

ОЦЕНКА ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПИЕЛОНЕФРИТОВ И ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ УРОПАТОГЕНОВ

Лагун Л.В., Тапальский Д.В.

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Резюме. В этиологической структуре пиелонефритов преобладали штаммы *E. coli* и *P. aeruginosa*. Оценена устойчивость возбудителей пиелонефритов к антибиотикам, изучены механизмы антибиотикорезистентности энтеробактерий. Выявлена высокая распространенность продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра, относящихся к группе СТХ-М. Среди возбудителей пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Штаммы, выделенные от больных хроническим пиелонефритом и пиелонефритом, протекающим на фоне уролитиаза, по способности формирования биопленок значительно превосходили штаммы, выделенные от больных острым пиелонефритом. У штаммов *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей активностью отмечена более высокая устойчивость к антибактериальным препаратам. Полученные в ходе исследования данные об этиологической структуре пиелонефритов, способности возбудителей формировать биопленки, уровнях и механизмах устойчивости уропатогенов к антибактериальным препаратам могут использоваться для разработки алгоритма микробиологической диагностики и рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов.

Ключевые слова: острые и хронические пиелонефриты, возбудители пиелонефритов, резистентность к антибиотикам, β -лактамазы расширенного спектра, биопленки.

Введение. Среди всех заболеваний человека по частоте пиелонефрит занимает второе место после острых респираторных заболеваний и является одной из наиболее распространенных форм поражения почек у детей и взрослых [1, 2]. Наиболее частыми возбудителями пиелонефритов являются энтеробактерии, главным образом — *Escherichia coli*, на долю которой приходится до 85% всех заболеваний, а также *Proteus spp.* и *Klebsiella pneumoniae*. Достаточно большой удельный вес в структуре уропатогенов занимает *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Вид и характер инфекции имеют большое значение в этиопатогенезе пиелонефрита и назначении рациональной антибиотикотерапии [2, 3]. Поэтому изучение этиологической роли микроорганизмов в развитии и течении пиелонефритов по-прежнему остается актуальным.

Одним из факторов патогенности микроорганизмов является образование биопленок. С их образования также начинается развитие любой инфекции, в том числе и инфекции мочевыделительной системы (пиелонефрит, цистит, мочекаменная болезнь) [4]. Для практической медицины

особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии факторов иммунной защиты макроорганизма и антибиотиков. Таким образом, существование биопленок при инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике и лечению.

В последнее время резистентность энтеробактерий к ряду антибиотиков, особенно β -лактамам, приобретает все большее распространение, что является серьезной проблемой здравоохранения. Продукция β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) — один из наиболее распространенных и клинически значимых механизмов резистентности энтеробактерий к современным β -лактамам антибиотикам. Однако эффективность выявления устойчивости, связанной с продукцией БЛРС, с помощью традиционных методов оценки чувствительности остается крайне низкой [5, 6]. Для проведения эффективной эмпирической антибактериальной терапии инфекций мочевыводящих путей, в частности пиелонефрита, необходима информация не только о распространенности антибиотикорезистентности, но и ее основных механизмах.

Целью настоящей работы явилось сравнительное исследование этиологической структуры и молекулярно-биологических свойства возбудителей пиелонефритов.

Материалы и методы. В исследование включено 273 клинических изолятов (102 — *E. coli*, 83 — *P. aeruginosa*, 63 — *Proteus spp.*, 15 — *S. aureus*, 10 — *K. pneumoniae*), выделенных в 2005–2010 гг. из мочи пациентов с острым и хроническим пиелонефритом. Все пациенты находились на стационарном лечении в урологическом и детском нефрологическом отделениях Гомельской областной клинической больницы. Дополнительно изучена первичная медицинская документация 345 больных пиелонефритами за период 2000–2003 гг. и 297 — за период 2008–2010 гг., на основе данных которой проведен ретроспективный анализ этиологической структуры пиелонефритов в Гомельской областной клинической больнице.

Определение минимальных подавляющих концентраций антибиотиков для 49 штаммов *E. coli*, 47 штаммов *P. aeruginosa*, 35 штаммов *Proteus spp.*, выделенных из мочи в 2005–2008 гг., и для 32 штаммов *E. coli*, 36 штаммов *P. aeruginosa*, 28 штаммов *Proteus spp.*, выделенных из мочи в 2009–2010 гг., проводили методом серийных разведений в агаре. Диапазон разведений антибиотиков 0,25–128 мкг/мл. Контроль качества определения антибиотикочувствительности проводился с использованием контрольных штаммов *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853.

С использованием метода «двойных дисков» выполнен фенотипический скрининг продукции БЛРС для 65 штаммов *E. coli*, 35 штаммов *Proteus spp.*, 10 штаммов *K. pneumoniae* с различными профилями резистентности к антибактериальным препаратам. Параллельно с анализом испытуемых культур исследовали контрольные штаммы: *E. coli* ATCC 25922 — отрицательный контроль (БЛРС–); *K. pneumoniae* ATCC 700603 — положительный контроль (БЛРС+).

Для выявления генов БЛРС различных классов (TEM, OXA, SHV, CTX-M) проведена полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Определена групповая принадлежность БЛРС классов TEM, SHV и CTX-M в мультиплексной ПЦР в реальном времени с последующей оценкой температур плавления зондов, позволяющей выявлять точечные мутации, придающие расширенный спектр бета-лактамазной активности в соответствующих кодонах генов. Для ПЦР-тестирования отобраны 49 культур с подтвержденным БЛРС-фенотипом (*E. coli* — 29 штаммов, *K. pneumoniae* — 5 штаммов, *Proteus spp.* — 15 штаммов).

Для количественной оценки интенсивности формирования микробных биопленок уропатогенами в исследование включено 150 исследуемых штаммов (69 *E. coli*, 56 *P. aeruginosa*, 15 *S. aureus*, 10 *K. pneumoniae*). Для исследования из суточных культур штаммов готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд, вносили в пробирки типа эппендорф с бульоном. После инкубации бульонную культуру удаляли и вносили в них по 1 мл 1% раствора генцианвиолета (ГЦВ) для окрашивания сформированных биопленок; инкубировали при 37°C 30 мин. Удалив раствор ГЦВ из эппендорфов, для экстракции краски из биопленки вносили по 1 мл 96% этанола. Для построения калибровочной кривой готовили контрольные образцы (спиртовые растворы ГЦВ с концентрацией 2, 10, 25 и 50 мг/л). Контрольные и опытные образцы вносили в лунки 96-луночного планшета; измерение концентраций ГЦВ проводили на иммуноферментном анализаторе АИФ-М/340, длина волны 570 нм.

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакета прикладных программ STATISTICA v.6.0. Для определения статистической значимости отличий между группами рассчитывали критерий значимости Стьюдента (t), вероятность значений разницы (p). Для оценки

различия частоты встречаемости признаков использован χ^2 -критерий Пирсона и соответствующий ему уровень значимости. Статистически значимыми считали результаты при уровне $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При проведении ретроспективного анализа этиологической структуры пиелонефритов в Гомельской областной клинической больнице установлено, что в структуре уромикрофлоры больных пиелонефритом в 2000–2003 гг. и 2008–2010 гг. доминировали представители семейства *Enterobacteriaceae* (эшерихия, протей, энтеробактер, клебсиелла, цитробактер, морганелла), среди которых первое место по частоте занимала *E. coli* (рис. 1).

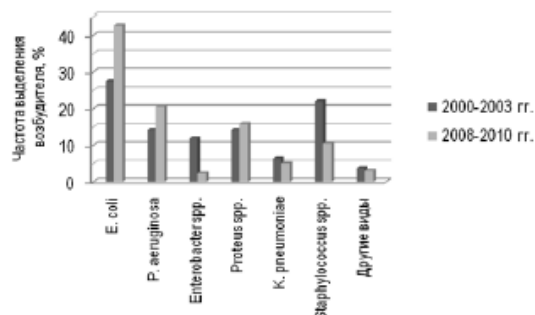


Рисунок 1 — Сравнительная характеристика этиологической структуры пиелонефритов

Частота выделения штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa* увеличивается в 1,5 раза в 2008–2010 гг. по сравнению с 2000–2003 гг. Удельный вес штаммов *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.* в 2008–2010 гг. снижается по сравнению с 2000–2003 гг. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* ($p=0,0001$), *P. aeruginosa* ($p=0,034$), *Staphylococcus spp.* ($p=0,0001$), *Enterobacter spp.* ($p<0,0001$). Удельный вес штаммов *Proteus spp.* и *K. pneumoniae* на протяжении 10 лет изменяется незначительно, что подтверждается отсутствием значимых отличий для этих штаммов ($p>0,05$).

При использовании метода серийных разведений в агаре на основе полученных данных проведен анализ динамики антибиотикочувствительности возбудителей пиелонефритов, выделенных в 2005–2008 гг. и в 2009–2010 гг. Сравнительные характеристики чувствительности клинических изолятов *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa* к антибиотикам представлены в таблице 1 и на рисунке 2.

Таблица 1 — Сравнительная характеристика антибиотикочувствительности штаммов *E. coli* и *Proteus spp.* в 2005–2008 гг. и 2009–2010 гг.

Антибиотик	<i>E. coli</i>		<i>Proteus spp.</i>	
	2005–2008 гг. (n=49), %	2009–2010 гг. (n=32), %	2005–2008 гг. (n=35), %	2009–2010 гг. (n=28), %
Амоксициллин	18,4±5,5	31,3±8,2	28,6±7,6	35,7±9,1
Амоксиклав	71,4±6,4	68,8±8,2	77,2±7,1	64,3±9,1
Цефотаксим	59,2±7,0	62,5±8,5	74,3±7,4	60,7±9,2
Цефтазидим	44,9±7,1	62,5±8,5	74,3±7,4	64,3±9,1
Цефепим	53,0±7,1	81,3±6,9	82,9±6,4	60,7±9,2
Имипенем	93,9±3,4	100,0	91,4±4,7	96,4±3,5
Ампициллин/ сульбактам	59,2±7,0	62,5±8,5	80,0±6,8	67,9±8,8
Ципрофлоксацин	79,6±5,7	75,0±7,6	82,9±6,4	60,7±9,2
Гентамицин	65,4±6,8	62,5±8,5	54,3±8,4	50,0±9,4
Амикацин	83,7±5,3	93,8±4,3	82,9±6,4	75,0±8,2

При сравнении данных по чувствительности штаммов *E. coli* за 5-летний период отмечается значительное повышение частоты чувствительности к цефепиму на 28,3% ($p=0,0097$), сохраняется чувствительность к имипенему (93,9–100%), амикацину (93,8%), цефепиму (81,3%), ципрофлоксацину (75,0%) ($p>0,05$). Защищенные пенициллины, цефалоспорины III поколения, гентамицин не-

значительно уступают по активности этим препаратам. Практически неактивным против штаммов *E. coli* был амоксициллин. Выявлена тенденция к росту чувствительности *E. coli* к цефтазидиму, но на имеющейся выборке статистически значимых различий не установлено. На протяжении 5 лет отмечено незначительное изменение чувствительности штаммов *E. coli* к амоксициллину/клавуланату, ампициллину/сульбактаму, цефотаксиму, ципрофлоксацину, гентамицину ($p > 0,05$).

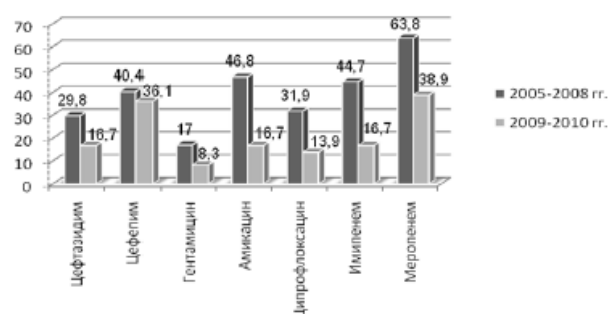


Рисунок 2 — Сравнительная характеристика антибиотикочувствительности штаммов *P. aeruginosa* в 2005–2008 гг. (n=47) и 2009–2010 гг. (n=36), %

За период с 2005–2008 гг. по 2009–2010 гг. отмечается снижение чувствительности *Proteus spp.* к цефалоспорином III–IV поколения (на 10,0–22,2%). Однако статистически значимые различия из цефалоспоринов выявлены только в активности цефепима ($p=0,049$). Также в 2009–2010 гг. отмечается снижение чувствительности *Proteus spp.* к аминогликозидам (на 4,3–7,9%), и ингибиторозащищенным β -лактамам (на 12,1–12,9%); статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$). Количество ципрофлоксацин-чувствительных штаммов *Proteus spp.* уменьшилось с 82,9 до 60,7% ($p=0,049$). Результаты показывают, что штаммы *Proteus spp.* за 5-летний период сохраняют чувствительность к имипенему.

На протяжении 2005–2010 гг. отмечается невысокая активность антибактериальных препаратов в отношении *P. aeruginosa*. В основном отмечена тенденция к увеличению количества резистентных штаммов к 2009–2010 гг. Активность карбапенемов в отношении *P. aeruginosa* традиционно считалась высокой. Однако наблюдается достоверное снижение числа чувствительных штаммов *P. aeruginosa* для имипенема с 44,7% в 2005–2008 гг. до 16,7% в 2009–2010 гг. ($p=0,007$), для меропенема с 63,8 до 38,9% ($p=0,024$), амикацина с 46,8 до 16,7% ($p=0,004$), ципрофлоксацина с 31,9 до 13,9% ($p=0,047$). В то же время значимых отличий в частоте встречаемости чувствительных штаммов *P. aeruginosa*, выделенных в 2005–2008 гг. и 2009–2010 гг., к цефтазидиму, цефепиму и гентамицину не выявлено.

С использованием метода «двойных дисков» продукция БЛРС выявлена у 29 из 65 (44,6%) штаммов *E. coli*. В предыдущих испытаниях, выполненных с помощью стандартного диско-диффузионного метода [7], устойчивость к цефотаксиму и цефтазидиму обнаруживалась только у 58,6% БЛРС-продуцирующих штаммов, устойчивость только к цефотаксиму — у 20,7% штаммов, устойчивость только к цефтазидиму — у 13,8% штаммов. 2 штамма *E. coli* (6,9%) с подтвержденной продукцией БЛРС при предварительном исследовании диско-диффузионным методом были отнесены к категории «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму.

Продукция БЛРС была выявлена у 5 (50,0%) штаммов *K. pneumoniae*. Из них 2 штамма ранее были охарактеризованы как «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму при использовании стандартного диско-диффузионного метода [7]. Продукция БЛРС была выявлена у 15 (42,9%) штаммов *Proteus spp.* (у 2 из них стандартный диско-диффузионный метод не позволил обнаружить устойчивости к цефтазидиму и цефотаксиму). Для всех штаммов с подтвержденной продукцией БЛРС отмечено увеличение диаметров зон подавления роста при добавлении клавулановой кислоты (синергизм) в отношении обоих цефалоспоринов.

При проведении геноиндикации БЛРС ни у одного из 49 исследуемых штаммов энтеробактерий БЛРС класса OXA не обнаружены. У 38 из 49 штаммов амплифицировался участок гена blaTEM, однако нуклеотидных замен в 104 позиции, придающих БЛРС-активность, выявлено не было (WT, дикий тип). У всех исследованных штаммов *Proteus spp.* и *E. coli* (не зависимо от наличия или отсутствия фенотипически определяемой БЛРС-активности) гены blaSHV не детектировались. Обнаружены blaSHV-гены у изолятов *K. pneumoniae*, относящиеся к генетической группе SHV-1 (плазмидно-кодируемые пенициллиназы SHV-1), не обладающие расширенным спектром активности в отношении бета-лактамовых антибиотиков.

У 14 штаммов *E. coli*, 8 штаммов *P. mirabilis* и 5 штаммов *K. pneumoniae* обнаружен продукт амплификации длиной около 97 п.н. с температурой плавления 82,8–83,0°C. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (генетическая группа СТХ-М-1). У 2 штаммов *E. coli* обнаружен продукт амплификации длиной 518 п.н. с температурой плавления 91°C. Аналогичный ПЦР-продукт амплифицировался для позитивного контроля *E. coli* (генетическая группа СТХ-М-9).

Проводя количественную оценку интенсивности формирования биопленок уропатогенами выявили, что все клинические изоляты *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* обладали выраженной способностью к образованию биопленок. Для изолятов *E. coli* концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных растворах находились в диапазоне 3,35–17,11 мг/л, *K. pneumoniae* — 4,45–18,79 мг/л, *P. aeruginosa* — 3,36–56,0 мг/л, *S. aureus* — 4,21–7,74 мг/л.

Среди возбудителей острых и хронических пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали штаммы *P. aeruginosa*, пленкообразующая способность которых в 2–3 раза превосходила способность к формированию биопленок у штаммов энтеробактерий и стафилококков. Для изолятов, выделенных от больных хроническими пиелонефритами, обнаружено значительное преобладание пленкообразующей активности по сравнению с микроорганизмами, выделенными при острых пиелонефритах. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* ($p < 0,0001$), *P. aeruginosa* ($p < 0,0001$), *K. pneumoniae* ($p = 0,0222$), *S. aureus* ($p = 0,0279$). Возбудители, выделенные от больных пиелонефритами с сопутствующей мочекаменной болезнью, в целом отличались большей способностью к пленкообразованию, по сравнению с возбудителями инфекций, протекающих без уролитиаза; различия статистически значимы для энтеробактерий ($p = 0,0011$), отсутствие статистически значимых различий для штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* возможно связано с небольшим объемом выборки.

На основе данных пленкообразующей активности возбудителей пиелонефритов определены средние значения ($M \pm m$) массы красителя для исследуемых микроорганизмов: *E. coli* — $6,50 \pm 0,34$, *K. pneumoniae* — $9,49 \pm 1,5$, *P. aeruginosa* — $18,25 \pm 1,15$. Выявлены ряд штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* с максимальной и минимальной биопленкообразующей способностью, у которых проанализировали профили антибиотикорезистентности для выявления взаимосвязи между способностью штаммов к пленкообразованию и антибиотикорезистентностью. Установили, что штаммы *E. coli*, *P. aeruginosa* с максимальной биопленкообразующей способностью обладали сочетанной устойчивостью ко многим, чаще 6–7 антибиотикам. В отношении штаммов *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей способностью антибактериальные препараты более активны — профили резистентности имели место только к 4 антибиотикам. Клинические изоляты *E. coli* с минимальной биопленкообразующей способностью зачастую устойчивы к 1–3 антибиотикам, реже — к 4 препаратам; в некоторых случаях такие штаммы *E. coli* не имели устойчивости к антибактериальным препаратам. В отношении же штаммов *K. pneumoniae* с минимальной биопленкообразующей способностью отмечена устойчивость к 1–2 антибиотикам, *P. aeruginosa* — к 2–4 антибиотикам.

Выводы. Таким образом, в современных условиях спектр выделяемых возбудителей пиелонефритов кардинально не изменился, однако, отмечено увеличение частоты выделения штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, и снижение количества штаммов *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.* Установлена широкая распространенность устойчивости энтеробактерий к β -лактамам и не- β -лактамам антибиотикам. На протяжении 2005–2010 гг. отмечается невысокая активность антибиотиков в отношении *P. aeruginosa* с тенденцией к увеличению количества резистентных штаммов к 2009–2010 гг., что требует пересмотра схем рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов. У 44,6% штаммов *E. coli*, 50% штаммов *K. pneumoniae* и 42,9% штаммов *Proteus spp.* с использованием фе-

нотипического метода выявлена продукция БЛРС. Причем 12,2% БЛРС-положительных штаммов ранее были охарактеризованы как «чувствительные» к цефотаксиму и цефтазидиму при использовании стандартного диско-диффузионного метода. В связи с этим для тестирования таких штаммов показано использование дополнительных тестов (метод «двойных дисков»), выявляющих устойчивость к антибиотикам, опосредованную продукцией БЛРС. Установлено, что БЛРС-активность исследуемых штаммов *E. coli*, *P. mirabilis* и *K. pneumoniae* опосредована наличием генов СТХ-М.

Среди возбудителей пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Преобладание пленкообразующей активности обнаружено для штаммов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенных от больных хроническими пиелонефритами и с сопутствующей мочекаменной болезнью. Таким образом, способность к формированию биопленки определяется как видом возбудителя, так и характером инфекционного процесса. Выявлено, что *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* с максимальной пленкообразующей активностью более устойчивы к антибиотикам, чем штаммы с минимальной способностью формировать биопленки. Таким образом, способность к формированию биопленки обеспечивает возбудителям пиелонефритов повышение устойчивости к антибиотикам, требует пересмотра принципов терапии хронических инфекций мочевыводительной системы с внедрением методов, направленных на предотвращение формирования или разрушение уже сформированной биопленки.

Литература

1. Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic cost / B. Foxman // Am. J. Med. — 2002. — Vol. 113, Suppl. 1. — P. 5–13.
2. Перепанова, Т.С. Инфекции почек и мочевыводящих путей: современные подходы к терапии / Т.С. Перепанова // Фарматека. — 2004. — № 3/4. — С. 16–22.
3. Яровой, С.К. Эмпирическая терапия пиелонефрита / С.К. Яровой, Н.Л. Шимановский, Е.Н. Карева // Урология. — 2010. — № 2. — С. 21–27.
4. Update on biofilm infections in the urinary tract / P. Tenke [et al.] // World J. Urol. — 2012. — Vol. 30. — P. 51–57.
5. Страчунский, Л.С. β-Лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза / Л.С. Страчунский // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерап. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 92–96.
6. Paterson, D.L. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update / D. L. Paterson, R.A. Bonomo // Clin. Microbiol. Rev. — 2005. — Vol. 18, № 4. — P. 657–686.
7. Лагун, Л.В. Алгоритм рациональной антибактериальной терапии пиелонефритов и его микробиологическое обоснование / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский // Пробл. здоровья и экологии. — 2012. — № 4. — С. 62–69.

ESTIMATION OF ETIOLOGIC STRUCTURE OF PYELONEPHRITISES AND STUDY OF MOLECULAR-BIOLOGICAL QUALITY OF UROPATHOGENS

Lagun L.V., Tapalski D.V.

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

A total of 273 clinical strains of microorganisms isolated in 2005–2010 years from urine of patients with acute and chronic pyelonephritis are included in to the research. Retrospective analysis of etiologic structure of pyelonephritises for periods of years 2000–2003 and of years 2008–2010 is performed. In etiologic structure of pyelonephritises is prevailed *E. coli* and *P. aeruginosa*. Resistance of etiologic agents of pyelonephritises to antibiotics of various groups was evaluated. High prevalence of extended-spectrum β-lactamases producers concerning to CTX-M group was revealed. Among etiological agents of pyelonephritis the maximum film-forming ability *P. aeruginosa* isolates are possessed. The strains isolated from patients with chronic pyelonephritis and pyelonephritis proceeding with urolithiasis have surpassed in ability biofilm formation than the strains isolated from patients with acute pyelonephritis. Higher resistance to antibacterial agents is revealed for microorganisms *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* with maximum intensity of biofilm formation. Data obtained during study about etiologic structure of pyelonephritises, ability to biofilm formation of clinical isolates, levels and resistance mechanisms of uropathogens to antibacterial agents may be use for development algorithm of microbiological diagnostics and rational antibacterial therapy of pyelonephritises.

Keywords: acute and chronic pyelonephritises, etiologic agents of pyelonephritises, resistance to antibiotics, extended-spectrum beta-lactamases, biofilms.

Поступила 04.09.2013