

Биологические свойства грамотрицательных бактерий, верифицированных в моче пациенток с рецидивирующей неосложненной инфекцией нижних мочевых путей

Ю. Л. Набока¹ , А. Р. Мавзютов² , М. И. Коган¹ , И. А. Гудима^{1*} , К. Т. Джалагония¹ ,
М. Л. Черницкая¹ , Е. В. Митусова¹ , Н. Н. Белоглазова¹ 

¹ Ростовский государственный медицинский университет, Нахичеванский пер., 29, г. Ростов-на-Дону, 344002 Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, ул. Ленина, 3, г. Уфа, 450008 Россия

АННОТАЦИЯ

Неосложненные инфекции нижних мочевых путей чаще регистрируются у женщин и характеризуются рецидивирующим тяжелым течением. Отсутствие эффективных подходов по ведению данной когорты пациенток и недостаточная изученность качественных характеристик уропатогенов препятствуют успешному лечению этих инфекций. Цель настоящего исследования — изучить биологические свойства представителей грамотрицательной микробиоты, выделенной из мочи пациенток с рецидивирующей неосложненной инфекцией нижних мочевых путей, при различных уровнях бактериурии.

Проведено когортное одномоментное исследование 62 пациенток в возрасте 20–50 лет с рецидивирующей неосложненной инфекцией нижних мочевых путей. У грамотрицательных бактерий, выделенных из мочи пациенток, определяли уровень бактериурии, гены факторов вирулентности, гемолитическую, адгезивную и антилизоцимную активности.

У всех пациенток из мочи выделены представители грамотрицательных микроорганизмов (62 штамма). Уровни бактериурии колебались от 10^2 до 10^8 КОЕ/мл. У всех штаммов обнаружены гены факторов вирулентности в широком диапазоне с превалированием *papGII*, *feoB*, *fyuA* независимо от степени бактериурии. Обнаружено 20 достоверных ($p < 0.05$) коэффициентов взаимной сопряженности между различными парами генов. Гемолитическая активность энтеробактерий значимо связана с *papA*, *feoB*, *fyuA*, *kpsMII* и *usp*, антилизоцимная — с *papA*, *afa* и *usp*.

Таким образом, наличие генотипических и некоторых фенотипических признаков в различных вариациях экспрессии у всех представителей грамотрицательных бактерий при всех уровнях бактериурии создает потенциальный риск развития очередного рецидива инфекции нижних мочевых путей. Поэтому даже минимальные уровни бактериурии являются клинически значимыми. Таким образом, при бактериологической диагностике необходимо определять все уровни бактериурии, включая минимальный (10^2 КОЕ/мл), так как выделенные микроорганизмы при данном уровне обладают не только адгезивной и антилизоцимной активностями, но и имеют гены факторов вирулентности.

Ключевые слова: неосложненные инфекции нижних мочевых путей, уровень бактериурии, грамотрицательные бактерии, генотипические и фенотипические признаки

Получена: 15 июля 2022

Принята к печати: 5 сентября 2022

Опубликована: 30 сентября 2022

***Автор ответственный за переписку:** Ирина Александровна Гудима, д. м. н., проф. кафедры микробиологии и вирусологии №1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Нахичеванский пер., 29, г. Ростов-на-Дону, 344002 Россия, тел.: +7-903-406-65-16, e-mail: nagu22@mail.ru

Цитирование: Набока ЮЛ, Мавзютов АР, Коган МИ, Гудима ИА, Джалагония КТ, Черницкая МЛ, Митусова ЕВ, Белоглазова НН. Биологические свойства грамотрицательных бактерий, верифицированных в моче пациенток с рецидивирующей неосложненной инфекцией нижних мочевых путей. MIR J 2022; 9(1), 82-90. doi: 10.18527/2500-2236-2022-9-1-82-90.

Авторские права: © 2022 Набока и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.



Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Исследование не имело спонсорской поддержки.

Biological properties of Gram-negative bacteria verified in urine of patients with recurrent uncomplicated lower urinary tract infection

Yulia L. Naboka¹ , Ayrat R. Mavzyutov² , Michel I. Kogan¹ , Irina A. Gudima^{1#} ,
Kseniya T. Dzhlagoniya¹ , Marina L. Chernitskaia¹ , Evgeniya V. Mitusova¹ , Nataliya N. Beloglazova¹ 

¹Rostov State Medical University, Nakhichevansky per., 29, Rostov-on-Don, 344002 Russia

²Bashkir State Medical University, Lenin str., 3, Ufa, 450008 Russia

ABSTRACT

Uncomplicated infections of the lower urinary tract are more often recorded in women and are characterized by recurrent severe course. The lack of effective approaches to the management of this cohort of patients and the insufficient knowledge of the qualitative characteristics of uropathogens hinder the successful treatment of these infections. The purpose of this project is to study the biological properties of representatives of Gram-negative bacteria isolated from the urine of patients with recurrent uncomplicated lower urinary tract infection at various levels of bacteriuria.

We present here the results of the one-stage cohort study of 62 patients 20-50 years old with recurrent uncomplicated lower urinary tract infection. The level of bacteriuria, genes of virulence factors, hemolytic, adhesive and anti-lysozyme activities were determined for the Gram-negative bacteria isolated from the urine of patients.

Representatives of Gram-negative microorganisms (62 strains) were isolated from the urine of all patients. Their bacteriuria levels ranged from 10^2 to 10^8 CFU/ml. A wide range of the virulence factor genes with the prevalence of *papGII*, *feoB*, *fyuA*, were found in all strains regardless of the degree of bacteriuria. Twenty significant ($p < 0.05$) coefficients of mutual contingency between different pairs of genes were found. We found that the hemolytic activity of Enterobacteriaceae is statistically significantly associated with *papA*, *feoB*, *fyuA*, *kpsMIII*, and *usp*, while the anti-lysozyme activity is associated with *papA*, *afa*, and *usp*.

The detection of genotypic and some phenotypic traits expressed in various variations in all Gram-negative bacteria regardless of their bacteriuria levels creates a potential risk for recurrent of the lower urinary tract infection. Consequently, even the minimal levels of bacteriuria become clinically significant. Therefore, in bacteriological diagnostics it is necessary to determine all levels of bacteriuria, including the minimum level (10^2 CFU/ml), since isolated microorganisms at this level have not only adhesive and anti-lysozyme activities, but also contain genes encoding the virulence factors.

Keywords: uncomplicated lower urinary tract infections, Gram-negative bacteria, level of bacteriuria, genotypic and phenotypic features

Received: July 15, 2022

Accepted: September 5, 2022

Published: September 30, 2022

For correspondence: Irina A. Gudima, Dr. Sci. (Med.), prof. of the Department of microbiology and virology No. 1, Rostov State Medical University, Nakhichevansky per., 29, Rostov-on-Don, 344002 Russia, e-mail: nagu22@mail.ru

Citation: Naboka YL, Mavzyutov AR, Kogan MI, Gudima IA, Dzhlagoniya KT, Chernitskaia ML, Mitusova EV, Beloglazova NN. Biological properties of Gram-negative bacteria verified in urine of patients with recurrent uncomplicated lower urinary tract infection. *MIR J* 2022; 9(1), 82-90. doi: 10.18527/2500-2236-2022-9-1-82-90.

Copyright: © 2022 Naboka et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the material is not used for commercial purposes, provided that the original author and source are cited.



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

Funding: The study was not sponsored.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Европейской ассоциации урологов (European Association of Urology, EAU), неосложненные инфекции нижних мочевых путей (НИНМП) чаще регистрируют у женщин (<https://uroweb.org/>). Данная патология в ряде случаев характеризуется рецидивирующим течением, которое трактуется как возникновение более двух эпизодов НИНМП в течение 6 месяцев или трех эпизодов в течение одного года. Несмотря на проводимую антимикробную терапию рецидивы НИНМП регистрируют у 16.0-25.0% пациентов в течение полугода и у 40.0-50.0% – в течение одного года [1]. Данная когорта пациенток обращается к врачу в среднем три раза в год, и около половины имеют как минимум 6 эпизодов в год, а 14.4% – около 12 [2]. Каузативными патогенами в этиологической структуре заболевания являются представители грамнегативной микробиоты с доминирующей позицией *E. coli* [3, 4]. В течение достаточно продолжительного времени одним из опорных признаков в диагностике рецидивирующей неосложненной инфекции нижних мочевых путей (РНИНМП) являлся диагностически значимый уровень бактериурии ($\geq 10^5$ КОЕ/мл). Однако в актуальных EAU и Федеральных клинических рекомендациях РФ данный показатель уже не приводится. Его отсутствие, на наш взгляд, во многом усложнило работу практических врачей, ибо существующее общепринятое мнение, что чем выше уровень бактериурии, тем доказательнее этиологическая причастность того или иного микроорганизма к манифестации рецидивов РНИНМП, во многих случаях возведено в ранг аксиомы. Однако сложность и тяжесть клинического течения РНИНМП у женщин с верификацией в моче различных уровней бактериурии, включая и минимальный (10^2 КОЕ/мл), во многих случаях – неэффективность существующих подходов к ведению данной когорты пациенток свидетельствуют о недостаточной изученности качественных характеристик уропатогенов. В связи с этим постоянный поиск и разработка показателей этиологической значимости определенных таксонов микроорганизмов, в том числе и каузативных, является актуальным.

Проведенными ранее исследованиями было установлено, что рецидивирующее течение данной патологии может быть сопряжено как с реинфекцией новыми штаммами, так и с продолжительной персистенцией бактерий, причастных к первичному инфицированию [5]. При этом рецидивы заболевания у пациентов, излеченных от первичного эпизода, но с последующей реинфекцией, характеризовались верификацией у уропатогенов широкого спектра генов

факторов вирулентности (ГФВ), имеющих важное значение не только в манифестации заболевания, но и в поддержании инфекционно-воспалительного процесса в мочевых путях [6].

Важным моментом в оценке патогенного потенциала микроорганизмов, в том числе представителей грамнегативной микробиоты, обнаруженных в моче при различной степени бактериурии, на наш взгляд, является определение ГФВ, их комбинаций, а также взаимосвязей с некоторыми фенотипическими признаками.

Освещение этих проблем важно как с практической, так и с теоретической точек зрения, ибо бесспорный интерес заключается в поиске ответов на следующие вопросы. Во-первых, могут ли микроорганизмы, выделенные при минимальном (10^2 КОЕ/мл) уровне бактериурии, который в подавляющем большинстве случаев не интерпретируется как значимый ни урологами, ни клиническими микробиологами, обладать ГФВ? Во-вторых, существует ли взаимосвязь определенных ГФВ как между собой, так и с гемолитической, адгезивной и антилизоцимной активностями у представителей грамнегативной микробиоты?

Цель исследования – изучить некоторые биологические свойства представителей грамнегативных микроорганизмов, выделенных из мочи пациенток с рецидивирующей неосложненной инфекцией нижних мочевых путей при различных уровнях бактериурии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Когортное одномоментное исследование проведено на базе кафедр микробиологии и вирусологии № 1, урологии и репродуктивного здоровья человека (с курсом детской урологии-андрологии) и отделения урологии клиники ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

Обследованы 62 пациентки с РНИНМП. Критерии включения: не менее трех рецидивов в течение года в анамнезе, наличие лейкоцитурии в общем анализе мочи, в анамнезе и на период исследования отсутствие заболеваний, передающихся половым путем, подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: бессимптомная бактериурия, наличие менее трех рецидивов в год, отсутствие терапии и профилактики рецидивов в течение 1 месяца до данного исследования, беременность, пролапс гениталий, коморбидные состояния (сахарный диабет, онкологические заболевания и т. д.).

Возраст пациенток варьировался от 20 до 50 лет (средний возраст 33.3 ± 2.2 года). В возрасте 20-29 лет обследовано 7 (11.3%) женщин, 30-40 лет – 51 (82.3%), 41-50 – 4 (6.4%). В обследуемой когорте длительность заболевания составила: 5 лет у 14 (22.6%) пациенток, 6-10 лет – у 15 (24.2%), более 10 лет – у 33 (53.2%). Минимум три рецидива заболевания в год было у 20 пациенток (32.3%), четыре – у 14 (22.6%), более четырех – у 28 (45.1%). В общем анализе мочи лейкоцитурия верифицирована у всех пациенток в количестве 11-20^x (28.4%), 21-30^x (18.4%), 31-50^x (23.6%) и все поле зрения (29.6%). Из данных анамнеза и заполнения анкет установлено, что абсолютно все пациентки для терапии очередного рецидива заболевания получали не только фосфомицин (причем неоднократно), но и некоторые другие антибактериальные препараты. При анализе данных анкетирования установлено, что 60 (96.8%) пациенток периодически занимались самолечением.

Материалом для бактериологического исследования служила средняя порция утренней мочи, собранная при самостоятельном мочеиспускании после гигиенической процедуры специально обученным медперсоналом (стерильный контейнер Sterile Uricol (HiMedia, Индия)). Бактериологическое исследование мочи с определением степени бактериурии проводили согласно клиническим рекомендациям «Бактериологический анализ мочи», 2014 г. Для культивирования грамотрицательных бактерий использовали MacConkey Agar (HiMedia, Индия). Выделенные культуры идентифицировали по морфо-тинкториальным (Gram Stains-Kit (HiMedia, Индия)), культуральным, биохимическим свойствам (Lachema, Чехия).

У всех пациенток из мочи при различных уровнях бактериурии были выделены представители грамотрицательной микрофлоры, для которых определены ГФВ: *papA*, *papE/F*, *papGII*, *afa*, *bmaE*, *iutA*, *feoB*, *fyuA*, *kpsMTIII*, *usp*.

Методика подготовки проб исходных образцов для ПЦР, выделения ДНК и список использованных праймеров, синтезированных в ООО «Биоскрин» (Уфа), «Синтол» (Москва), представлены в работе Naboka et al. [7]. Данные праймеры были специфичны генам *papA* (субъединица Р пилей), *papE/F* (поверхностный адгезин Р пилей), *papGII* (поверхностный адгезин Р пилей аллель II), *afa* (афимбрийный адгезин), *bmaE* (М пили), *fyuA*, *iutA*, *feoB* (гены белков системы сидерофоров), *kpsMTIII* (капсулообразование) и *usp* (уропатогенный специфический белок).

У грамотрицательных бактерий, выделенных из мочи пациенток с РНИМП, определяли гемолитическую активность (ГА) на Blood Agar (HiMedia, Индия), адгезивную и антилизоцимную активности [8-10].

Статистический анализ проведен с использованием пакета SPSS версии 23. В работе был также использован коэффициент взаимной сопряженности (КВС) Пирсона для анализа связей между частотами верификации изучаемых ГФВ. Связи между частотами обнаружения исследуемых ГФВ с наличием адгезивной (АА) и антилизоцимной (АЛА) активностей были изучены с использованием коэффициента эмпирического корреляционного отношения «Эта» (КЭ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

У всех пациенток из мочи выделены представители грамотрицательной микрофлоры, паттерн которых был представлен *E. coli* (n=46 (74.2%)), *K. pneumoniae* (n=6 (9.7%)), *K. aerogenes* (n=4 (6.5%)), *P. vulgaris* (n=2 (3.2%)), *C. koseri*, *A. hydrophila*, *M. morgani*, *H. alvei* (по 1 штамму (по 1.6% соответственно)). Уровни бактериурии колебались от 10² до 10⁸ КОЕ/мл. Бактериурия 10² КОЕ/мл выявлена в 24.2% случаев, 10³ КОЕ/мл – 16.1%, 10⁴ КОЕ/мл – 11.3%, 10⁵ КОЕ/мл – 9.7%, 10⁶ КОЕ/мл – 27.4%, 10⁷ КОЕ/мл – 8.1%, 10⁸ КОЕ/мл – 3.2%.

Доминирующие у выделенных микроорганизмов при различных уровнях бактериурии ГФВ (*papGII*, *feoB*, *fyuA*, *usp*) представлены в Таблице 1. Тенденция превалирования вышеперечисленных ГФВ сохраняется и при конкретных уровнях бактериурии.

Был проведен анализ сочетания пар ГФВ, так как из 62 изучаемых штаммов один ген обнаруживали у 9.7% культур, два – у 1.6%, три и десять – у 3.2% соответственно, четыре, восемь и девять – у 11.3% соответственно, пять – у 14.5%, шесть – у 17.7%, семь – у 16.2%. Обнаружено 45 КВС сочетаний пар ГФВ, 20 достоверных из них (p<0.05) представлены на Рис. 1.

При анализе сочетаний пар ГФВ в контексте степени бактериурии обнаружено 28 значимых КВС. При бактериурии 10² КОЕ/мл регистрировали 9 (32.3%) значимых КВС, 10³ и 10⁶ КОЕ/мл – по 5 (по 17.7%), 10⁴ и 10⁵ КОЕ/мл – по 4 (по 14.3%), 10⁷ КОЕ/мл – 1 (3.6%) значимых КВС, представленных в Таблице 2.

Из 62 штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных из мочи пациенток, ГА обладали 38 (61.3%). Были получены 5 достоверных КВС между частотой встречаемости отдельных ГФВ с ГА, в частности для *papA* (КВС=0.301, p=0.013), *feoB* (КВС=0.291, p=0.017), *fyuA* (КВС=0.286, p=0.019), *kpsMTIII* (КВС=0.306, p=0.011), *usp* (КВС=0.291, p=0.017). Было обнаружено три значимых КВС между наличием изучаемых ГФВ, ГА и степенью бактериурии. В частности, при бактериурии 10² КОЕ/мл выявлены 2 КВС для *bmaE*, *iutA* (КВС=0.519, p=0.019 соответственно),

Таблица 1. Частота встречаемости генов факторов вирулентности у грамотрицательных бактерий

Микроорга- низмы	Абс. кол- во	Частота обнаружения (абс. / %)									
		<i>papA</i>	<i>papE/F</i>	<i>papGII</i>	<i>afa</i>	<i>bmaE</i>	<i>iutA</i>	<i>feoB</i>	<i>fyuA</i>	<i>kpsMTII</i>	<i>usp</i>
<i>E. coli</i>	46	15 / 32.6	11 / 23.9	44 / 95.7	31 / 67.4	22 / 47.8	25 / 54.3	41 / 89.1	42 / 91.3	30 / 65.2	40 / 87.0
<i>K. pneumoniae</i>	6	0.0	1 / 16.7	5 / 83.3	1 / 16.7	1 / 16.7	1 / 16.7	0.0	2 / 33.3	0.0	0.0
<i>K. aerogenes</i>	4	2 / 50.0	0.0	4 / 100.0	1 / 25.0	1 / 25.0	1 / 25.0	1 / 25.0	2 / 50.0	3 / 75.0	4 / 100.0
<i>P. vulgaris</i>	2	1 / 50.0	0.0	2 / 100.0	0.0	0.0	2 / 100.0	2 / 100.0	2 / 100.0	1 / 50.0	2 / 100.0
<i>M. morgani</i>	1	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0	0.0	0.0	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0	0.0
<i>C. koseri</i>	1	0.0	0.0	1 / 100.0	0.0	0.0	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0	0.0
<i>A. hydrophila</i>	1	1 / 100.0	0.0	1 / 100.0	0.0	0.0	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0	1 / 100.0
<i>H. alvei</i>	1	0.0	0.0	1 / 100.0	0.0	0.0	0.0	1 / 100.0	1 / 100.0	0.0	1 / 100.0
Всего:	62	20 / 32.3	13 / 21.0	59 / 95.2	34 / 54.8	24 / 38.7	31 / 60.0	48 / 77.4	52 / 83.9	37 / 59.7	48 / 77.4

Таблица 2. Взаимосвязь бактериурии с наличием определенных генов факторов вирулентности

Степень бактериурии (КОЕ/мл)	Пары генов факторов вирулентности	Коэффициент взаимной сопряженности	Статистическая значимость, p
10 ²	<i>afa+bmaE</i>	0.519	0.019
	<i>afa+iutA</i>	0.519	0.019
	<i>afa+feoB</i>	0.471	0.038
	<i>afa+fyuA</i>	0.471	0.038
	<i>bmaE+iutA</i>	0.591	0.005
	<i>feoB+fyuA</i>	0.707	<0.001
	<i>feoB+usp</i>	0.617	0.002
	<i>fyuA+usp</i>	0.617	0.002
	<i>kpsMTII+usp</i>	0.545	0.012
10 ³	<i>papA+kpsMTII</i>	0.607	0.016
	<i>afa+bmaE</i>	0.548	0.038
	<i>afa+iutA</i>	0.548	0.038
	<i>bmaE+iutA</i>	0.707	0.002
	<i>feoB+usp</i>	0.707	0.002
10 ⁴	<i>papGII+fyuA</i>	0.707	0.008
	<i>papGII+usp</i>	0.707	0.008
	<i>afa+iutA</i>	0.6	0.047
	<i>fyuA+usp</i>	0.707	0.008
10 ⁵	<i>papA+papE/F</i>	0.707	<0.014
	<i>bmaE+feoB</i>	0.707	0.014
	<i>bmaE+fyuA</i>	0.707	0.014
	<i>feoB+fyuA</i>	0.707	0.014
10 ⁶	<i>papA+papE/F</i>	0.611	0.001
	<i>papE/F+afa</i>	0.475	0.026
	<i>afa+bmaE</i>	0.526	0.011
	<i>bmaE+kpsMTII</i>	0.43	0.049
	<i>feoB+fyuA</i>	0.707	<0.001
10 ⁷	<i>feoB+kpsMTII</i>	0.707	0.025

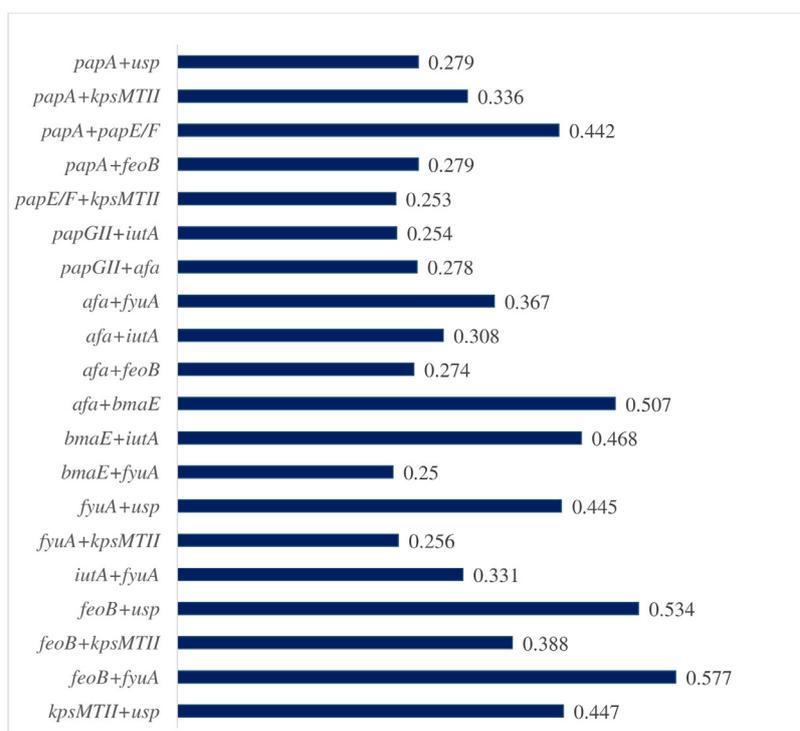


Рис. 1. Достоверные коэффициенты взаимной сопряженности между парами генов факторов вирулентности

10^5 КОЕ/мл – *kpsMTII* (КВС=0.548, $p=0.038$). А в контексте определенного уровня бактериурии было обнаружено, что при 10^2 КОЕ/мл регистрировали два значимых КВС ($p=0.019$) для ГФВ *bmaE*, *iutA* и при 10^5 КОЕ/мл – один значимый КВС – *kpsMTII* ($p=0.038$).

Грамотрицательные бактерии, обнаруженные в моче пациенток, во всех случаях обладали АА. Высокие показатели регистрировали в 32.3% случаев, средние – в 62.9% ($p<0.05$), низкие – в 4.8%.

Необходимо отметить, что независимо от степени бактериурии высокие показатели АА регистрировали как при бактериурии 10^2 КОЕ/мл (77.8%), так и при 10^5 КОЕ/мл (80.0%).

Между ГФВ и АА микроорганизмов было выявлено 10 коэффициентов корреляции, из них значимыми были три: *papA* (КЭ=0.143, $p=0.015$), *papGII* (КЭ=0.364, $p=0.028$), *kpsMTII* (КЭ=0.464, $p=0.023$). Связь *papA* с АА обнаружена у 32.3% штаммов с доминированием высоких показателей (25.8%). Связь *papGII* с АА выявлена у 93.5% штаммов с преобладанием средних (59.7%), реже – высоких (32.3%) показателей. Связь *kpsMTII* с изучаемым признаком выявлена у 59.7% культур со средними (27.4%) и высокими (29.0%) показателями.

АЛА обладали все выделенные из мочи штаммы микроорганизмов. Для АЛА прослеживается тенденция, аналогичная таковой для АА, с преобладанием средних значений (53.2%), реже – высоких (29.1%) и низких (17.7%).

При анализе взаимосвязей между исследуемыми ГФВ и АЛА получены три значимых КЭ: *papA* (КЭ=0.627, $p=0.02$), *afa* (КЭ=0.292, $p=0.033$), *fyuA* (КЭ=0.382, $p=0.016$). Взаимосвязь *papA* с АЛА обнаружена для 33.9% штаммов, *afa* – для 56.5%, *fyuA* – для 83.9%. Достоверных связей между изучаемыми признаками в контексте определенных уровней бактериурии не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рецидивы НИММП могут быть обусловлены как реинфекцией, так и персистенцией бактерий, вызвавших первичное инфицирование. Дискуссия по этому вопросу продолжается десятилетиями [7, 11-13]. Исследования Ejrnaes et al. [14] показали, что в 77.0% случаев очередной рецидив НИММП связан с ранее выявленным штаммом, а в 23.3% – новым штаммом *E. coli* в группе пациентов, получавших терапию пивмециллином. В то же время в группе получавших плацебо в 96.0% случаев при манифестации НИММП были выделены штаммы *E. coli*, идентичные предыдущему, вызвавшему также очередное обострение. Эти данные свидетельствуют о персистенции бактерий в мочевых путях внутри эпителиальных клеток в составе внутриклеточных биопленок [15].

Нами была исследована когорта пациенток, наиболее сложная в плане ведения и терапии, так как в 53.2% случаев рецидивы заболевания регистрировали более

10 лет, а в 24.2% случаев длительность заболевания составляла 6-10 лет. Необходимо отметить, что количество пациентов с четырьмя и более рецидивами в год составило 67.7% и абсолютно все пациенты неоднократно получали антибактериальную терапию, а 96.8% из них занимались самолечением. Нам не был известен штамм микроорганизмов, вызвавший последний рецидив, а также была ли достигнута нормализация лейкоцитурии после завершения лечения. Известно лишь, что контрольного бактериологического исследования мочи по завершении последнего (перед обращением в клинику) курса антибактериальной терапии не проводилось.

В данной когорте пациенток у грамотригативных штаммов микроорганизмов, выделенных из мочи, исследованы некоторые ГФВ, а также показатели ГА, АА, АЛА и их взаимосвязь с некоторыми ГФВ. Проведенными ранее исследованиями [16-19] было установлено, что штаммы *E. coli* при первичном или повторных эпизодах НИИМП обладают широким спектром ГФВ, в частности, адгезинами, факторами, связанными с образованием биопленок и поглощением железа, токсинообразованием и т. д.

В данном исследовании ГФВ обнаружены у всех изученных штаммов с явным доминированием *papGII*, что несколько расходится с результатами Johnson et al. [20], которые регистрировали данный аллель чаще при инфекциях верхних мочевых путей. Однако авторы указывают на ограничение своего исследования, связанное с небольшим количеством изолятов, а также скудностью клинических и эпидемиологических данных. В работе Tiba et al. [21] аллель *papGII* был верифицирован у 32.7% пациентов с циститом. Необходимо отметить, что одним из критериев включения пациентов в данную работу был высокий ($>10^5$ КОЕ/мл) уровень бактериурии, который является диагностически значимым для пиелонефрита, а не для цистита. Наряду с аллелем *papGII* авторами был обнаружен также аллель *papGIII* у изученных штаммов *E. coli*, поэтому данные по ГФВ при инфекциях мочевых путей в настоящее время разрознены, что лишней раз подчеркивает противоречивость и неизученность данного вопроса.

Как показано в данном исследовании, грамотригативным бактериям, выделенным из мочи при РНИИМП, присущи различные комбинации ГФВ, которые в свою очередь достоверно сопряжены с уровнями бактериурии 10^2 - 10^6 КОЕ/мл. Найденные значимые коэффициенты корреляции некоторых ГФВ с ГА, АА, АЛА свидетельствуют о взаимосвязи различных признаков, суммирующий эффект которых может приводить к длительной персистенции

представителей грамотригативной микробиоты в органах мочевой системы и при определенных условиях вызывать рецидивы заболевания.

Особый интерес, на наш взгляд, представляют данные об обнаружении ГФВ при минимальной (10^2 КОЕ/мл) степени бактериурии, которая зачастую не учитывается как диагностически значимая ни урологом, ни клиническим микробиологом. Полученные данные по некоторым параметрам соответствуют результатам других исследований по НИИМП [22-24], но при уровне бактериурии $\geq 10^5$ КОЕ/мл. На наш взгляд, минимальный (10^2 КОЕ/мл) уровень бактериурии следует рассматривать как фактор риска рецидивирующего течения НИИМП, и исследования генотипических [25] и фенотипических характеристик выделенных микроорганизмов могут играть определенную роль в патогенезе заболевания.

Таким образом, обнаружение ГФВ, АА, АЛА в различных вариациях экспрессии признака у всех представителей грамотригативной микробиоты при всех уровнях бактериурии при РНИИМП создает потенциальный риск развития очередного рецидива, поэтому даже минимальные уровни бактериурии являются клинически значимыми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У всех штаммов грамотригативных бактерий, верифицированных в моче пациенток с РНИИМП, обнаружены ГФВ в широком диапазоне с превалированием *papGII*, *feoB*, *fyuA* независимо от степени бактериурии. Обнаружено 20 значимых коэффициентов взаимной сопряженности между различными парами ГФВ. Гемолитическая активность изучаемых штаммов значимо связана с ГФВ *papA*, *feoB*, *fyuA*, *kpsMIII*, *usp*, антилизоцимная активность значимо связана с наличием ГФВ *papA*, *afa*, *usp*.

При рецидивирующей неосложненной инфекции нижних мочевых путей необходимо определять в моче все уровни бактериурии, включая минимальный (10^2 КОЕ/мл), так как представители грамотригативной микробиоты при данном уровне не только обладают адгезивной и антилизоцимной активностями, но и имеют ГФВ.

Ограничения данного исследования заключаются в отсутствии информации о родовой и/или видовой принадлежности штамма, вызвавшего последний рецидив, в отсутствии информации о показателях лейкоцитурии после предыдущего завершеного курса антибактериальной терапии, а также в незначительном абсолютном количестве штаммов, за исключением *E. coli*.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kärkkäinen UM, Ikäheimo R, Katila ML, Siitonen A. Recurrence of urinary tract infections in adult patients with community-acquired pyelonephritis caused by *E. coli*: a 1-year follow-up. *Scand J Infect Dis* 2000; 32(5), 495-9. doi: 10.1080/003655400458767.
2. Wagenlehner F, Wullt B, Ballarin S, Zingg D, Naber KG. Social and economic burden of recurrent urinary tract infections and quality of life: a patient web-based study (GESPRIT). *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research* 2017; 18(1), 107-17. doi: 10.1080/14737167.2017.1359543.
3. Perez-Carrasco V, Soriano-Lerma A, Soriano M et al. Urinary Microbiome: Yin and Yang of the Urinary Tract. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.617002.
4. Палагин ИС, Сухорукова МВ, Дехнич АВ, Эйдельштейн МВ, Перепанова ТС, Козлов РС и исследовательская группа «ДАРМИС-2018». Состояние антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей в России, Беларуси и Казахстане: результаты многоцентрового международного исследования «ДАРМИС-2018». *Урология* 2020; 1, 19-31. doi: 10.18565/urology.2020.1.19-31.
5. Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull* 2011; 58(4), B4187. PMID: 21466767.
6. Sintsova A, Frick-Cheng AE, Smith S, Pirani A, Subashchandrabose S, Snitkin ES, Mobley H. Genetically diverse uropathogenic *Escherichia coli* adopt a common transcriptional program in patients with UTIs. *Elife* 2019; 8, e49748. doi: 10.7554/eLife.49748.
7. Naboka YL, Mavzyutov AR, Kogan MI, Gudima IA, Dzhalongoniya KT, Ivanov SN, Naber KG. The gene profile of Enterobacteriaceae virulence factors in relation to bacteriuria levels between the acute episodes of recurrent uncomplicated lower urinary tract infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2021; 8(19), 1061-6. doi: 10.1080/14787210.2021.1866986.
8. Брилис ВИ, Брилине ГА, Ленцнер АА. Методика изучения адгезивного процесса. *Лаб. дело* 1986; 4, 210-2.
9. Бухарин ОВ. Персистенция бактериальных патогенов как результат отношений в системе паразит-хозяин. *Журн. микробиол.* 1997; 4, 3-9.
10. Гизатулина СС, Биргер МО, Кулинич ЛИ и др. Способ оценки состояния микрофлоры кишечника человека по количеству адгезивно-активных колоний и типу адгезии. *Журн. микробиол.* 1991; 4а, 21-23.
11. Bergstrom T, Lincoln K, Orskov F, Orskov I, Winberg J. Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. 8. Reinfection vs. relapse in recurrent urinary tract infections. Evaluation by means of identification of infecting organisms. *J Pediatr* 1967; 71, 13-20. doi: 10.1016/S0022-3476(67)80224-5.
12. Jacobson SH, Kuhn I, Brauner A. Biochemical fingerprinting of urinary *Escherichia coli* causing recurrent infections in women with pyelonephritic renal scarring. *Scand J Urol Nephrol* 1992; 26, 373-7. doi: 10.3109/00365599209181229.
13. Weichhart T, Haidinger M, Horl WH, Saemann MD. Current concepts of molecular defence mechanisms operative during urinary tract infection. *Eur J Clin Invest* 2008; 38 Suppl 2, 29-38. doi: 10.1111/j.1365-2362.2008.02006.x.
14. Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, Ferry S, Holm S, Monsen T et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5), 1776-81. doi: 10.1128/JCM.44.5.1776-1781.2006.
15. Soto SM, Smithson A, Horcajada JP, Martinez JA, Mensa JP, Vila J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(10), 1034-6. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01543.x.
16. Najafi A, Hasanpour M, Askary A, Aziemzadeh M, Hashemi N. Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Folia Microbiologica* 2018; 63, 335-43. doi: 10.1007/s12223-017-0570-3.
17. Cristea VC, Gheorghe I, Czobor Barbu I, Popa LI, Ispas B, Grigore GA et al. Snapshot of Phylogenetic Groups, Virulence, and Resistance Markers in *Escherichia coli* Uropathogenic Strains Isolated from Outpatients with Urinary Tract Infections in Bucharest, Romania. *Biomed Res Int* 2019; 5712371. doi: 10.1155/2019/5712371.
18. Dadi BR, Abebe T, Zhang L, Mihret A, Abebe W, Amogne W. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis

- Ababa, Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2020; 20(1), 108. doi: 10.1186/s12879-020-4844-z.
19. Rezaatofghi SE, Mirzarazi M, Salehi M. Virulence genes and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infection and uninfected control subjects: a case-control study. *BMC Infect Dis* 2021; 1721(1), 361. doi: 10.1186/s12879-021-06036-4.
20. Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J Clin Microbiol* 2005; 43(12), 6064-72. doi: 10.1128/JCM.43.12.6064-6072.2005.
21. Tiba MR, Yano T, Leite Dda S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50(5), 255-60. doi: 10.1590/s0036-46652008000500001.
22. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front Microbiol* 2017; 8, 1566. doi: 10.3389/fmicb.2017.01566.
23. Katongole P, Nalubega F, Florence NC, Asimwe B, Andia I. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. *BMC Infect Dis* 2020; 20(1), 53. doi: 10.1186/s12879-020-05186-1.
24. Yazdanpour Z, Tadjrobehkar O, Shakhah M. Significant association between genes encoding virulence factors with antibiotic resistance and phylogenetic groups in community acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *BMC Microbiol* 2020; 20(1), 241. doi: 10.1186/s12866-020-01933-1.
25. Naboka YL, Mavzyutov AR, Kogan MI, Gudima IA, Dzhalongoniya KT, Ivanov SN. Is bacteriuria 10^2 CFU/ml of *E. coli* clinically significant in case of recurrent uncomplicated lower urinary tract infection? *Eur Urol Open Sci* 2020; 19(Suppl 2), e1301. doi: 10.1016/S2666-1683(20)33455-8.