, P. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections / P. Cornelis, J. Dingemans. – Text : electronic // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2013. – Nov. 14, vol. 3. – 75. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24294593/> (date of access: 19.09.2021).
58. Corriveau, S. Cystic fibrosis survival: the changing epidemiology / S. Corriveau, J. Sykes, A. L. Stephenson // *Current opinion in pulmonary medicine*. – 2018. – Vol. 24(6). – P. 574–578.
59. Cystic fibrosis bone disease: Pathophysiology, assessment and prognostic implications / A. Anabtawi, T. Le, M. Putman [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2019. – Vol. 18, Suppl 2. – P. S48–S55.
60. Cystic Fibrosis Diagnosis in Newborns, Children, and Adults / C. Castellani, B. Linnane, L. Pranke [et al.] // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. – 2019. – Vol. 40(6). – P. 701–714.
61. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection / A. Y. Bhagirath, Y. Li, D. Somayajula [et al.]. – Text : electronic // *BMC pulmonary medicine*. – 2016. – Dec. 5, vol. 16(1). – 174. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24294593/> (date of access: 19.09.2021).
62. Cystic fibrosis related diabetes: Pathophysiology, screening and diagnosis / A. Granados, C. L. Chan, K. L. Ode [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2019. – Vol. 18, suppl 2. – P. S3–S9.

63. Cytokine concentration in sputum from patients with cystic fibrosis and their relation to eosinophil activity / D. Y. Koller, I. Neithing, J. Otto [et al.] // *American journal of respiratory and critical care medicine*. – 1997. – Vol. 155. – P. 1050–1054.
64. De Boeck, K. The diagnosis of cystic fibrosis / K. De Boeck, F. Vermeulen, L. Dupont // *Presse medicale (Paris, France : 1983)*. – 2017. – Vol. 46(6 Pt 2). – P. e97–e108.
65. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis / A. AbdulWahab, S. J. Taj-Aldeen, E. B. Ibrahim [et al.] // *Infection and drug resistance*. – 2015. – Vol. 8. – P. 83–88.
66. Ecological Succession of Polymicrobial Communities in the Cystic Fibrosis Airways / R. A. Khanolkar, S. T. Clark, P. W. Wang [et al.]. – Text : electronic // *mSystems*. – 2020. – Vol. 5(6). – e00809-20. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33262240/> (date of access: 19.09.2021).
67. Elevated metal concentrations in the CF airway correlate with cellular injury and disease severity / D. J. Smith, G. J. Anderson, S. C. Bell [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2014. – Vol. 13(3). – P. 289–295.
68. Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis: 25 years of observational research / M. W. Konstan, D. J. Pasta, D. R. VanDevanter [et al.] // *Pediatric pulmonology*. – 2021. – Vol. 56(5). – P. 823–836.
69. Epidemiology of bacteremia caused by uncommon non-fermentative gram-negative bacteria / P. Rattanaumpawan, P. Ussavasodhi, P. Kiratisin [et al.]. – Text : electronic // *BMC infectious diseases*. – 2013. – Apr. 8, vol. 13. – 167. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23566113/> (date of access: 19.09.2021).
70. Essential trace elemental levels (zinc, iron and copper) in the biological samples of smoker referent and pulmonary tuberculosis patients / P. Nizamani, H. I. Afridi, T. G. Kazi, [et al.] // *Toxicology reports*. – 2019. – Nov. 15, N 6. – P. 1230–1239.

71. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients / T. W. R. Lee, K. G. Brownlee, S. P. Conway [et al.] // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2003. – Vol. 2, issue 1. – P. 29–34.
72. Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways / R. C. Hunter, F. Asfour, J. Dingemans [et al.]. – Text : electronic // *mBio*. – 2013. – Vol. 4(4). – e00557-13. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23963183/> (date of access: 19.09.2021).
73. Françoise, A. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease / A. Françoise, G. Héry-Arnaud. – Text : electronic // *Genes (Basel)*. – 2020. – May 11, vol. 11(5). – 536. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32403302/> (date of access: 19.09.2021).
74. Garcia, B. Pulmonary Complications of Cystic Fibrosis / B. Garcia, P. A. Flume // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. – 2019. – Vol. 40(6). – P. 804–809.
75. Genetic variation in CFTR and modifier loci may modulate cystic fibrosis disease severity / A. Paranjapye, M. Ruffin, A. Harris [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2020. – Vol. 19, suppl 1(Suppl 1). – P. S10–S14.
76. Górska, A. Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the ‘Trojan horse’ strategy / A. Górska, A. Sloderbach, M. P. Marszał // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2014. – Vol. 35(9). – P. 442–449.
77. Goss, C. H. Acute Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis / C. H. Goss // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. – 2019. – Vol. 40(6). – P. 792–803.
78. Hemosiderin in sputum macrophages may predict infective exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective observational study / S. Mohan, T. Ho, M. Kjarsgaard [et al.]. – Text : electronic // *BMC pulmonary medicine*. – 2017. – Vol. 17(1). – 60. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28403845/> (date of access: 19.09.2021).

79. Horsley, A. Antibiotic treatment for Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation / A. Horsley, A. M. Jones, R. Lord. – Text : electronic // The Cochrane database of systematic reviews. – 2016. – Jan. 20. – CD009529. – URL: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD009529.pub3/full> (date of access: 19.09.2021).
80. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron / M. A. Fischbach, H. Lin, D. R. Liu [et al.] // Nature chemical biology. – 2006. – Vol. 2(3). – P. 132–138.
81. Huszczyński, S. M. The Role of Pseudomonas aeruginosa Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology / S. M. Huszczyński, J. S. Lam, C. M. Khursigara. – Text : electronic // Pathogens (Basel, Switzerland). – 2019. – Dec. 19, vol. 9(1). – 6. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31861540/> (date of access: 19.09.2021).
82. Identification of Gram negative non-fermentative bacteria: How hard can it be? / T. Whistler, O. Sangwichian, P. Jorakate [et al.]. – Text : electronic // PLoS neglected tropical diseases. – 2019. – Sep. 30, vol. 13(9). – e0007729. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31568511/> (date of access: 19.09.2021).
83. Immunomodulation in Cystic Fibrosis: Why and How? / V. D. Giacalone, B. S. Dobosh, A. Gaggar [et al.]. – Text : electronic // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21(9). – 3331. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32397175/> (date of access: 19.09.2021).
84. Increased airway iron as a potential factor in the persistence of Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis / D. W. Reid, V. Carroll, C. O'May [et al.] // European Respiratory Journal. – 2007. – Aug., vol. 30(2). – P. 286–292.
85. Increased Iron and Ferritin Content of Sputum From Patients With Cystic Fibrosis or Chronic Bronchitis / S. W. Stites, B. Walters, A. R. O'Brien [et al.] // Chest. – 1998. – Sep., vol. 114, issue 3. – P. 814–819.

86. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy / A. M. Cantin, D. Hartl, M. W. Konstan [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2015. – Jul., vol. 14(4). – P. 419–430.
87. Intracellular survival and innate immune evasion of *Burkholderia cepacia*: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors / P. S. Ganesh, S. Vishnupriya, J. Vadivelu [et al.] // *Microbiol. Immunol.* – 2020. – Vol. 64(2). – P. 87–98.
88. Investigation of the multifaceted iron acquisition strategies of *Burkholderia cenocepacia* / J. Tyrrell, N. Whelan, C. Wright [et al.] // *BioMetals*. – 2015. – Sep., vol. 28(2). – P. 367–380.
89. Iron accumulates in the lavage and explanted lungs of cystic fibrosis patients / A. J. Ghio, V. L. Roggli, J. M. Soukup [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2013. – Vol. 12(4). – P. 390–398.
90. Iron at the interface of immunity and infection / M. Nairz, D. Haschka, E. Demetz [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – Jul. 16, N 5. – 152. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25076907/> (date of access: 19.09.2021).
91. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia* / F. Berlutti, C. Morea, A. Battistoni [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2005. – Oct.–Dec., vol. 18(4). – P. 661–670.
92. Iron deficiency in cystic fibrosis: relationship to lung disease severity and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection / D. W. Reid, N. J. Withers, L. Francis [et al.] // *Chest*. – 2002. – Jan., vol. 121(1). – P. 48–54.
93. Iron homeostasis during cystic fibrosis pulmonary exacerbation / A. H. Gifford, L. A. Moulton, D. B. Dorman [et al.] // *Clinical and Translational Science*. – 2012. – Vol. 5(4). – P. 368–373.
94. Iron release from transferrin by pyoverdinin and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* / C. Wolz, K. Hohloch, A. Ocaktan [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1994. – Vol. 62, N 9. – P. 4021–4027.

95. Iron supplementation does not worsen respiratory health or alter the sputum microbiome in cystic fibrosis / A. H. Gifford, D. M. Alexandru, Z. Li [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2014. – Vol. 13(3). – P. 311–318.
96. Kim, S. J. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease can facilitate siderophore-mediated iron-uptake via the proteolytic cleavage of transferrins / S. J. Kim, R. Y. Park, S. M. Kang [et al.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2006. – Vol. 29, N 11. – P. 2295–2300.
97. Konstan, M. W. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology / M. W. Konstan, M. Berger // *Pediatric Pulmonology*. – 1997. – Vol. 24. – P. 137–142.
98. Kramer, J. Bacterial siderophores in community and host interactions / J. Kramer, Ö. Özkaya, R. Kümmerli // *Nature reviews. Microbiology*. – 2020. – Vol. 18(3). – P. 152–163.
99. Lamont, I. L. Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis / I. L. Lamont, A. F. Konings, D. W. Reid // *Biometals*. – 2009. – Vol. 22(1). – P. 53–60.
100. Laucirica, D. R. Progress in Model Systems of Cystic Fibrosis Mucosal Inflammation to Understand Aberrant Neutrophil Activity / D. R. Laucirica, L. W. Garratt, A. Kicic. – Text : electronic // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Apr. 7, vol. 11. – 595. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32318073/> (date of access: 19.09.2021).
101. Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry / T. MacKenzie, A. H. Gifford, K. A. Sabadosa [et al.] // *Annals of internal medicine*. – 2014. – Vol. 161(4). – P. 233–241.
102. Lord, R. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation / R. Lord, A. M. Jones, A. Horsley. – Text : electronic // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2020. – Vol. 4(4). – CD009529. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32239690/> (date of access: 19.09.2021).

103. Lung disease severity, chronic inflammation, iron deficiency, and erythropoietin response in adults with cystic fibrosis / R. Fischer, R. Simmerlein, R. Huber [et al.] // *Pediatric pulmonology*. – 2007. – Vol. 42(12). – P. 1193–1197.
104. Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis / L. Cuthbertson, A. W. Walker, A. E. Oliver [et al.]. – Text : electronic // *Microbiome*. – 2020. – Vol. 8(1). – 45. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32238195/> (date of access: 19.09.2021).
105. Lynch, S. V. The cystic fibrosis airway microbiome / S. V. Lynch, K. D. Bruce. – Text : electronic // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2013. – Mar. 1, vol. 3(3). – a009738. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23457293/> (date of access: 19.09.2021).
106. MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients / A. Fernández-Olmos, M. García-Castillo, M. I. Morosini [et al.] // *Journal of cystic fibrosis*. – 2012. – Jan., vol. 11(1). – P. 59–62.
107. Malhotra, S. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface / S. Malhotra, D. Jr. Hayes, D. J. Wozniak. – Text : electronic // *Clinical microbiology reviews*. – 2019. – Vol. 32(3). – e00138–18. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31142499/> (date of access: 19.09.2021).
108. Maule, G. Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing / G. Maule, D. Arosio, A. Cereseto. – Text : electronic // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21(11). – 3903. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32486152/> (date of access: 19.09.2021).
109. Microcalorimetric investigation of the toxic action of ammonium ferric (III) sulfate on the metabolic activity of pure microbes / Fei Wang, Jun Yao, Lin Tian [et al.] // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2008. – Vol. 25, issue 3. – P. 351–357.

110. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis / J. K. Harris, M. A. De Groote, S. D. Sagel [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104(51). – P. 20529–20533.
111. Mossialos, D. Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: foes or friends? / D. Mossialos, G. D. Amoutzias // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2009. – Vol. 299, N 2. – P. 87–98.
112. Newborn Screening for Cystic Fibrosis: Infant and Laboratory Factors Affecting Successful Sweat Test Completion / A. Shenoy, D. Spyropoulos, K. Peeke [et al.]. – Text : electronic // *International journal of neonatal screening*. – 2020. – Dec. 25, vol. 7(1). – 1. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33375576/> (date of access: 19.09.2021).
113. Oliveira, J. Gram Negative Bacteria / J. Oliveira, W. C. Reygaert. – Text : electronic // *StatPearls*. – Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2021. – March 29. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30855801/> (date of access: 19.09.2021).
114. Page, M. G. P. The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics / M. G. P. Page // *Clinical infectious diseases*. – 2019. – Nov. 13, vol. 69(Suppl 7). – P. S529–S537.
115. Parkins, M. D. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis / M. D. Parkins, R. Somayaji, V. J. Waters. – Text : electronic // *Clinical microbiology reviews*. – 2018. – Aug. 29, vol. 31(4). – e00019-18. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30158299/> (date of access: 19.09.2021).
116. Perspectives on anemia and iron deficiency from the cystic fibrosis care community / G. M. Garlow, L. S. Gettle, N. J. Felicetti [et al.] // *Pediatric pulmonology*. – 2019. – Vol. 54(7). – P. 939–940.
117. Pond, M. N. Functional iron deficiency in adults with cystic fibrosis / M. N. Pond, A. M. Morton, S. P. Conway // *Respiratory Medicine*. – 1996. – Vol. 90, N 7. – P. 409–413.

118. Protein and Microbial Biomarkers in Sputum Discern Acute and Latent Tuberculosis in Investigation of Pastoral Ethiopian Cohort / M. HaileMariam, Y. Yu, H. Singh [et al.]. – Text : electronic // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2021. – Vol. 11. – 595554. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34150670/> (date of access: 19.09.2021).
119. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches / H. Lund-Palau, A. R. Turnbull, A. Bush [et al.] // *Expert review of respiratory medicine*. – 2016. – Vol. 10(6). – P. 685–697.
120. *Pseudomonas siderophores* in the sputum of patients with cystic fibrosis / L. W. Martin, D. W. Reid, K. J. Sharples [et al.] // *Biometals*. – 2021. – Vol. 24(6). – P. 1059–1067.
121. Quinton, P. M. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis / P. M. Quinton // *Lancet* (London, England). – 2008. – Vol. 372(9636). – P. 415–417.
122. Quorum Sensing as Antivirulence Target in Cystic Fibrosis Pathogens / V. C. Scoffone, G. Trespidi, L. R. Chiarelli [et al.]. – Text : electronic // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20(8). – 1838. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31013936/> (date of access: 19.09.2021).
123. Rapid detection of four non-fermenting Gram-negative bacteria directly from cystic fibrosis patient's respiratory samples on the BD MAX™ system / T. T. Rocchetti, S. Silbert, A. Gostnell [et al.]. – Text : electronic // *Practical laboratory medicine*. – 2018. – May 24, N 12. – e00102. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30009245/> (date of access: 19.09.2021).
124. Regan, K. H. Eradication therapy for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis / K. H. Regan, J. Bhatt. – Text : electronic // *Cochrane database of systematic reviews*. – 2016. – Nov. 2, N 11. – CD009876. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27804115/> (date of access: 19.09.2021).

125. Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency / N. Sanvisens, M. C. Bañó, M. Huang [et al.] // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 44(5). – P. 759–769.
126. Rowe, S. M. Mechanisms of disease Cystic fibrosis / S. M. Rowe, S. Miller, E. J. Sorscher // *The New England Journal of Medicine*. – 2005. – Vol. 352. – P. 1992–2001.
127. Rubin, B. K. Mucus, phlegm, and sputum in cystic fibrosis / B. K. Rubin // *Respiratory Care*. – 2009. – Vol. 54(6). – P. 726–732.
128. Sass, A. M. Low iron-induced small RNA BrrF regulates central metabolism and oxidative stress responses in *Burkholderia cenocepacia* / A. M. Sass, T. Coenye. – Text : electronic // *PLoS One*. – 2020. – Jul. 23, vol. 15(7). – e0236405. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32702060/> (date of access: 19.09.2021).
129. Schubert, S. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends / S. Schubert, M. Kostrzewa // *Current issues in molecular biology*. – 2017. – Vol. 23. – P. 17–20.
130. Scotet, V. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery / V. Scotet, C. L'Hostis, C. Férec. – Text : electronic // *Genes (Basel)*. – 2020. – Vol. 11(6). – 589. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32466381/> (date of access: 19.09.2021).
131. Senior, B. Cystic fibrosis: On the cusp of cure? / B. Senior // *Int. Forum Allergy Rhinol*. – 2021. – Vol. 11. – P. 745–746.
132. Shapiro, S. D. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease / S. D. Shapiro // *Biochemical Society transactions*. – 2002. – Vol. 30(2). – P. 98–102.
133. Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia* / P. Darling, M. Chan, A. D. Cox [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1998. – Vol. 66(2). – P. 874–877.
134. Skaar, E. P. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts / E. P. Skaar. – Text : electronic // *PLoS pathogens*. – 2010. – Aug. 12, vol. 6(8). – e1000949. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000949> (date of access: 19.09.2021).

135. Skov, M. Cystic fibrosis - an example of personalized and precision medicine / M. Skov, C. R. Hansen, T. Pressler // *APMIS*. – 2019. – Vol. 127(5). – P. 352–360.
136. Sputum trace metals are biomarkers of inflammatory and suppurative lung disease / R. D. Gray, A. Duncan, D. Noble [et al.] // *Chest*. – 2010. – Vol. 137(3). – P. 635–641.
137. State of the globe: non-fermenting gram-negative bacilli challenges and potential solutions / D. G. Deshmukh, A. M. Zade, K. V. Ingole [et al.] // *Journal of global infectious diseases*. – 2013. – Vol. 5(4). – P. 125–126.
138. *Stenotrophomonas maltophilia* Differential Gene Expression in Synthetic Cystic Fibrosis Sputum Reveals Shared and Cystic Fibrosis Strain-Specific Responses to the Sputum Environment / G. G. Willsey, K. Eckstrom, A. E. LaBauve [et al.]. – Text : electronic // *Journal of bacteriology*. – 2019. – Vol. 201(15). – e00074–19. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31109991/> (date of access: 19.09.2021).
139. Successful treatment of cepacia syndrome with a combination of intravenous cyclosporin, antibiotics and oral corticosteroids / F. J. Gilchrist, A. K. Webb, R. J. Bright-Thomas [et al.] // *Journal of Cystic Fibrosis*. – 2012. – Vol. 11(5). – P. 458–460.
140. The *Burkholderia cepacia* epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in *Burkholderia cenocepacia* / A. Baldwin, P. A. Sokol, J. Parkhill [et al.] // *Infection and immunity*. – 2004. – Vol. 72(3). – P. 1537–1547.
141. The DeltaF508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability / S. Moreau-Marquis, J. M. Bomberger, G. G. Anderson [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* – 2008. – Vol. 295(1). – P. L25–L37.

142. The EMBARC European Bronchiectasis Registry: protocol for an international observational study / J. D. Chalmers, S. Aliberti, E. Polverino [et al.]. – Text : electronic // ERJ Open Res. – 2016. – Vol. 2(1). – 00081–2015. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27730179/> (date of access: 19.09.2021).
143. The future of cystic fibrosis care: a global perspective / S. C. Bell, M. A. Mall, H. Gutierrez [et al.] // *The Lancet. Respiratory medicine*. – 2020. – Vol. 8(1). – P. 65–124.
144. The struggle for iron – a metal at the host–pathogen interface / M. Nairz, A. Schroll, T. Sonnweber [et al.] // *Cellular Microbiology*. – 2010. – Vol. 12. – P. 1691–1702.
145. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis / B. E. Britigan, M. B. Hayek, B. N. Doebbeling [et al.] // *Infection and immunity*. – 1993. – Vol. 61(12). – P. 5049–5055.
146. Uric acid, ferritin and γ -glutamyltransferase can be informative in prediction of the oxidative stress / K. Oda, E. Kikuchi, E. Kuroda [et al.] // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2019. – Vol. 64, N 2. – P. 124–128.
147. Virulence traits associated with *Burkholderia cenocepacia* ST856 epidemic strain isolated from cystic fibrosis patients / M. Malešević, Z. Vasiljević, A. Sovtić [et al.]. – Text : electronic // *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. – 2017. – Jun. 6, vol. 6. – 57. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28593045/> (date of access: 19.09.2021).
148. Von Drygalski, A. Anemia in cystic fibrosis: incidence, mechanisms, and association with pulmonary function and vitamin deficiency / A. Von Drygalski, J. Biller // *Nutr. Clin. Pract.* – 2008. – Oct.-Nov., vol. 23(5). – P. 557–563.
149. Wagner, C. J. Neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 12 in cystic fibrosis lung disease / C. J. Wagner, C. Schultz, M. A. Mall. – Text : electronic // *Molecular and cellular pediatrics*. – 2016. – Dec., vol. 3(1). – 25. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27456476/> (date of access: 19.09.2021).

150. Wark, P. Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis / P. Wark, V. M. McDonald. – Text : electronic // The Cochrane database of systematic reviews. – 2018. – Sep. 27, vol. 9(9). – CD001506. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30260472/> (date of access: 19.09.2021).
151. Waters, C. M. Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: A chronic cheater / C. M. Waters, J. B. Goldberg // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2019. – Vol. 116(14). – P. 6525–6527.
152. Weaver, V. B. Burkholderia spp. alter Pseudomonas aeruginosa physiology through iron sequestration / V. B. Weaver, R. Kolter // Journal of bacteriology. – 2004. – Vol. 186(8). – P. 2376–2384.
153. Weinberg, E. D. Iron availability and infection / E. D. Weinberg // Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. – 2009. – Vol. 1790, N 7. – P. 600–605.
154. Willsey, G. G. Extracellular Lipase and Protease Production from a Model Drinking Water Bacterial Community Is Functionally Robust to Absence of Individual Members / G. G. Willsey, M. J. Wargo. – Text : electronic // PLoS One. – 2015. – Vol. 10(11). – e0143617. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26599415/> (date of access: 19.09.2021).
155. Wilschanski, M. Novel Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis / M. Wilschanski // Discovery medicine. – 2013. – Vol. 15(81). – P. 127–133.
156. Winstanley, C. Pseudomonas aeruginosa Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections / C. Winstanley, S. O'Brien, M. A. Brockhurst // Trends in microbiology. – 2016. – Vol. 24(5). – P. 327–337.
157. Yang, L. Microbial ecology and adaptation in cystic fibrosis airways / L. Yang, L. Jelsbak, S. Molin // Environmental microbiology. – 2011. – Vol. 13(7). – P. 1682–1689.
158. Zemanick, E. T. Prevention of chronic infection with Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis / E. T. Zemanick, S. C. Bell // Current opinion in pulmonary medicine. – 2019. – Vol. 25(6). – P. 636–645.