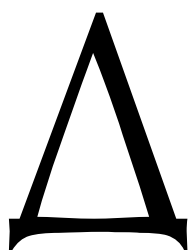


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ
ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ «НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
СПЕЦИАЛИСТОВ
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 67

9 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

АВГУСТ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостоповская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

Ответственность за достоверность
информации, содержащейся в рекламных
материалах, несут рекламодатели

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 02.09.2022.
Подписано в печать 15.09.2022. Формат
60 × 88¹/₈.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,87.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical Ab-
stracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological
Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier
BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals,
Index Medicus, Index to Dental Literature, National
Library of Medicine PubMed, OCLC Article First,
OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thom-
son Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson
Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi
Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.akc.ru,
www.pressa-rl.ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 9. 493-556.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА,
А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ,
Л.М. СКУИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответст-
венный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (Ташкент), Т.В. ВАВИЛОВА (Санкт-
Петербург), I. WATSON (Великобритания, Ливерпуль),
А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (Уфа), Д.А. ГРИЩЕНКО (Красноярск),
В.С. ГУДУМАК (Кишинёв), Н.Г. ДАШКОВА (Москва),
В.А. ДЕЕВ (Киев), Т.И. ДОЛГИХ (Омск), С.А. ЕЛЬ-
ЧАНИНОВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск),
А. KALLNER (Швеция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО
(Санкт-Петербург), К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗ-
ЛОВ (Санкт-Петербург), Г.В. КОРШУНОВ (Саратов),
Г.М. КОСТИН (Минск), А.Г. КОЧЕТОВ (Москва),
Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (Москва), Г.Г. ЛУНЕВА (Киев),
А.Р. МАВЗЮТОВ (Уфа), В.Н. МАЛАХОВ (Москва),
Е.Н. ОВАНЕСОВ (Москва), Ю.В. ПЕРВУШИН (Ставрополь),
И.В. ПИКАЛОВ (Новосибирск), Ю.П. РЕЗНИКОВ (Москва),
С.Н. СУПЛОТОВ (Тюмень), О.А. ТАРАСЕНКО (Москва),
И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (Москва), А.Б. УТЕШЕВ (Алматы),
С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Моск-
ва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ
(Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛ'СТВО
"МЕДИЦИНА"

THE ALL-RUSSIAN
ORGANIZATION
"THEORETICAL AND
PRACTICAL SOCIETY
OF SPECIALISTS
OF LABORATORY
MEDICINE"

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ Диагностика

Volume 67
9 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

AUGUST

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

**The responsibility for credibility of
information contained in advertising materials
is accounted for advertisers**

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

All rights reserved. Any part of this edition can not
be entered computer memory nor be reproduced
with any other mode without preliminary permission
of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the
Russian index of scientific quotation (RiNZ) and
in following I&R editions: Abstracts of Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost
Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-
BASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica,
Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental
Literature, National Library of Medicine PubMed,
OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions
Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's
International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY,
L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA
(executive editor), I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*),
I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV
(*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK
(*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*),
T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*),
A.V. INDUTNY (*Omsk*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*),
A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN
(*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), G.V. KOR-
SHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHET-
TOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*),
V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛ'СТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Обухова Л.М., Евдокимов И.И., Медяник И.А., Орлинская Н.Ю., Гришин А.С., Бабинцев В.Е.,
Баринков Ю.А., Конторщиков М.М., Горшкова Т.Н., Лазукин В.Ф.
Перспективы использования элементного статуса крови для оценки
молекулярно-генетического профиля глиом. 497

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Бутина Е.В., Йовдий А.В., Попонина Е.А., Смольникова М.В.,
Шерстнев Ф.С., Парамонов И.В.
Особенности распределения антигенов эритроцитов систем Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lewis,
Lutheran у доноров крови Кировской области. 504

ЦИТОЛОГИЯ

- Сметанина С.В., Славнова Е.Н., Ускова Е.Ю., Хусиянова А.А., Державин В.А.
Хондросаркома грудной клетки с внутрибрюшным распространением (случай из практики). 507

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Лебедева С.С.
Оценка влияния аналитических характеристик микробиологического исследования крови при
бактериемии в многопрофильном стационаре 511

- Мангутов Э.О., Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Алексеева Л.П.,
Евдокимова В.В., Якушева О.А., Попивненко М.Д.
Corynebacterium spp.: взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к
антимикробным препаратам 519

- Челпаченко О.Е., Данилова Е.И., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Никифоров И.А., Чайникова И.Н.,
Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А.
Количественный метод определения антибиотикорезистентных копроштаммов для ранней
диагностики хронического артрита 525

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Останкова Ю. В., Серикова Е.Н., Семенов А. В., Тотолян Арег А.
Метод выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке
на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени 530

- Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С.
Выявление гена белка-адгезина *babA2* у клинических изолятов *Helicobacter pylori* 538

- Бородулина Е.А., Пискун В.В., Ураксина М.В., Шубина А.Т.
Молекулярно-генетические тесты GeneXpert MTB/rif и Xpert MTB/rif (Ultra) в диагностике
туберкулёза (обзор литературы). 544

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Домотенко Л. В., Миронов А. Ю., Косилова И. С., Шепелин А. П. Стандартность дисков с антимикробными
препаратами различных производителей в свете импортозамещения. 550

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Obukhova L.M., Evdokimov I. I., Medyanik I.A., Orlinskaya N.Yu., Grishin A.S., Babintsev V.E., Barinov Yu.A., Kontorshchikov M.M., Gorshkova T.N., Lazukin V.F.*
Prospects for the use of blood elemental status to assess the molecular genetic profile of gliomas 497

HEMATOLOGY

- Butina E.V., Yovdiy A.V., Poponina E.A., Smolnikova M.V., Sherstnev F.S., Paramonov I.V.*
Features of the distribution of the antigens of Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lewis, Lutheran blood group systems in blood donors in the Kirov region. 504

CYTOLOGY

- Smetanina S.V., Slavnova E.N., Uskova E.Yu., Khusiyanova A.A., Derzhavin V.A.*
Hondrosarcoma of the chest with intraabdominal distribution (case report). 507

MICROBIOLOGY

- Haliulin A.V., Lyamin A.V., Gusjakova O.A., Kozlov A.V., Lebedeva S.S.*
Evaluation of the influence of the analytical characteristics of the microbiological blood study in bacteremia in a multidisciplinary hospital 511

- Mangutov E.O., Alieva A.A., Kharseeva G.G., Voronina N.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V., Yakusheva O.A., Popivnenko M.D.*
Corynebacterium spp.: relationship of pathogenic properties and antimicrobial resistance. 519

- Chelpachenko O.E., Danilova E., Perunova N.B., Ivanova E.V., Nikiforov I.A., Chainikova I.N., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A.*
Quantitative method for the determination of antibiotic-resistant gut bacterial strains for the early diagnosis of chronic arthritis. 525

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Ostankova Yu. V., Serikova E.N., Semenov A. V., Totolian Areg A.*
Method for hepatitis B virus DNA detecting in biological material at low viral load based on nested PCR with detection on three viral targets in real-time mode. 530

- Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S.*
Detection of the *babA2* adhesin protein gene in *Helicobacter pylori* clinical isolates. 538

- Borodulina E.A., Piskun V.V., Uraksina M.V., Shubina A. T.*
Molecular genetic tests GeneXpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF (Ultra) in the diagnosis of tuberculosis (review of literature). 544

ORGANIZATION OF LABORATORY SERVICE

- Domotenko L. V., Mironov A. Yu., Kosilova I. S., Shepelin A. P.*
Standardness of antimicrobial discs by various manufacturers in the light of import substitution. 550

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Обухова Л.М.¹, Евдокимов И.И.², Медяник И.А.¹, Орлинская Н.Ю.¹, Гришин А.С.¹, Бабинцев В.Е.¹,
Барин Ю.А.¹, Конторщиков М.М.¹, Горшкова Т.Н.³, Лазукин В.Ф.¹.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕМЕНТНОГО СТАТУСА КРОВИ ДЛЯ ОЦЕНКИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ГЛИОМ

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603950, Нижний Новгород, Россия;

²ФГБУН «Институт химии высокочистых веществ им. Г.Г. Девярых» РАН, 603951, Нижний Новгород, Россия;

³ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» Федерального медико-биологического агентства России, 603001, Нижний Новгород, Россия

Установлено, что элементный гомеостаз крови имеет отношение к глиоматозу, что повышает привлекательность анализа его компонентов как перспективных дооперационных опосредованных характеристик молекулярно-генетического профиля глиом. Цель данной работы проанализировать взаимосвязь параметров минерального обмена с иммуногистохимическими характеристиками глиальных опухолей и оценить клиническую значимость анализа элементного гомеостаза крови для дооперационной оценки молекулярного профиля глиом. Уровень онкомаркеров MGMT, Ki-67, p-53, IDH1 определяли иммуногистохимически с использованием клонов соответствующих антител. Анализ уровня микроэлементов осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой, пересчитывая результаты на 1 г белка, который определяли методом Лоури. Данные об уровне онкомаркеров, полученные в первичных опухолях головного мозга (20) и в плазме крови больных глиомами (20) и практически здоровых людей (5) сопоставляли с применением ряда статистических программ. Выявлены значимые отличия уровней натрия, калия, цинка и меди в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1. Впервые отмечена значимая корреляция, показывающая согласованность между уровнем онкомаркеров глиальных опухолей и минеральным обменом крови. Выявленные зависимости углубляют понимание механизмов глиоматоза и могут быть использованы в качестве предиктивной дооперационной оценки молекулярно-генетических маркеров глиом.

Ключевые слова: микроэлементы; медь; цинк; макроэлементы; натрий; калий; молекулярно-генетические маркеры глиом; IDH1; MGMT; Ki 67; p 53.

Для цитирования: Обухова Л.М., Евдокимов И.И., Медяник И.А., Орлинская Н.Ю., Гришин А.С., Бабинцев В.Е., Барин Ю.А., Конторщиков М.М., Горшкова Т.Н., Лазукин В.Ф. Перспективы использования элементного статуса крови для оценки молекулярно-генетического профиля глиом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 497-503.
DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-497-503

Для корреспонденции: Обухова Лариса Михайловна, д-р биол. наук, доц., проф. каф. биохимии им. Г.Я. Городиской; e-mail: ObuhovaLM@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы развития ПИМУ «Приоритет 2030» № 204.

Поступила 22.06.2022

Принята к печати 01.07.2022

Опубликовано 12.09.2022

Obukhova L.M.¹, Evdokimov I.I.², Medyanik I.A.¹, Orlinskaya N.Yu.¹, Grishin A.S.¹, Babintsev V.E.¹, Barinov Yu.A.¹,
Kontorschikov M.M.¹, Gorshkova T.N.³, Lazukin V.F.¹

PROSPECTS OF USING THE ELEMENTAL STATUS OF BLOOD TO ASSESS THE MOLECULAR GENETIC PROFILE OF GLIOMAS

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Educational «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Federal Budgetary Scientific Institution G.G. Devyatikh Institute of Chemistry High-Purity Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, 603951, Russia;

³Federal State-Funded Healthcare Institution "Privolzhsky District Medical Center of Federal and Biological Agency of Russia, Nizhny Novgorod, 603001, Nizhny Novgorod, Russia

It has been established that blood element homeostasis is related to gliomagenesis which increases the attractiveness of the analysis of its components as a promising preoperative mediated characteristics of the molecular genetic profile of gliomas. The aim of this work is to analyze the relationship between mineral metabolism parameters and immunohistochemical characteristics of glial tumors and evaluate the clinical significance of blood element homeostasis analysis for preoperative assessment of the molecular profile of gliomas. The levels of cancer specific markers MGMT, Ki-67, p-53, IDH1 were determined immunohistochemically using the corresponding antibody clones. Micronutrient levels were analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry recalculating the results per 1 g of protein which was determined by the Lowry method. The data on cancer-specific marker levels obtained in primary brain tumors (20) and in blood plasma of gliomas patients (20) and practically healthy subjects (5) were compared using a number of statistical programs. We found significant differences in the levels of sodium, potassium,

zinc and copper depending on the value of the mitotic index Ki-67 and IDH1 isocitrate dehydrogenase gene mutation. For the first time, a significant correlation showing the consistency between the level of glial tumor cancer-specific markers and blood mineral metabolism was observed. The revealed correlations provide new insights into understanding of gliomagenesis mechanisms and can be used as a predictive preoperative assessment of molecular genetic markers of gliomas.

Key words: *trace elements; copper; zinc; macroelements; sodium; potassium; molecular genetic markers of gliomas; IDH1; MGMT; Ki 67; p 53.*

For citation: Obukhova L.M., Evdokimov I. I., Medyanik I.A., Orlinskaya N.Yu., Grishin A.S., Babintsev V.E., Barinov Yu.A., Kontorshchikov M.M., Gorshkova T.N., Lazukin V.F. Prospects for the use of blood elemental status to assess the molecular genetic profile of gliomas. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67(9): 497-503 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-497-503>

For correspondence: Obukhova Larisa Mikhailovna, Doctor of Biological Sciences, associate professor, professor of the Department of Biochemistry. G.Ya. Gorodissky; e-mail: ObukhovaLM@yandex.ru

Information about authors:

Obukhova L.M.,	https://orcid.org/0000-0003-4064-9616 ;
Evdokimov I.I.,	https://orcid.org/0000-0002-1341-9105 ;
Medyanik I.A.,	https://orcid.org/0000-0002-7519-0959 ;
Orlinskaya N.Yu.,	https://orcid.org/0000-0003-2896-2968 ;
Grishin A.S.,	https://orcid.org/0000-0001-7885-8662 ;
Babintsev V.E.,	https://orcid.org/0000-0002-7566-0930 ;
Barinov Yu.A.,	https://orcid.org/0000-0002-4789-2048 ;
Kontorshchikov M.M.,	https://orcid.org/0000-0002-0262-5448 ;
Gorshkova T.N.,	https://orcid.org/0000-0001-9859-4123 ;
Lazukin V.F.,	https://orcid.org/0000-0003-0916-0468 .

Conflict of interest. *The authors declare the absence of a conflict of interest.*

Acknowledgment. *This work was supported financially by PIMU Development Program "Priority 2030" № 204.*

Received 22.06.2022
Accepted 01.07.2022
Published 12.09.2022

Введение. В мире ежегодно фиксируется около 240 000 новых случаев и около 175 000 смертей от опухолей мозга [1]. Начиная с 2016 г. в классификационные параметры первичных опухолей ЦНС включены ряд генетических мутаций. К наиболее часто используемым в клинической практике маркерам, определяемым с помощью иммуногистохимии, относятся мутации IDH, метилирование промотора MGMT, белок p53, уровень пролиферативной активности Ki-67 [2].

Ген IDH кодирует фермент цикла трикарбоновых кислот изоцитратдегидрогеназу [3]. Изоцитратдегидрогеназа 1, которая в основном располагается в цитоплазме, катализирует окислительное декарбоксилирование изоцитрата с образованием альфа-кетоглутарата и восстановленной формы NADPH₂. Мутации IDH появляются на самых ранних этапах формирования опухоли, участвуя в глиомогенезе [4].

Опухолевый супрессор белок p53 индуцирует апоптоз при повреждениях генома, блокирует клеточный цикл, предотвращая накопление генетически дефектных клеток [5]. Мутации TP53 приводят к инактивации соответствующего белка и дальнейшему развитию онкогенеза [6].

Ki-67 – ядерный белок, ассоциирован с пролиферацией клеток и принимает участие в синтезе рибосомальной РНК [7]. Он обнаруживается во всех активных фазах клеточного цикла и не проявляет себя в фазе покоя. Его экспрессия отражает выраженность пролиферативной активности ткани. В глиальных новообразованиях Ki-67 используется как вспомогательный маркер для дифференциальной диагностики Low Grade (I, II) и High Grade (III, IV) глиом [8, 9].

О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT) осуществляет репарацию ДНК [10]. Присоединение метильной группы к промотору ограничивает способность

ДНК-полимеразы связываться с ним, делая невозможным дальнейшую экспрессию гена [11]. Метилирование промотора MGMT- наиболее значимый предиктивный маркер выраженности ответа на химиотерапию алкилирующими агентами [12].

Важное предиктивное значение имеет метилирование промотора гена фермента О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT). Также отмечается детерминирующее и прогностическое значение многих других маркеров, к примеру, ядерного белка Ki-67, транскрипционного белка p53 [2].

Данные о молекулярном профиле глиом появляются лишь после проведения иммуногистохимического анализа биопсийного или послеоперационного материала. Достоверная информация о уровне опухолевых маркеров глиом позволит существенно повысить эффективность лечения и оптимизировать тактику ведения непарабельных пациентов, которым, в силу расположения опухоли, невозможно провести биопсию.

Многие белки, в том числе и белки клеточных сигнальных путей, используя в качестве кофактора металлы, способны изменять свою активность в зависимости от концентрации соответствующих ионов. Поэтому неудивительно, что элементный гомеостаз играет значимую роль в патогенезе опухолевого роста через процессы пролиферации, дифференцировки, регенерации, апоптоза и некроза клеток [13,14].

Цель данной работы – проанализировать взаимосвязь параметров минерального обмена с иммуногистохимическими характеристиками глиальных опухолей и оценить клиническую значимость анализа элементного гомеостаза крови для дооперационной оценки молекулярного профиля глиом.

Материал и методы. Обследовали 20 больных с глиомами в возрасте от 39 до 61 года до проведе-

ния противоопухолевой терапии при микрохирургическом удалении опухоли под навигационным и нейрофизиологическим мониторингом с интраоперационным пробуждением и контролем речевой функции (табл. 2). Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава РФ (№6 от 17.04.2019г.). У всех пациентов клинический диагноз подтвержден данными гистологического исследования опухоли в соответствии с классификацией ВОЗ опухолей ЦНС [2] (табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование маркеров глиальных опухолей. Послеоперационный материал фиксировался в растворе 10% формалина. Перед окрашиванием проводилась стандартная процедура депарфинизации и демаскировки. Применялись следующие клоны антител: Anti-IDH1 R132H (Dianova International, Испания); Anti-MGMT (клон EP337), артикул AC-

0307RUO (Epitomics, США), Anti-p53 (клон DO-7) (Leica biosystems, Германия), антитела Ki-67 (клон SP6) (Thermo Scientific, США). Наличие мутации IDH1 оценивалось по присутствию цитоплазматической экспрессии. Уровень маркеров MGMT, Ki-67, p-53 считался по доле позитивного ядерного окрашивания. При исследовании во внимание принималось окрашивание только с умеренной или высокой выраженностью (рис. 1, а–г). Значения распространенности IDH1 и p53 были расформированы по группам: менее 1/10, от 1/10 до 1/3, от 1/3 до 1/2, более 1/2 окрашенных клеток [15, 16]. Подсчёт доли Ki-67 и MGMT осуществлялся в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$ [17]. Значения полученных результатов выражались как доля окрашенных клеток в 10 полях зрения [18]. При исследовании наличия метилирования промотора MGMT позитивным результатом считалось ядерное окрашивание в менее 15% клеток [19].

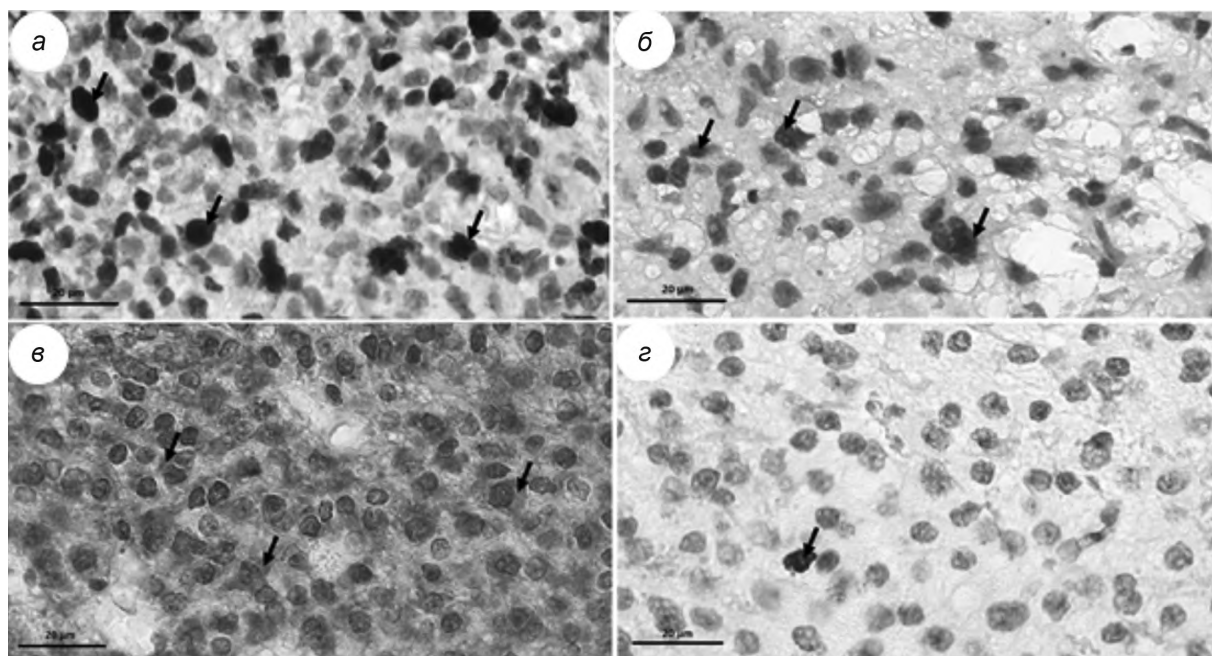


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование маркеров глиальных опухолей.

а – уровень ядерного негистонового белка – маркера пролиферации клеток Ki-67 в материале глиобластомы Grade IV. Диффузное выраженное ядерное коричневое окрашивание (стрелки) показывает реакцию связывания антиген – антитело (до 50% клеток в горячих точках), что свидетельствует о высоком индексе пролиферации Ki-67. б – наличие маркера p53 в материале анапластической астроцитомы Grade III. Диффузное умеренно выраженное ядерное окрашивание (стрелки) показывает реакцию связывания антиген – антитело, что свидетельствует о наличии мутантного белка p53. в – наличие мутации IDH1 в материале диффузной астроцитомы Grade II. Диффузное умеренно выраженное коричневое окрашивание в цитоплазме показывает реакцию связывания антиген – антитело (стрелки), что свидетельствует о наличии мутации IDH1. з – наличие метилирования MGMT в материале диффузной астроцитомы Grade II. Точечное (менее 10% клеток) ядерное коричневое окрашивание (стрелка) показывает реакцию связывания антиген – антитело, что свидетельствует о наличии метилирования промотора MGMT. Ув. $\times 1000$, Bar: 20 μm .

Таблица 1

Характеристика клинического материала с клиничко-патологическими особенностями больных глиомами

Показатели	Возраст, годы		Пол		Средний объем опухоли (см ³)
	< 60	≥ 60	Муж.	Жен.	
Контрольная группа (n=5)	4	1	2	3	-
Grade I (n=1)	1			1	121,9
Grade II (n=6)	2	4	2	4	99,06
Grade III (n=3)	2	1	2	1	66,6
Grade IV (n=10)	3	7	7	3	89,7

Так как IDH, MGMT, p53 оцениваются в формате наличие/отсутствие, без единиц измерения, результаты представлены как % случаев наличия маркера. При оценке Ki-67 определяли % окрашивания в препарате, поэтому для данного маркера результаты указаны как медиана и межквартильный диапазон.

Анализ элементного гомеостаза крови. Анализ уровня макро- и микроэлементов осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на спектрометре iCAP6300Duo (Thermo Scientific, США). Результаты пересчитывали на 1 г белка, который определяли методом Лоури с использованием набора реактивов ООО «Фирма Синтакон» (Россия). Контролем служила кровь практически здоровых людей.

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета StatPlus6. Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критериям Колмогорова-Смирнова/Лиллифорса, Шапиро-Уилка. Поскольку распределение данных отличалось от нормального, полученные результаты представляли в виде медианы, квартилей и применяли непараметрические методы сравнения. Достоверность полученных различий оценивали с применением непараметрических критериев (U-критерий Манна-Уитни, критерий Колмогорова-Смирнова). U-критерий Манна-Уитни используют для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака, что позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Критерий Колмогорова-Смирнова позволяет проверить гипотезу о том, что данные в двух выборках являются частью одного распределения, и также может применяться для оценки достоверности различий между двумя независимыми выборками, однако, обладает меньшей статистической мощностью, чем U-тест Манна-Уитни. Для всех статистических критериев значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Проводили корреляционный анализ по Спирмену для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Результаты и обсуждение. Уровень молекулярно-генетических маркеров глиом. Иммуногистохимический профиль изучался в пилоцитарной астроцитоме Grade I, в астроцитомах и олигодендроглиомах с уровнем

анаплазии II, III, а также в первичных глиобластомах, глиоме средней линии и астроцитомах Grade IV. Были исследованы мутация IDH1 как прогностический маркер поведения опухоли; метилирование промотора MGMT, как предиктивный маркер ответа на химиотерапию; уровень Ki-67, как отражение пролиферативной активности; белок p53, как косвенный маркер астроцитарных новообразований, включенный в цепочку онкогенеза. По результатам иммуногистохимического исследования маркеры IDH1, метилирование промотора MGMT, p53 встречались во всех группах глиом (табл. 2).

Значение пролиферативного индекса Ki-67 возрастало с увеличением степени анаплазии и было наиболее высоким в группе глиом Grade IV. Выявление белка p53 не имело явной зависимости от степени злокачественности (см. табл.2). Однако, опухолевый маркер p53 отсутствовал во всех четырех случаях олигодендроглиом и присутствовал в большинстве астроцитарных образований. IDH1 мутация прослеживалась во всех случаях олигодендроглиом и астроцитом Grade II-IV. В первичных глиобластомах, глиоме средней линии и пилоцитарной астроцитоме мутация IDH1 не обнаружена. Метилирование промотора MGMT преобладало в глиомах II, III степени. Полученные результаты соответствуют классификации ВОЗ первичных опухолей ЦНС 2021.

Изменение уровня макроэлементов в крови пациентов с глиомами. В табл. 3 представлены статистические характеристики концентрации макроэлементов в плазме крови при глиомах.

Как следует из данных, приведенных в табл. 3, при глиальных опухолях в крови значимо возрастает уровень натрия, кальция, магния, фосфора, серы, а уровень калия наоборот снижается.

Изменение уровня микроэлементов в крови пациентов с глиомами. В табл. 4 представлены статистические характеристики концентрации микроэлементов в плазме крови при глиомах.

Как следует из данных, приведенных в табл. 4, в плазме крови у пациентов с глиомами значимо увеличивается содержание железа, цинка, лития. Уровень селена, молибдена, алюминия, кобальта, хрома, ванадия и никеля – снижается по сравнению с практически здоровыми людьми.

Характеристика элементного гомеостаза крови в зависимости от иммуногистохимического профиля глиом. Была проанализирована корреляционная зависимость уровня макро- и микроэлементов плазмы крови с

Таблица 2

Морфометрическая оценка опухолевых маркеров в ткани глиом различной степени анаплазии

Grade	I	II	III	IV
Число пациентов в группе	1	6	3	10
IDH1, % выявления мутации	0%	100%	100%	30%
MGMT, % выявления метилирования	100%	83%	100%	30%
p53, % выявления	0%	66%	0%	80%
Ki-67 высокий (более 10%), % выявления	0%	0%	100%	100%
Ki-67 низкий (менее 10%), % выявления	100%	100%	0%	0%
Медиана Ki-67	-	2%	12%	37%
Межквартильные интервалы Ki-67 (25-75)	-	1,5-3%	-	25-40%

маркерами опухолевого роста глиом (табл.5). Значимые взаимосвязи с уровнем онкомаркеров были выявлены только для Ki-67 и IDH1 (табл. 5).

Далее данные о параметрах минерального обмена были разделены по группам в зависимости от иммуногистохимического профиля по соответствующему маркеру. На рисунках представлены только данные со значимыми отличиями между группами.

Концентрация натрия в плазме крови значимо ниже в группе с низким митотическим индексом Ki-67 (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,08$) (рис. 2).

Поскольку содержание онкомаркера Ki-67 демонстрирует выраженность пролиферативной активности опухолевой ткани, можно сказать, что при высокой митотической активности опухоли (при III, IV степени анаплазии) удельная концентрация натрия в крови возрастает, по всей видимости, это связано с изменением активности Na/K-АТФазы.

Уровень натрия (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,03$) и калия (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,07$) в плазме крови значимо отличается в группе с выявленной мутацией IDH1. Наличие мутации IDH1 в глиальных новообразованиях взрослых является мощным прогностическим маркером: при её наличии опухоль ведёт себя менее агрессивно, отмечается улучшение прогноза в виде увеличения безрецидивной и общей выживаемости [20]. Изоцитратдегидро-

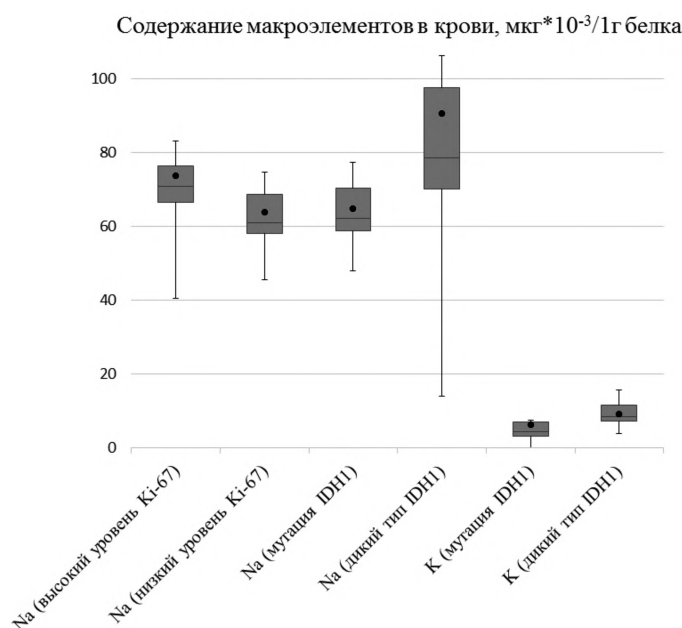


Рис. 2. Медиана и межквартильные диапазоны содержания макроэлементов в плазме крови в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1.

Таблица 3

Содержание макроэлементов (мкг $\times 10^{-3}$ / 1г белка) в крови при глиомах

Макро-элементы	Контроль (n=5)		Глиомы, мкг $\times 10^{-3}$ / 1г белка		U-критерий Манна-Уитни	Критерий Колмогорова-Смирнова
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ		
Na	48,8729; 48,4889-49,4462	48,4889- 49,4462	68,8324*; 61,5385-74,0741	61,5385- 74,0741	$p=0,0023$	$p=0,0242$
K	22,1065; 21,9171-23,0641	21,9171-23,0641	7,0769*; 3,5930-8,3182	3,5930- 8,3182	$p=0,0023$	$p=0,0019$
Ca	1,1151; 1,0815-1,1644	1,0815-1,1644	1,4166*; 1,2991-1,6620	1,2991- 1,6620	$p=0,0121$	$p=0,0868$
Mg	0,2549; 0,2461-0,2659	0,2461-0,2659	0,3755*; 0,2879-0,4665	0,2879- 0,4665	$p=0,0093$	$p=0,2497$
P	0,7275; 0,6184-0,8931	0,6184-0,8931	1,6074*; 1,4337-2,2059	1,4337- 2,2059	$p=0,0087$	$p=0,056$
S	0,3451; 0,2471-0,4239	0,2471-0,4239	10,6087*; 8,8880-11,6667	8,8880- 11,6667	$p=0,0052$	$p=0,0241$

Примечание. * – статистически значимые отличия с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

Таблица 4

Содержание микроэлементов (мкг $\times 10^{-3}$ / 1г белка) в крови при глиомах

Макро-элементы	Контроль (n=5)		Глиомы, мкг $\times 10^{-3}$ / 1г белка		U-критерий Манна-Уитни	Критерий Колмогорова-Смирнова
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ		
Cu	0,0165; 0,0151- 0,0167	0,0151- 0,0167	0,0162; 0,0136- 0,0188	0,0136- 0,0188	$p=0,5910$	$p=0,3500$
Fe	0,0174; 0,0135- 0,0187	0,0135- 0,0187	0,0285*; 0,0189- 0,0405	0,0189- 0,0405	$p=0,0394$	$p=0,1513$
Zn	0,0081; 0,0066- 0,0090	0,0066- 0,0090	0,0160*; 0,0104- 0,0521	0,0104- 0,0521	$p=0,0072$	$p=0,0471$
Li	0,00004; 0,00003-0,00004	0,00003-0,00004	0,0002*; 0,0001- 0,0002	0,0001- 0,0002	$p=0,0023$	$p=0,0242$
Se	0,0101; 0,0098- 0,0105	0,0098- 0,0105	0,0011*; 0,0006- 0,0013	0,0006- 0,0013	$p=0,0023$	$p=0,0019$
Mo	0,0010; 0,0010- 0,0010	0,0010- 0,0010	0,0003*; 0,0003- 0,0004	0,0003- 0,0004	$p=0,0023$	$p=0,0019$
Al	0,0179; 0,0154- 0,0215	0,0154- 0,0215	0,0046*; 0,0035- 0,0087	0,0035- 0,0087	$p=0,0487$	$p=0,0401$
Ba	0,0001; 0,00006- 0,0002	0,00006- 0,0002	0,0003; 0,0002- 0,0006	0,0002- 0,0006	$p=0,1069$	$p=0,3887$
Co	0,0009; 0,0008- 0,0009	0,0008- 0,0009	0,0003*; 0,0003- 0,0004	0,0003- 0,0004	$p=0,0023$	$p=0,0019$
Cr	0,0006; 0,0006- 0,0006	0,0006- 0,0006	0,0002*; 0,0001- 0,0002	0,0001- 0,0002	$p=0,0487$	$p=0,0203$
Sr	0,0008; 0,0007- 0,0009	0,0007- 0,0009	0,0012; 0,0006- 0,0020	0,0006- 0,0020	$p=0,4202$	$p=0,7128$
V	0,0014; 0,0014- 0,0015	0,0014- 0,0015	0,0004*; 0,0003- 0,0007	0,0003- 0,0007	$p=0,0041$	$p=0,0044$
Ni	0,0014; 0,0014- 0,0015	0,0014- 0,0015	0,0005*; 0,0004- 0,0010	0,0004- 0,0010	$p=0,0488$	$p=0,0203$

Примечание. * – статистически значимые отличия с контрольной группой ($p \leq 0,05$).

Таблица 5

Корреляции (коэффициент Спирмена) между иммуногистохимическими маркерами глиом и параметрами элементного гомеостаза

	Элемент	Маркеры опухолевого роста			
		IDH1	Ki-67	MGMT	p53
Макроэлементы	Na	-0,5669* (0,0275)	0,4410* (0,0999)	-0,2048 (0,5231)	-0,3419 (0,3336)
	K	-0,4725* (0,0753)	-0,1260 (0,6546)	0,1024 (0,7514)	-0,0380 (0,9170)
	Ca	-0,0315 (0,9113)	-0,1575 (0,5751)	-0,1536 (0,6336)	-0,2659 (0,4577)
	Mg	0,2520 (0,3649)	-0,1575 (0,5751)	-0,1536 (0,6336)	0,0380 (0,9170)
	P	0,2835 (0,3059)	-0,0315 (0,9113)	-0,2560 (0,4218)	0,4938 (0,1469)
	S	-0,2364 (0,3962)	-0,1260 (0,6546)	-0,3585 (0,2525)	0,4179 (0,2295)
Микроэлементы	Cu	-0,5040* (0,0554)	0,2835 (0,3059)	0,1024 (0,7514)	-0,3419 (0,3336)
	Fe	-0,1260 (0,6546)	-0,1890 (0,5000)	0,1536 (0,6336)	0,2659 (0,4577)
	Zn	0,4410* (0,0999)	-0,4725* (0,0753)	-0,1024 (0,7514)	0,1899 (0,5992)
	Li	-0,1575 (0,5751)	0,1890 (0,5000)	-0,3073 (0,3313)	-0,1140 (0,7539)
	Se	-0,2835 (0,3059)	-0,0630 (0,8235)	-0,1536 (0,6336)	-0,0380 (0,9170)
	Mo	-0,0630 (0,8235)	-0,0630 (0,8235)	-0,1024 (0,7514)	-0,1140 (0,7539)

Примечание. * – статистически значимые корреляционные взаимосвязи ($p \leq 0,05$).

Содержание микроэлементов в крови, мкг*10⁻³/1г белка

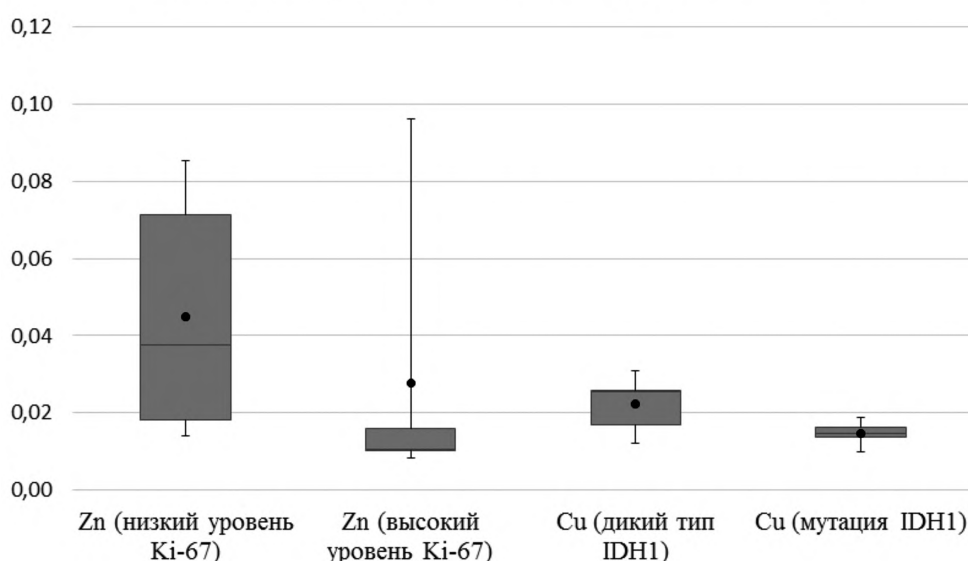


Рис. 3. Медиана и межквартильные диапазоны содержания микроэлементов в плазме крови в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1.

геназа IDH1 – лимитирующий фермент цикла трикарбоновых кислот. Мутации IDH снижают уровень АТФ за счет ингибирующего фосфорилирования пируватдегидрогеназы [21], что также будет влиять на активность Na/K-АТФазы.

Концентрация цинка в плазме крови значимо выше в группе с низким митотическим индексом Ki-67 (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,07$) (рис.3).

Содержание меди в плазме крови значимо выше в группе с диким типом IDH1 (U-критерий Манна-Уитни, $p=0,07$).

Роль меди и цинка в глиомогенезе может определяться участием вышеуказанных микроэлементов в структуре такого фермента антиоксидантной защиты как супероксиддисмутаза [22].

Клетки глиальных опухолей, обладая повышенным уровнем базальной метаболической активности и дисфункцией митохондрий и, как следствие, высокими показателями свободнорадикальных процессов, сохраняют высокие темпы пролиферации за счет редокс-опосредованного усиления сигнализации по MAP-киназному каскаду через активацию ERK1/2 и Ras. Вместе с тем, компенсаторно увеличивается экспрессия ферментов антиоксидантных систем (в том числе, супероксиддисмутаза), обеспечивающих защиту опухолевых клеток от окислительного стресса и индукции апоптоза [23].

Кроме участия в антиоксидантной системе как кофактор супероксиддисмутаза, цинк может также служить лигандом белков сигнального пути Hedgehog, в

частности Hedgehog взаимодействующего белка HHIP [24], активно синтезируемого в клетках глиом.

Заключение. В представленном исследовании изучен уровень макро- и микроэлементов в плазме крови 20 пациентов с первичными опухолями головного мозга, в 5 образцах плазмы крови практически здоровых людей. Анализ взаимосвязи молекулярно-генетического профиля глиом с параметрами элементного гомеостаза плазмы крови продемонстрировал значимые отличия уровней натрия, калия, цинка и меди в зависимости от величины митотического индекса Ki-67 и мутации генов изофермента изоцитратдегидрогеназы IDH1. Впервые отмечена значимая корреляция, показывающая согласованность между уровнем онкомаркеров глиальных опухолей и минеральным обменом крови. Можно предположить, что полученные данные по содержанию натрия и калия обусловлены нарушением работы фермента Na/K-АТФазы. Роль цинка и меди в глиомогенезе, вероятно, не ограничивается участием этих микроэлементов в работе антиоксидантных систем, но и определяется их функционированием в качестве лигандов сигнальных путей клеточной пролиферации. Полученные нами результаты углубляют понимание механизмов глиомогенеза и могут быть использованы в качестве предиктивной дооперационной оценки молекулярно-генетических маркеров глиом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Global battle against cancer won't be won with treatment alone Effective prevention measures urgently needed to prevent cancer crisis. The International Agency for Research on Cancer Organization, World Health, Press release N 224. Lyon/London; 2014.
- Louis D.N. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours [Internet]; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 5th ed. 2021; Vol. 6. URL: https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/45.
- Dimitrov L., Hong C.S., Yang C., Zhuang Z., Heiss J.D. New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma. *Int. J. Med. Sci.* 2015; 12: 201–13. DOI: 10.7150/ijms.11047.
- Tateish K., Wakimoto H., Iafrate A.J., Tanaka S., Loebel F., Lelic N., Wiederschain D., Bedel O., Deng G., Zhang B. et al. Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD⁺ Depletion. *Cancer cell.* 2015; 28: 773–84. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.11.006.
- Tamura R.E., Vasconcellos J.F., Sarkar D., Libermann T.A., Fisher P.B., Zerbini L.F. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.* 2012; 12: 634–51. DOI: 10.2174/156652412800619978.
- Aubrey B.J., Strasser A., Kelly G.L. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 2016; 6: a026062. DOI: 10.1101/cshperspect.a026062.
- Bullwinkel J., Baron-Luehr B., Ludemann A., Wohlenberg C., Gerdes J., Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell Physiol.* 2006; 206: 624–35. DOI: 10.1002/jcp.20494.
- Theresia E., Malueka R.G., Pranacipta S., Kameswari B., Dananjoyo K., Asmedi A. et al. Association between Ki-67 Labeling index and Histopathological Grading of Glioma in Indonesian Population. *Asian Pac. J. Cancer prev.* 2020; 21: 1063–8. DOI: 10.31557/APJCP.2020.21.4.1063.
- Yoda R.A., Marxen T., Longo L., Ene C., Wirsching H.G., Keene C.D., Holland E.C., Cimino P.J. Mitotic Index Thresholds Do Not Predict Clinical Outcome for IDH-Mutant Astrocytoma. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* 2019; 78: 1002–10. DOI: 10.1093/jnen/nlz082.
- Tano K., Shiota S., Collier J., Foote R.S., Mitra S. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 1990; 87: 686–90. DOI: 10.1073/pnas.87.2.686.
- Chen X., Zhang M., Gan H., Wang H., Lee J.H., Fang D., Kitange G.J., He L., Hu Z., Parney I.F. et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Nat. Commun.* 2018; 9: 2949. DOI: 10.1038/s41467-018-05373-4.
- Hegi M.E., Diserens A.C., Gorlia T., Hamou M.F., Tribolet N., Weller M., Kros J.M., Hainfellner J.A., Mason W., Mariani L. et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352: 997–1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331.
- Khuri F.R. Lung cancer chemoprevention. *Semin Surg. Oncol.* 2000; 18(2):100–5.
- Gresner P., Gromadzinska J., Jablonska E., Kaczmarek J., Wasowicz W. Expression of selenoprotein-coding genes SEPP1, SEP15 and hGPX1 in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009; 65(1):34–40.
- Cai J., Zhu P., Zhang C., Li Q., Wang Z., Li G., Wang G., Yang P., Li J., Han B. et al. Detection of ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry in the progression of 211 paired gliomas. *Oncotarget.* 2016; 7: 16384–95. DOI: 10.18632/oncotarget.7650.
- Chaurasia A., Park S.H., Seo J.W., Park C.K. Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival. *J. Korean Med. Sci.* 2016; 31:1208–14. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.8.1208.
- Leung S.C.Y., Nielsen T.O., Zabaglo L., Arun I., Badve S.S., Bane A.L., Bartlett J.M.S., Borgquist S., Chang M.C., Dodson A. et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. *NPJ Breast Cancer.* 2016; 2:16014. DOI: 10.1038/npjbcancer.
- Nielsen L.A.G., Bangso J.A., Lindahl K.H., Dahlrot R.H., Hjelmberg J.B., Hansen S., Kristensen B.W. Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in gliomas: Interobserver variability and digital quantification. *Diagnostic pathology.* 2018; 3: 8. DOI: 10.1186/s13000-018-0711-2.
- Younis S.G., Khedr R.A.G., El-Shorbagy S.H. Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression as prognostic marker in glioblastoma patients treated with radiation therapy with concomitant and adjuvant Temozolomide. *J. Egypt Natl. Canc. Inst.* 2016; 28: 23–30. DOI: 10.1016/j.jnci.2015.11.003.
- Xia L., Wu B., Fu Z., Feng F., Qiao E., Li Q. et al. Prognostic role of IDH mutations in gliomas: a meta-analysis of 55 observational studies. *Oncotarget.* 2015; 6 (19): 17354–65. DOI: 10.18632/oncotarget.4008.
- Izquierdo-Garcia J.L., Viswanath P., Eriksson P., Cai L., Radoul M., Chaumeil M.M., Blough M., Luchman H.A., Weiss S., Cairncross J.G. et al. IDH1 mutation induces reprogramming of pyruvate metabolism. *Cancer Res.* 2015; 75: 2999–3009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0840.
- Roberts B.R., Tainer J.A., Getzoff E.D., Malencik D.A., Anderson S.R., Bomben V.C., Meyers K.R., Karplus P.A., Beckman J.S. Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. *J. Mol. Biol.* 2007; 373(4):877–90.
- Salazar-Ramiro A., Perez V. de la Cruz, Hernandez-Pedro N.Y., Gonzalez-Esquivel D.F., Sotelo J., Pineda B. Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Front Immunol.* 2016; 7: 156.
- Bosanac I., Maun H.R., Scales S.J., Wen X., Lingel A., Bazan J.F., de Sauvage F.J., Hymowitz S.G., Lazarus R.A. The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16(7):691–7.

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Бутина Е.В., Йовдий А.В., Попонина Е.А., Смольникова М.В., Шерстнев Ф.С., Парамонов И.В.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ СИСТЕМ KELL, DUFFY, KIDD, MNS, LEWIS, LUTHERAN У ДОНОРОВ КРОВИ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

ФГБУН Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА, 610027, Киров, Россия

Частота встречаемости антигенов систем Kell (Kp^a , Kp^b), Kidd, Duffy, MNS и Lutheran у доноров крови Кировской области соответствует распределению антигенов, характерному для белых европейцев. Антигены K (система Kell) и Le^a (система Lewis) определяются у населения области существенно реже, антиген Le^b (система Lewis) – чаще, чем у населения Европы. Наличие регистра доноров эритроцитов, типированных по широкому спектру антигенов, является обязательным условием обеспечения иммунологической безопасности гемотранфузионной терапии.

Ключевые слова: эритроциты; доноры; антигены; Kell; MNS; Duffy; Kidd; Lewis; Lutheran.

Для цитирования: Бутина Е.В., Йовдий А.В., Попонина Е.А., Смольникова М.В., Шерстнев Ф.С., Парамонов И.В. Особенности распределения антигенов эритроцитов систем Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lewis, Lutheran у доноров крови Кировской области. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 504-506. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-504-506>

Для корреспонденции: Бутина Елена Владимировна, д-р мед. наук, зав. лаб. иммуногематологии; e-mail: butinalena@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила 24.06.2022

Принята к печати 28.07.2022

Опубликовано 12.09.2022

Butina E.V., Yovdiy A.V., Poponina E.A., Smolnikova M.V., Sherstnev F.S., Paramonov I.V.

FEATURES OF THE DISTRIBUTION OF THE ANTIGENS OF KELL, DUFFY, KIDD, MNS, LEWIS, LUTHERAN BLOOD GROUP SYSTEMS IN BLOOD DONORS IN THE KIROV REGION

Federal State Budget Institution of Science "Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical-Biological Agency", 610027 Kirov, Russian Federation

The frequency of occurrence of antigens of the Kell (Kp^a , Kp^b), Kidd, Duffy, MNS and Lutheran systems in donors of the Kirov region corresponds to the distribution of antigens characteristic of white Europeans. Antigens K (Kell system) and Le^a (Lewis system) are detected in the population of the region much less frequently, antigen Le^b (Lewis system) – more often than in the population of Europe. The presence of a registry of donors typed according to a wide range of red blood antigens is a prerequisite for the immunohematological safety of blood transfusions.

Key words: red blood cell; donors; antigens; Kell; Kidd; Duffy; MNS; Lewis; Lutheran.

For citation: Butina E.V., Yovdiy A.V., Poponina E.A., Smolnikova M.V., Sherstnev F.S., Paramonov I.V. Features of the distribution of the antigens of Kell, Duffy, Kidd, MNS, Lewis, Lutheran blood group systems in blood donors in the Kirov region. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 504-506 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-504-506>

For correspondence: Butina E.V., Dr. Sci. Med., head of the Laboratory of Immunohematology; e-mail: butinalena@yandex.ru

Information about authors:

Butina E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7474-7559>;

Yovdiy A.V., <https://orcid.org/0000-0003-2496-0308>;

Poponina E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4941-1735>;

Smolnikova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3423-5700>;

Sherstnev F.S., <https://orcid.org/0000-0002-1751-8522>;

Paramonov I.V., <https://orcid.org/0000-0002-7205-912X>.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 24.06.2022

Accepted 28.07.2022

Published 12.09.2022

Введение. Наиболее эффективным методом профилактики аллоиммунизации и посттрансфузионных осложнений (ПТО) является подбор иммунологически совместимых доноров [1, 2, 3]. Необходимость индивидуального подбора возникает у реципиентов, имеющих как специфические аллоантитела, являющиеся следствием несовместимых трансфузий или беременностей, так и панагглютинирующие антитела, возникающие в результате аутосенсibilизации, или назначение лекарственных препаратов, неспецифически реагирующих с эритроцитами пациентов [4-7]. Фенотипический подбор доноров возможен только при наличии в учреждении службы крови регистров доноров, типированных по широкому спектру антигенов. Сведения о распределении антигенов эритроцитов в популяциях людей, проживающих на определенных территориях, необходимы для организации целенаправленной заготовки и хранения донорской крови [8-12]. Соответственно, анализ частоты встречаемости антигенов эритроцитов систем Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis, Lutheran у доноров компонентов крови представляется актуальным и клинически значимым.

Цель исследования – определить особенности распределения антигенов эритроцитов систем Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis, Lutheran у доноров Кировской области.

Материал и методы. Изучена частота встречаемости фенотипов эритроцитов систем Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis и Lutheran у 375 доноров компонентов крови ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России, проживающих в г. Киров и Кировской области. Исследование проводилось для создания регистра доноров, типированных по широкому спектру антигенов, для иммуногематологического обеспечения трансфузий эритроцитов пациентам гематологической клиники института. Кировская область географически относится к центрально-восточной части Европейской территории России.

Информированное согласие пациентов на обследование и лечение получено. Материалы исследования одобрены локальным этическим комитетом при ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

Типирование антигенов выполняли с использованием оборудования и реактивов фирм BioRad (США), DiaMed GmbH (Switzerland), Ortho-Clinical Diagnostics (UK), Antitoxin GmbH (Germany). Статистический анализ осуществляли с помощью критерия хи-квадрат. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Частота встречаемости фенотипов эритроцитов систем Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis и Lutheran у доноров компонентов крови представлена в таблице. Фенотипы, состоящие из антигенов Jk^a и Jk^b (система Kidd), Fy^a и Fy^b (система Duffy), M и N (система MNS), в гомозиготном и гетерозиготном состоянии соотносятся между собой как 1:1:2, при котором около 25% обследованных лиц имеют только один из парных антигенов, 25% – другой и 50% – оба антигена. Подбор доноров для реципиента, иммунизированного к какому-либо из этих антигенов, не сложен, так как совместимым является каждый четвертый донор. В фенотипах, состоящих из антигенов K и k, Kp^a и Kp^b (система Kell), Le^a и Le^b (система Lewis), Lu^a и Lu^b (система Lutheran), наблюдается существенное преобладание одного из «гомозиготных» фенотипов. При наличии у реципиента антител к часто встречающемуся в популяции антигену подбор по фенотипу возможен только в учреждениях

службы крови, располагающих обширными регистрами типированных доноров.

Сопоставив результаты типирования доноров Кировской области и Европы [2], мы установили различия в распределении фенотипов систем Kell и Lewis. Антигены эритроцитов K и Le^a определялись у населения области существенно реже (4,9% и 7,7%), чем у белых европейцев (9,0% и 22,0% соответственно), антиген Le^b – чаще (97,9% vs 72,0%) ($p < 0,01$).

Обсуждение. Несомненное клиническое значение антигена K системы Kell, иммунизация к которому приводит к тяжелым гемолитическим ПТО и гемолитической болезни плода и новорожденного, явилось основанием для запрета выдачи K-положительных эритроцитов в лечебную сеть Российской Федерации в 1998 г. Современные нормативные документы отменили этот запрет, однако в таких в регионах России, как Кировская область, в которых частота встречаемости K-положительных лиц не превышает 5%, отстранение K-положительных доноров от сдачи эритроцитсодержащих компонентов более эффективно, чем подбор доноров и реципиентов по антигену K, и полностью исключает возможность K-иммунизации больных в результате гемотрансфузий.

Антитела к антигенам Kidd могут быть пропущены в непрямом антиглобулиновом тесте, проводимом перед трансфузией, если эритроциты доноров, экспрессируют антиген в «одинарной» дозе («гетерозиготный» фенотип). Для предотвращения ПТО подбирают доноров с известным фенотипом системы Kidd. Частота встречаемости фенотипа $Jk(a+b-)$ у доноров Кировской области составляет 21,6%, фенотипа $Jk(a-b+)$ – 24,4%.

Антиген Fy^a значительно более иммуногенен, чем антиген Fy^b . Анти- Fy^a антитела чаще становятся причиной тяжелых ПТО. Фенотип $Fy(a-b+)$, необходимый для пациентов с анти- Fy^a антителами, встречается у доноров регистра с частотой 28,0%.

В системе MNS клинически значимыми являются анти-M, -S, -s антитела. Анти-M и анти-N антитела могут иметь естественное происхождение и возникать без предшествующей иммунной стимуляции антигенами эритроцитов. При необходимости трансфузий эритроцитов пациентам, иммунизированным к антигену M, вероятность подбора доноров составляет 1:5. Фенотип M-N+ встречается у 19,7% доноров Кировской области.

Антигены системы Lewis (Le^a и Le^b) синтезируются интерстициальными эпителиальными клетками и пассивно адсорбируются на мембране эритроцитов. ПТО, вызванные Lewis антителами, встречаются крайне редко, но наличие антител, осложняет подбор совместимого донора, так как одним из руководящих правил иммуногематологии является противопоказание к переливанию донорских эритроцитов пациенту, имеющему антитела к антигенам, присутствующим в крови потенциального донора. У доноров регистра достоверно реже, чем у белых европейцев, выявляется антиген Le^a , чаще – Le^b .

Антитела системы Lutheran (анти- Lu^a , - Lu^b) редко вызывают ПТО, но могут осложнять подбор эритроцитов. Частота встречаемости фенотипов системы Lutheran у кировчан сопоставима с европейской.

Таким образом, высокое разнообразие, иммуногенность и клиническое значение антигенов эритроцитов делают необходимым создание в учреждениях службы крови регистров доноров, типированных по антигенам систем MNS, Duffy, Kidd, PIPK, Lewis, Lutheran, что яв-

Частота встречаемости фенотипов эритроцитов систем Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis, Lutheran у доноров крови Кировской области и европейцев

Антигенная система эритроцитов	Фенотип	Частота встречаемости фенотипов, %	
		Доноры Кировской области (n=375)	Белые европейцы [2]
Kell	K-k+	95,2	91,0
	K+k+	4,80	8,8
	K+k-	0,1	0,2
	Kp (a+b-)	0	<0,1
	Kp (a-b+)	98,9	97,7
	Kp (a+b+)	1,1	2,3
Kidd	Jk (a+b-)	21,6	26
	Jk (a-b+)	24,4	24
	Jk (a+b+)	54,0	50
	Jk (a-b-)	0	<1
Duffy	Fy (a+b-)	21,3	17
	Fy (a-b+)	28,0	34
	Fy (a+b+)	50,7	49
	Fy (a-b-)	0	0
MNS	M+N-	32,0	30
	M-N+	19,7	21
	M+N+	48,3	49
	S+s-	12,8	17
	S-s+	50,1	47
Lewis	S+s+	37,1	36
	Le (a+b-)	7,7	22
	Le (a-b+)	87,9	72
	Le (a-b-)	4,4	6
Lutheran	Le (a+b+)	0	редко
	Lu (a+b-)	1,0	0,1
	Lu (a-b+)	88,9	92,4
	Lu (a+b+)	10,1	7,5
	Lu (a-b-)	0	редко

ляется обязательным условием иммуногематологического обеспечения безопасности гемокомпонентной терапии.

Выводы:

1. Частота встречаемости антигенов систем Kell (Kp^a, Kp^b), Kidd, Duffy, MNS и Lutheran у доноров крови Кировской области соответствует распределению антигенов, характерному для белых европейцев.

2. Эритроцитарные антигены K (система Kell) и Le^a (система Lewis) определяются у населения области достоверно реже, антиген Le^b (система Lewis) – чаще, чем у населения Европы.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-3, 7-10 см. REFERENCES)

- Минеева Н.В. Группы крови человека. Основы иммуногематологии. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. СПб: Гангут; 2020. ISBN 978-5-85875-600-2.
- Бутина Е.В., Зайцева Г.А., Шерстнев Ф.С., Коряковцева Т.А., Матрохина О.И., Князев М.Г. Иммуногематологический мо-

нитинг доноров и реципиентов компонентов крови. *Вестник службы крови России*. 2014; 4: 19-23.

- Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А., Зайцева Г.А., Минаева Н.В. Интерпретация результатов иммуногематологических исследований у пациентов гематологической клиники. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(4): 221-5.
- Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А. Иммуногематологическое обеспечение трансфузий эритроцитов аллоиммунизированным реципиентам (клинический случай). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(4): 234-6.
- Минеева Н.В., Пашкова И.А., Кробинцев И.И., Гавровская С.В., Сысоева Е.А., Бодрова Н.Н. Оптимизация подбора совместимых пар «донор – реципиент»: роль скрининга антител и фенотипирования антигенов эритроцитов при гемотрансфузиях. *Трансфузиология*. 2015; 2: 52-9.

REFERENCES

- Tormey C.A., Hendrickson E.J. Transfusion-Related Red Blood Cell Alloantibodies: Induction and Consequences. *Blood*. 2019; 133(17): 1821-30.
- Shaz B. H., Hillyer C.D., Reyes G.M. Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects. 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018.
- Evers D., Middelburg R.A., de Haas M., Zalpur S., de Vooght K. et al. Red-blood-cell alloimmunization in relation to antigens' exposure and their immunogenicity: a cohort study. *Lancet Haematol*. 2016; 3(6): e284-92.
- Mineeva N.V. Human blood groups. Fundamentals of immunohematology. 2nd ed., revised and expanded. St.Peterburg: Gangut; 2020. ISBN 978-5-85875-600-2. (in Russian)
- Butina E. V., Zaytseva G. A., Sherstnev F. S., Koryakovtseva T.A., Matrokhina O.I., Knyazev M.G. Immunohematological monitoring of donors and recipients of blood components. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2014; 4: 19-23. (in Russian)
- Yovdiy A.V., Butina E. V., Poponina E. A., Zaytseva G. A., Minaeva N.V. Interpretation of the results of immunohematological test in hematological patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(4): 221-5. (in Russian)
- Food and Drug Administration. (2019). Fatalities Reported to FDA Following Blood Collection and transfusion Annual Summary for Fiscal Year 2019. Available online at: <https://www.fda.gov/media/147628/download>.
- Fasano R.M., Meyer E.K., Branscomb J., White M.S., Gibson R.W., Eckman J.R. Impact of Red Blood Cell Antigen Matching on Alloimmunization and Transfusion Complications in Patients with Sickle Cell Disease: A Systematic Review. *Transfus. Med. Rev.* 2019; 33(1): 12-23.
- Gehrie E.A., Tormey C.A. The Influence of Clinical and Biological Factors on Transfusion-Associated Non-ABO Antigen Alloimmunization: Responders, Hyper-Responders, and Non-Responders. *Transfus. Med. Hemother.* 2014; 41(6): 420-9.
- Van Sambeek J.H.J., de Wit P.D., Luken J., Veldhuisen B., van den Hurk K., van Dongen A. et al. A Conceptual Framework for Optimizing Blood Matching Strategies: Balancing Patient Complications Against Total Costs Incurred. *Front. Med. (Lausanne)*. 2018; 5: 199.
- Yovdiy A.V., Butina E. V., Poponina E. A. Immunohematological provision of red blood cells transfusions to alloimmunized recipients (clinical case). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(4): 234-6. (in Russian)
- Mineeva N.V., Pashkova I.A., Krobinets I.I., Gavrovskaya S.V., Sysoeva E.A., Bodrova N.N. Optimizing selection of compatible «donor-recipient» pairs: the role of antibody screening and erythrocyte antigens phenotyping in the blood transfusion recipients. *Transfuziologiya*. 2015; 2: 52-9. (in Russian)

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сметанина С.В.¹, Славнова Е.Н.², Ускова Е.Ю.¹, Хусиянова А.А.¹, Державин В.А.²

ХОНДРОСАРКОМА ГРУДНОЙ КЛЕТКИ С ВНУТРИБРЮШНЫМ РАСПРОСТРАНЕНИЕМ (СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ)

¹ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» 603163, Нижний Новгород, Россия;

²Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия

Представлено редкое клиническое наблюдение метастаза хондросаркомы в брюшную полость с наличием специфической метастатической асцитической жидкости. Хондросаркомы, возникающие в результате злокачественного перерождения доброкачественной хондромы, встречаются довольно редко. Еще реже в литературе описаны случаи метастазов хондросаркомы, особенно в брюшину с наличием метастатического асцита. В статье представлено клиническое наблюдение метастатического асцита у больного 38 лет с хондросаркомой, развившейся на фоне резецированной ранее хондромы ребра. В статье описаны цитологические признаки хондросаркомы в асцитической жидкости.

Ключевые слова: цитологическая диагностика; асцит; хондросаркома.

Для цитирования: Сметанина С.В., Славнова Е.Н., Ускова Е.Ю., Хусиянова А.А., Державин В.А. Хондросаркома грудной клетки с внутрибрюшным распространением (случай из практики). Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (9): 507-510. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-507-510>

Для корреспонденции: Сметанина Светлана Валерьевна, канд. мед. наук, зав. цитологической лабораторией; e-mail: smetanina-svetlana@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.05.2022

Принята к печати 20.05.2022

Опубликовано 12.09.2022

Smetanina S.V.¹, Slavnova E.N.², Uskova E.Yu.¹, Khusiyanova A.A.¹, Derzhavin V.A.²

HONDROSARCOMA OF THE CHEST WITH INTRAABDOMINAL DISSEMINATION (CASE REPORT)

¹Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center, 603163, Nizhny Novgorod, Russia;

²Moscow Research Oncological Institute named by P.A. Herzen – branch of the Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center of Radiology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 125284, Moscow, Russia

A rare clinical observation of chondrosarcoma metastasis into the abdominal cavity with a specific metastatic ascitic fluid is presented. Chondrosarcomas that occur as a result of malignant transformation of benign chondroma are quite rare. Even less often in the literature, cases of chondrosarcoma metastases are described, especially in a peritoneum with the presence of metastatic ascites. The article describes a case of metastatic ascites in a 38-year-old patient with chondrosarcoma, which developed against the background of previously resected rib chords. The article describes the cytological signs of chondrosarcoma in ascitic fluid.

Key words: cytological diagnostics; ascites; chondrosarcoma.

For citation: Smetanina S.V., Slavnova E.N., Uskova E.Yu., Khusiyanova A.A., Derzhavin V.A. Hondrosarcoma of the chest with intraabdominal distribution (case report). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 507-510 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-507-510>

For correspondence: Smetanina Svetlana Valerievna, Candidate of Medical Sciences, head of the cytological laboratory; e-mail: smetanina-svetlana@rambler.ru

Information about authors:

Smetanina S.V., <https://orcid.org/0000-0002-7000-5910>;

Slavnova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-2307-4355>;

Uskova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1694-2321>;

Khusiyanova A.A., <https://orcid.org/0000-0001-5212-9568>;

Derzhavin V.A., <http://orcid.org/0000-0002-4385-9048>.

Conflict of interests. The authors declare absence of a conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.05.2022

Accepted 20.05.2022

Published 12.09.2022

Введение. Хондросаркома – это вторая по распространенности опухоль костной ткани с частотой менее одного случая на 100 000 взрослого населения в год. Биологическое поведение хондросаркомы зависит от степени ее дифференцировки и анатомического расположения [1, 2]. К наиболее распространенным локализациям хондросаркомы относятся плечевая, тазовая, бедренная кости. 15% хондросарком локализируются в грудной клетке, поражая, как правило, реберно-хрящевое соединение и проявляя более агрессивное биологическое поведение по сравнению с хондросаркомой конечностей [2-4]. Поражение основания черепа встречается крайне редко [5]. Хондросаркома может возникнуть *de novo* и значительно реже (12% наблюдений) на фоне таких предсуществующих состояний, как хондрома, остеохондрома, хондроматоз, болезнь Олье, фиброзно-хрящевая дисплазия и как результат воздействия лучевой терапии [4,6].

Хондросаркомы и доброкачественные хондромы клинически представляют собой медленно растущие, плотные и безболезненные образования грудной клетки. Микроскопическая дифференциальная диагностика между этими опухолями затруднена, особенно при высокой дифференцировке хондросаркомы. Лечение обеих опухолей заключается в широком иссечении с границей не менее 4 см. Химиотерапия при хондросаркомах неэффективна, лучевая терапия применяется для пациентов с опухолями, которые либо не поддаются хирургическому лечению, либо имеют положительные границы резекции [7]. Частота метастазирования хондросарком колеблется от 12% до 27% в зависимости от размеров первичного очага, степени дифференцировки [8]. Для хондросаркомы, как и для большинства сарком, свойственен гематогенный путь метастазирования с поражением в первую очередь легких, несколько реже печени, костей [9,10]. Лимфогенное метастазирование хондросаркомы явление редкое, частота его варьирует в диапазоне 1,4 - 5,6% [11]. В зарубежной литературе сообщается о единичных случаях метастазирования в яичник [12], гортань [13], головной мозг [14], перикард [15], и о 5 случаях метастазов в щитовидной железе [16].



Рис. 1. Данные КТ органов грудной клетки. Обнаружено наличие образования в проекции резецированного 10 ребра слева.

Саркоматоз брюшины, развивающийся вследствие поражения хондросаркомой, встречается редко. Наиболее частыми типами сарком, вызывающими поражение брюшины, являются гастроинтестинальные опухоли, липосаркомы и лейомиосаркомы [17]. Обнаружение клеток хондросаркомы в асците расценивается как неспецифическая находка. Морфология клеток при метастатическом поражении имеет характерные черты первичной саркомы. Эти особенности дают возможность цитологической диагностики хондросаркомы в случаях ее метастазирования.

Клиническое наблюдение. Больной, 38 лет, с остеохондромой ребра в анамнезе, в январе 2021 г. обратился в поликлинику ГБУЗ НО «НОКОД» с жалобами на слабость, одышку в покое и при минимальной ходьбе, чувство «нехватки» воздуха, увеличение живота в размерах с декабря 2020 г., боли в животе, уплотнение в области грудной клетки слева. При осмотре больного в области послеоперационного рубца обнаружено объемное образование до 8,0 см, плотное, не смещаемое, с неизменной кожей над ним. Из анамнеза: у больного в 2017 г. по поводу остеохондромы проведена резекция 10-го ребра слева.

При обследовании по результатам компьютерной томографии (КТ) органов грудной клетки обнаружено наличие образования в проекции резецированного 10 ребра слева; легкие без очаговой патологии. КТ органов брюшной полости, забрюшинного пространства, органов малого таза: показала картину множественных образований в печени, крупного образования левой половины брюшной полости с четкими бугристыми контурами размером 118х167 мм, располагающееся от нижнего края селезенки до подвздошной области, саркоматоза брюшины, внутрибрюшной лимфаденопатии, асцита, очага уплотнения крыла левой подвздошной кости (рис. 1, 2).

Эвакуировано 1900 мл жидкости. Проведена трепан-биопсия объемного образования послеоперационного рубца под контролем ультразвуковой диагностики иглой REF 16G.



Рис. 2. Данные КТ органов брюшной полости, забрюшинного пространства, органов малого таза. Показана картина множественных образований в печени, крупного образования левой половины брюшной полости с четкими бугристыми контурами, саркоматоз брюшины, внутрибрюшной лимфаденопатии, асцита, очага уплотнения крыла левой подвздошной кости

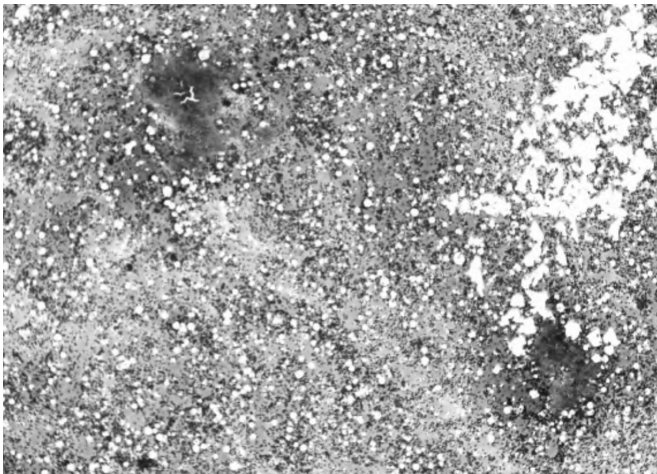


Рис. 3. Асцит. На фоне мезотелиальных клеток и элементов крови хрящевые клетки различной степени дифференцировки в обильном хондронидном матриксе, что соответствует метастазу хондросаркомы.

Ув. x10. Окраска экспресс красителем LEUKODIF 200.

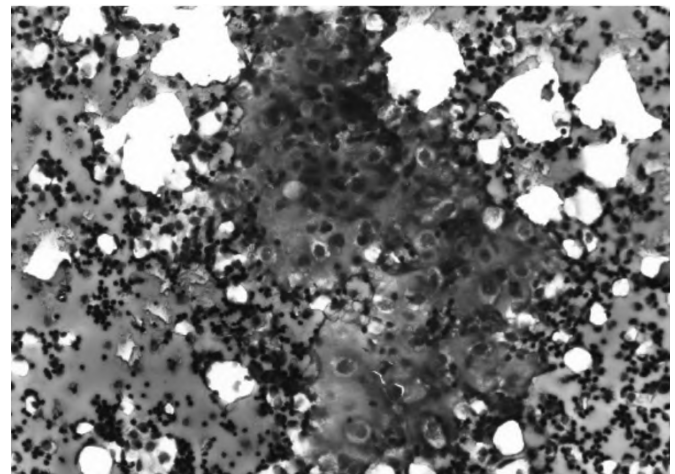


Рис. 4. Асцит. Скопления атипичных хондроцитов в хондронидном матриксе, что соответствует метастазу хондросаркомы. Ув. x20. Окраска экспресс красителем LEUKODIF 200.

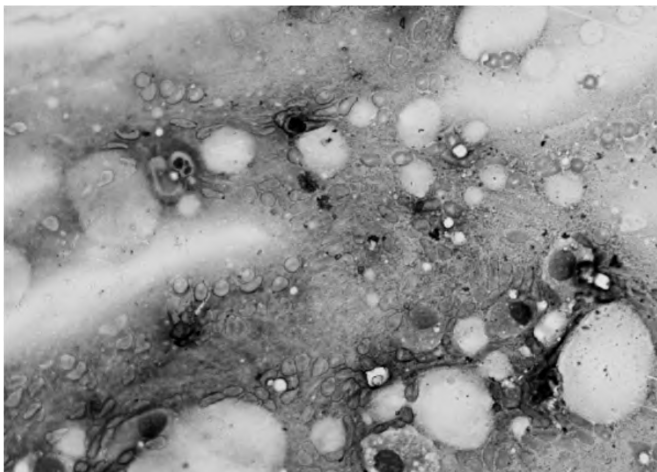


Рис. 5. Мазок отпечаток с материала, полученного при трепан-биопсии. В межтучном веществе хондронидного типа своеобразные «светлые» клетки крупных размеров с полиморфными ядрами, что соответствует метастазу хондросаркомы.

Ув. x40. Окраска экспресс красителем LEUKODIF 200.

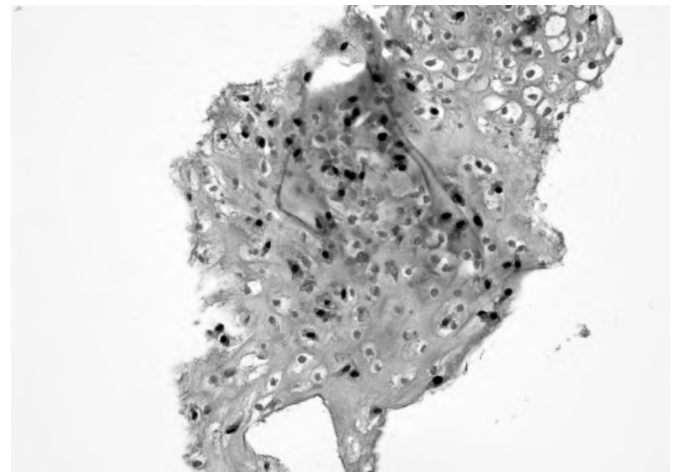


Рис. 6. Гистологическое исследование. Фрагменты опухоли, представленные полями хондронидного матрикса с неравномерными скоплениями полиморфных хондроцитов, что соответствует хондросаркоме G2. Ув. x20. Окраска гематоксилином и эозином.

Хондросаркома имеет специфические цитологические признаки. При исследовании асцитической жидкости на фоне мезотелиальных клеток и элементов крови в хондронидном матриксе обнаружены хрящевые клетки различной степени дифференцировки и атипии. Хондроциты выстраиваются группами, имеют несколько увеличенные ядра, иногда причудливой формы. В целом цитологическая картина представлена островками гиалинового хряща (рис. 3, 4). Таким образом, у больного обнаружены клетки хондросаркомы в асцитической жидкости.

При цитологическом исследовании мазка отпечатка с трепан-биоптата в межтучном веществе хондронидного типа с миксоидными полями определяется значительное количество своеобразных «светлых» клеток, содержащих включения гликогена крупных размеров с полиморфными ядрами, что свидетельствовало о наличии хондросаркомы (рис. 5).

В гистологических препаратах фрагменты опухоли представлены полями слабо-эозинофильного хондронидного матрикса с неравномерными скоплениями хондроцитов с полиморфными, гиперхромными, эксцентрически расположенными ядрами и ободком эозинофильной цитоплазмы (рис 6, 7). В части клеток отмечается вакуолизация цитоплазмы. В отдельных опухолевых клетках наблюдаются митозы. Гистологически установлена хондросаркома G2 (МКБ: С 41.3, ICD-O code:9220/3).

Заключение. Описанное в статье клиническое наблюдение представляет несомненный интерес для врачей различных специальностей. Клинически и цитологически хондросаркомы хорошо описаны. Точная частота возникновения хондросаркомы на фоне предшествующих доброкачественных состояний неизвестна из-за трудности в изучении бессимптомных, недиагностированных образований, интерпретации морфологической картины в оценке злокачественности процесса.

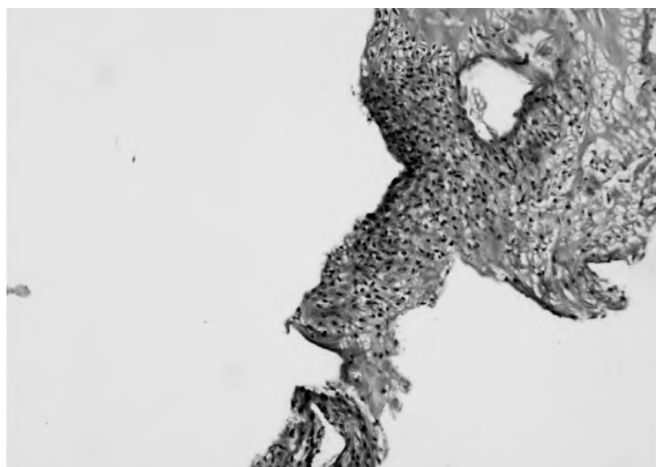


Рис. 7. Гистологическое исследование. Фрагменты опухоли, представленные полями хондроидного матрикса с неравномерными скоплениями полиморфных хондроцитов, что соответствует хондросаркоме G2. Ув. x10. Окраска гематоксилином и эозином.

Критерии злокачественности в хондросаркомах варьируют в зависимости от степени дифференцировки. В настоящий момент не существует иммуногистохимических маркеров, которые позволили бы точно провести дифференциальную диагностику хондромы и хондросаркомы. В описанном случае хондросаркома возникла на фоне остеохондромы ребра. Интересно наблюдение тем, что у больного наблюдался специфический метастатический асцит, в выпотной жидкости цитологически обнаружены элементы хондросаркомы, что встречается крайне редко.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-10, 12-17 см. REFERENCES)

11. Васильев Н.В., Перельмутер В.М., Чойнзонов Е.Л., Фролова И.Г. Табакаев С.А., Тюкалов Ю.И. и др. Анализ случаев лимфогенного метастазирования хондросаркомы за десятилетний период в клинике Томского НИИ онкологии (2008–2017 гг). *Вопросы онкологии*. 2019; 5(65):736–43.

REFERENCES

1. Fletcher C.D., Bridge J.A., Hogendoorn P.C. *World Health Organization Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon: IARC Press; 2013.

2. Marulli G., Duranti L., Cardillo G., Luzzi L., Carbone L., Gotti G. et al. Primary chest wall chondrosarcomas: results of surgical resection and analysis of prognostic factors. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2014; 6(45):194–201.
3. Tateishi U., Gladish G.W., Kusumoto M., Hasegawa T., Yokoyama R., Tsuchiya R., Moriyama N. Chest wall tumors: radiologic findings and pathologic correlation: part 2. Malignant tumors. *Radiographics*. 2003; 23:1491–1508.
4. Lenze U., Angelini A., Pohlig F., Knebel C., Trovarelli G., Berizzi A. et al. Chondrosarcoma of the Chest Wall: A Review of 53 Cases from Two Institutions. *Anticancer Res*. 2020; 40(3):1519–26.
5. Chondrosarcoma. Available at: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chondrosarcoma/symptoms-causes/syc-20354196> 20.02.2022/.
6. Patlas M., McCready D., Kulkarni S., Dill-Mackay M.J. Synchronous development of breast cancer and chest wall fibrosarcoma after previous mantle radiation for Hodgkin's disease. *Eur. Radiol*. 2005; 15:2018–20.
7. Somers J., Faber L.P. Chondroma and chondrosarcoma. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 1999; 11(3):270–7.
8. Roos E., van Coevorden F., Verhoef C., Wouters M. W., Kroon H. M., Hogendoorn P. C. W., van Houdt W. J. Prognosis of Primary and Recurrent Chondrosarcoma of the Rib. *Ann. Surg. Oncol*. 2016; 23(3):811–7.
9. Unni K.K., Inwards C.Y. Dahlin's bone tumors: General aspects and data on 10165 cases. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
10. Murphey M. D., Walker E. A., Wilson A. J., Kransdorf M. J., Temple H T., Gannon Francis H M. Imaging of Primary Chondrosarcoma: *Radiologic-Pathologic Correlation*. *RadioGraphics*. 2003; 23:245–1278.
11. Vasiliev N.V., Perelmutter V.M., Choinzonov E.L., Frolova I.G. Tabakaev S.A., Tyukalov Yu.I. et al. Analysis of cases of lymphogenous metastasis of chondrosarcoma over a ten-year period in the clinic of the Tomsk Research Institute of oncology (2008–2017). *Voprosy onkologii*. 2019; 5(65):736–43. (in Russian)
12. Robboy S.J. *Pathology of the Female Reproductive Tract*. Amsterdam: Elsevier Health Sciences; 2009.
13. Singhal A., Mahajan C., Hadi R., Awasthi N.P. Chondrosarcoma of chest wall metastasising to the larynx: Case report and review of literature. *J. Cancer Res. Ther*. 2015; 11(3):658.
14. Ghosh A., Barma R.D., Chakrabarty TN S., Chakrabarty TN M. A Rare Case of Brain Metastasis. *Journal of Neurology & Neurosurgery*. 2016; 2(1):43–45.
15. Maurea N., Ragone G., Coppola C., Caronna A., Tocchetti C.G., Agozzino L., Apice G., Iaffaioli R. V. Intracardiac metastasis originated from chondrosarcoma. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2017; 18(5):385–388.
16. Wu Z.H., Dai J.Y., Shi J.N., Fang M.Y., Cao J. Thyroid metastasis from chondrosarcoma. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(47):e18043.
17. Oei T.N., Jagannathan J.P., Ramaiya N., Ros PR. Peritoneal sarcomatosis versus peritoneal carcinomatosis: imaging findings at MDCT. *AJR Am. J. Roentgenol*. 2010; 195(3):W229–35.

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Лебедева С.С.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ ПРИ БАКТЕРИЕМИИ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Культуральный метод остаётся «золотым» стандартом микробиологической диагностики инфекций кровотока (ИК). Это связано с тем, что определение этиологии генерализованного инфекционного процесса, обуславливает этиотропную антибактериальную терапию. Для этого необходимо проводить микробиологический мониторинг преобладающей микрофлоры. Произведён ретроспективный анализ результатов микробиологического исследования крови на стерильность при подозрении на ИК в многопрофильном стационаре для оценки влияния факторов аналитического этапа на получаемые лабораторные данные. Использованы автоматические гематологические культиваторы, идентификация проводилась на основе биохимических характеристик микроорганизмов, и с использованием времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS). Проанализировано более чем 10 000 результатов исследований, средняя высеваемость микрофлоры составила 15,1%. Анализ выделяемой микрофлоры проводился в 2-х группах положительных результатов: в начале оценивались данные, полученные при наличии роста сразу в двух флаконах, далее изучались положительные результаты посева крови, полученные в каком-либо одном флаконе из пары. Выявлено преобладание грамположительной микрофлоры в спектре микроорганизмов, выделяемых из цельной крови, влияния условий культивирования и состава питательной среды на выделяемую микрофлору не обнаружено, однако ряд микроорганизмов, в силу видовых особенностей обмена веществ, характеризовался ростом в строго определённых условиях культивирования. Представленное исследование актуализирует необходимость микробиологического мониторинга с целью определения преобладающей госпитальной микрофлоры, что может способствовать своевременному реагированию с целью ограничения распространения высоковирулентных, агрессивных, резистентных штаммов микроорганизмов, приводящих к развитию генерализованных ИК.

Ключевые слова: бактериемия; инфекция кровотока; гемокультура; сепсис; посев крови; культуральный метод.

Для цитирования: Халиулин А.В., Лямин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Лебедева С.С. Оценка влияния аналитических характеристик микробиологического исследования крови при бактериемии в многопрофильном стационаре. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (9): 511-518. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-511-518>

Для корреспонденции: Халиулин Алмаз Вадимович, ст. преподаватель каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: a.v.haliulin@samsmu.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 05.07.2022

Принята к печати 28.07.2022

Опубликовано 12.09.2022

Haliulin A.V., Lyamin A.V., Gusyakova O.A., Kozlov A.V., Lebedeva S.S.

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF THE ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE MICROBIOLOGICAL BLOOD STUDY IN BACTEREMIA IN A MULTIDISCIPLINARY HOSPITAL

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

The culture method continues to be the “gold” standard for microbiological diagnosis of bloodstream infections. This is primarily due to the fact that the definition of the etiology of a generalized infectious process determines the etiotropic antibiotic therapy. To do this, it is necessary to conduct periodic microbiological monitoring of the prevailing microflora. To do this, in the present study, a retrospective analysis of the results of a microbiological blood test for sterility was performed in case of suspected bloodstream infections in a multidisciplinary hospital to assess the influence of analytical stage factors on the laboratory data obtained. Automatic hematological cultivators were used, identification was carried out based on the biochemical characteristics of microorganisms, as well as using time-of-flight mass spectrometry with matrix-activated laser desorption / ionization (MALDI-TOF MS). More than 10,000 research results were analyzed, the average microflora seeding rate was 15.1%. The analysis of the isolated microflora was carried out in 2 groups of positive results: at the beginning, the data obtained in the presence of growth in two vials at once were evaluated, then the positive results of blood cultures obtained in any one vial from a pair were studied. The predominance of gram-positive flora in the structure of microorganisms isolated from whole blood was revealed, the influence of cultivation conditions and the composition of the nutrient medium on the isolated flora was not found, however, a number of microorganisms, due to the specific characteristics of metabolism, were characterized by growth under strictly defined cultivation conditions. The presented study actualizes the need for constant microbiological monitoring in order to determine the prevailing hospital microflora, which can contribute to a timely response in order to limit the spread of highly virulent, aggressive, resistant strains of microorganisms leading to the development of generalized bloodstream infections.

Key words: bacteremia; bloodstream infection; blood culture; sepsis; blood culture; culture method.

For citation: Haliulin A.V., Lyamin A.V., Gusjakova O.A., Kozlov A.V., Lebedeva S.S. Evaluation of the influence of the analytical characteristics of the microbiological blood study in bacteremia in a multidisciplinary hospital. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 511-518 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-511-518>

For correspondence: *Khaliulin A.V.*, Senior lecturer of the department of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics; e-mail: a.v.haliulin@samsmu.ru

Information about authors:

Haliulin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4689-8904>;
Lyamin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>;
Gusjakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>;
Kozlov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-9384-6854>;
Lebedeva S.S., <https://orcid.org/0000-0001-8699-2562>.

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 05.07.2022

Accepted 28.07.2022

Published 12.09.2022

Введение. Сепсис, как осложнение ряда патологических состояний, представляет сложную проблему современной медицины, связанную с органной дисфункцией, которая вызвана дисрегулируемой реакцией организма хозяина на инфекцию [1, 2]. Отсутствие патогномичных признаков, высокая заболеваемость и летальность, высокие экономические затраты при лечении пациентов с сепсисом обуславливают актуальность данной проблемы [3]. Этиологическая характеристика инфекций кровотока (ИК) неоднозначна и зависит от первичной нозологии, сопутствующей патологии, преобладающей госпитальной микрофлоры в каждом отдельном лечебно-профилактическом учреждении (ЛПУ). Существует потребность в мониторинге спектра возбудителей инфекционной патологии в подразделениях многопрофильных ЛПУ. На современном этапе развития клинической микробиологии бактериологическое исследование крови проводится с использованием коммерческих флаконов с готовыми питательными средами и последующим мониторингом роста с помощью автоматических анализаторов гематологических культур. Их работа заключается в фотометрической регистрации смены цвета индикатора, которая происходит в ответ на увеличение содержания углекислого газа в питательной среде, что является косвенным признаком роста микрофлоры во флаконе. Динамическое изменение доминирующих групп микроорганизмов, выделяемых из крови при ИК, определяет векторы эмпирической антимикробной терапии, в связи с чем, оценка многолетней динамики проблемных патогенов остается актуальной задачей современной микробиологии.

Цель исследования – анализ видового спектра микроорганизмов при патологических состояниях, связанных с бактериемией с оценкой динамики смены приоритетных возбудителей ИК и определением закономерностей полученных результатов бактериологического исследования крови в зависимости от аналитического этапа исследования.

Материал и методы. Исследование ретроспективное, основанное на обработке результатов посевов крови в период с 2013 по 2020 г. в многопрофильном стационаре, включающем хирургические, терапевтические отделения, инфекционную клинику и отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). В исследование включены результаты первичного посева крови, в то время как результаты повторного посева крови на сте-

рильность от одних и тех же пациентов, исключены из работы.

Микробиологическое исследование крови проведено на автоматических анализаторах гематологических культур «Bact|ALERT 3D 60» (bioMérieux, Франция) и «Юнона LABSTAR 100» (SCENKER, Китай) с использованием коммерческих флаконов для культивирования аэробной и анаэробной микрофлоры. Посев крови из положительных флаконов проводили на плотные универсальные питательные среды. Идентификация патогенов с 2013 г. по первую половину 2015 г. проводилась по биохимическим тестам (API, bioMérieux, Франция), со второй половины 2015 г. – методом MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе MicroflexLT (Bruker, Германия).

В исследовании не оценивалось клиническое значение выделенной микрофлоры, как в случае выделения микроорганизмов в монокультуре, так в различных ассоциациях. Дизайн исследования представлен на рис. 1.

Группировку данных и вычисления проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel® 2013. Статистический анализ проводили с использованием программы StatTech v. 2.1.0 (ООО «Статтех», Россия). Для оценки различия частоты встречаемости признаков использован критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали результаты при уровне $p < 0,05$.

Результаты. В период с 2013 по 2020 г. проведено 10 618 посевов крови (ежегодно в среднем 1327,2 посева), среднее количество положительных результатов оказалось равным 200,6, высеваемость микрофлоры составила 15,1% (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют об увеличении частоты назначений микробиологического исследования крови, что косвенно может свидетельствовать об увеличении частоты развития подозрительных в отношении ИК клинических случаев, о возможной смене профилей обследуемых пациентов и нозологий, встречаемых в практике врачами-клиницистами в подразделениях ЛПУ.

При характеристике частоты выделения микрофлоры из обоих или одного флакона из пары выявлено, что рост микрофлоры выявлялся одинаково часто одновременно как в аэробных и анаэробных условиях, так и по отдельности (табл. 1).

Количество положительных высевов при исследовании крови не связано с условиями культивирования при



Рис. 1. Дизайн исследования.

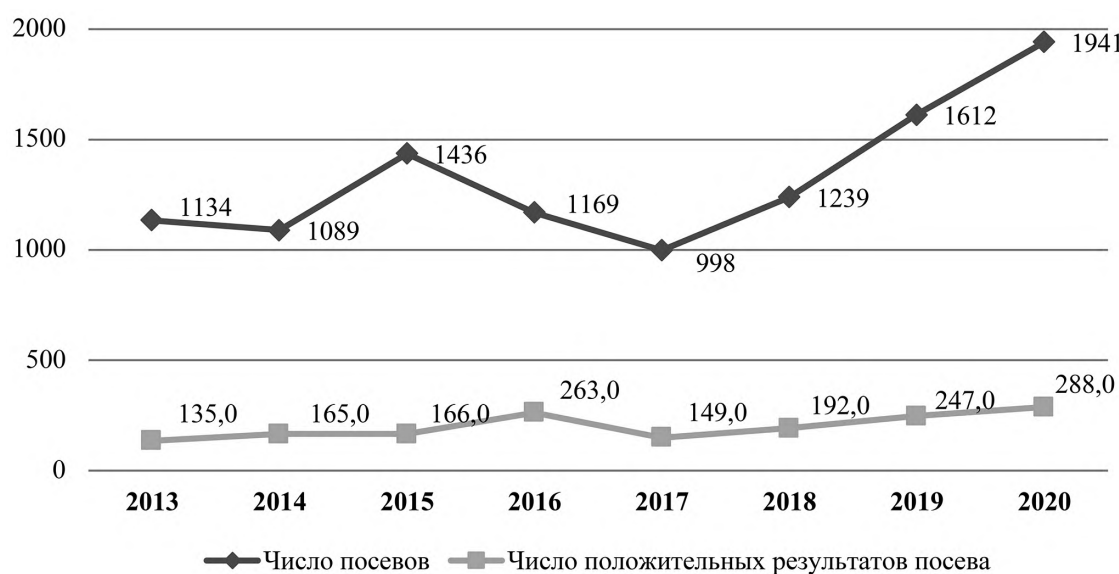


Рис. 2. Количество посевов крови и число положительных результатов за 2013-2020 гг.

Таблица 1

Частота выделения микрофлоры за 8-летний период в зависимости от условий культивирования

Годы	N, флаконов/ пациентов	Положительная гемокультура			
		В 2-х флаконах, пациенты	%	В 1-м флаконе, пациенты	%
2013	102/65	37	57	28	43
2014	165/112	53	47	59	53
2015	166/115	51	44	64	56
2016	263/165	98	60	67	40
2017	149/110	39	35	71	65
2018	192/125	67	54	58	46
2019	247/150	96	64	55	36
2020	288/190	98	52	92	48

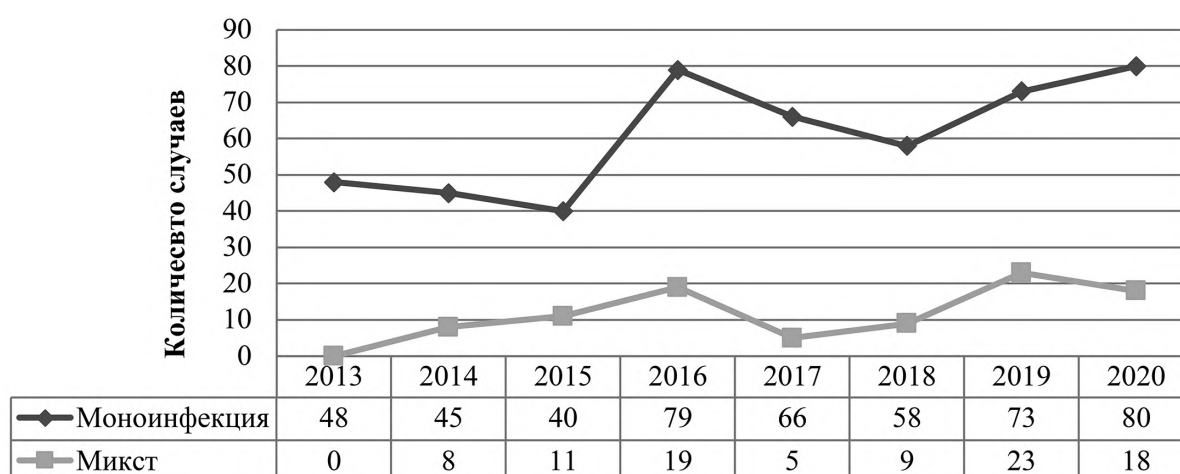


Рис. 3. Частота выделения одного и нескольких возбудителей одновременно из положительных гемокультур.

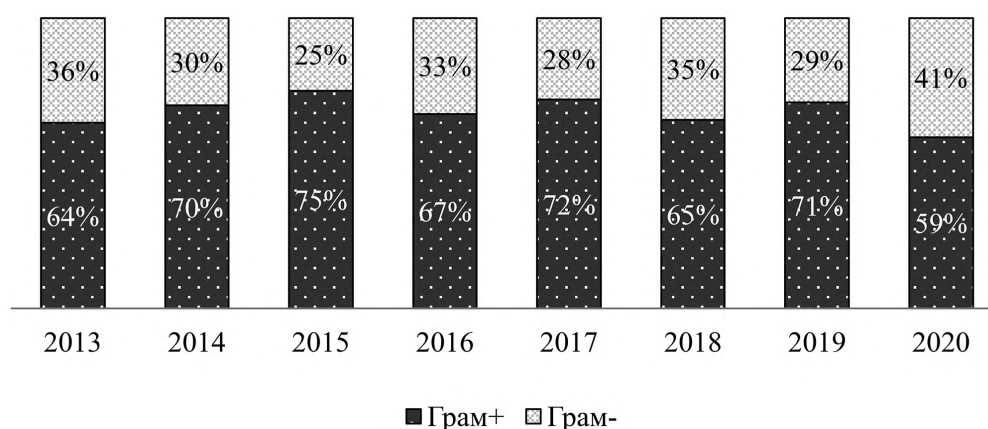


Рис. 4. Возбудители бактериемий в динамике по годам.

парном использовании аэробных и анаэробных флаконов. Этот факт не может служить аргументом для сокращения числа флаконов при исследовании крови до одного из пары, что подтверждается результатами, описанными далее.

Проведён анализ положительных результатов микробиологического исследования крови, полученных одновременно из обоих флаконов для культивирования аэробной и анаэробной микрофлоры. При исследовании частоты выделения монокультур и ассоциаций микроорганизмов из флаконов ожидаемо оказалось, что положительные результаты высевок преимущественно обусловлены одним видом микроорганизмов. Следует обратить внимание на выявленный пропорциональный рост частоты выделения ассоциаций микроорганизмов, вероятно, связанный с увеличением числа посевов крови (рис. 3). Данный факт можно рассматривать как неблагоприятный с точки зрения организации преаналитического этапа исследования, поскольку при классических ИК ассоциации микроорганизмов встречаются достаточно редко. Выявленная закономерность особенно важна с учётом роста числа назначений микробиологических исследований крови на стерильность. Проведение регулярных инструктажей среднего медицинского персонала является важным элементом в организации проведения микробиологического исследования крови.

В научной литературе в последние годы появляется все больше публикаций, в которых отмечается изменение этиологической структуры возбудителей ИК, с тенденцией к увеличению роли грамотрицательных микроорганизмов [4]. В нашем исследовании за 8-летний период наблюдения в двух флаконах выявлено 489 случаев роста микроорганизмов. Распределение патогенов показало, что грамположительная микрофлора остается доминирующей, и в среднем выделена в 69% случаев, в 31% идентифицированы грамотрицательные микроорганизмы (рис. 4).

Среди грамположительной микрофлоры наиболее часто выделялись *Staphylococcus aureus* (38%), далее примерно с одинаковой частотой выделялись *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* (10% и 13% соответственно), другие представители рода *Staphylococcus* (*S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*) суммарно встречались в 6-7% случаев. С сопоставимой частотой встречались энтерококки: *Enterococcus faecalis* – 10%, *E. faecium* – 13%. Стрептококки редко выделялись из положительных образцов гемокультуры: *Streptococcus gordonii* выделялся в 1,1% случаев, другие стрептококки (*S. gallolyticus*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. agalactiae*, *S. sanguis* и др.) встречались с частотой меньше 1%. Минорными изолятами из крови, являлись представители родов *Corynebacterium*, *Weissella*, *Abiotrophia*, *Listeria*, *Bacillus*, *Actinomyces*. При

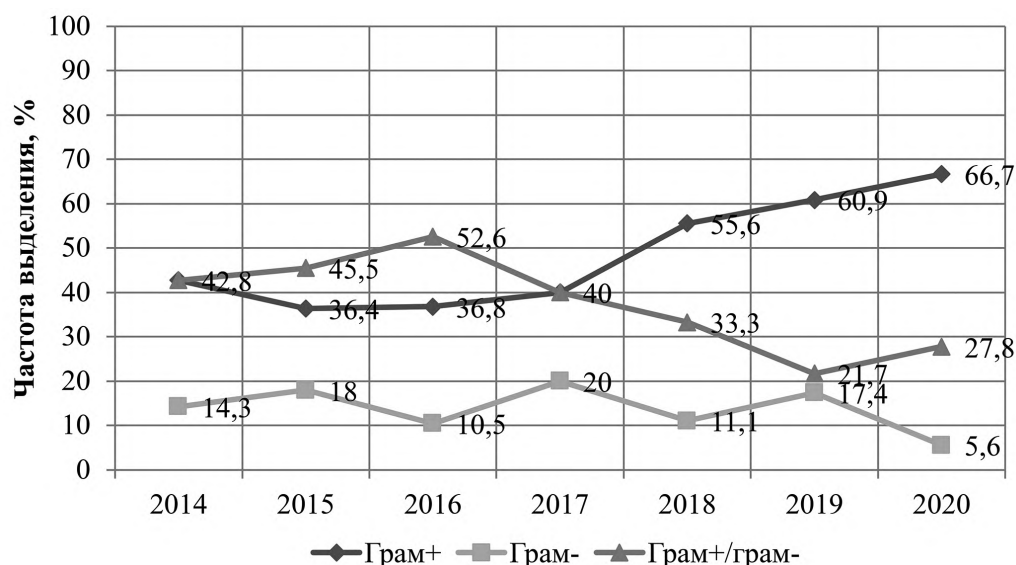


Рис. 5. Характеристика смешанных ИК.

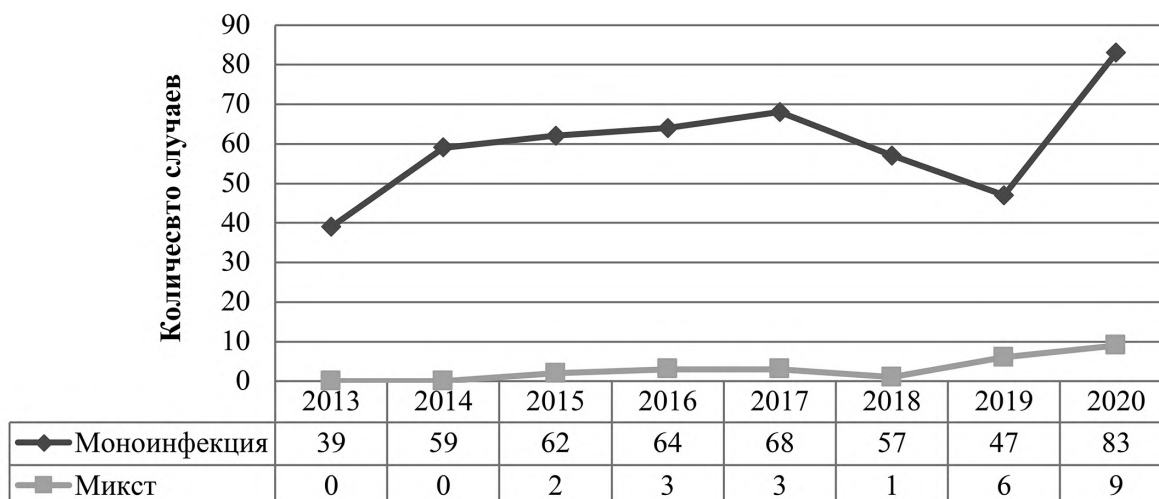


Рис. 6. Частота выделения одного и нескольких возбудителей одновременно из одного флакона.

динамическом анализе можно отметить, что реже стали выделяться *S.haemolyticus* (от 20,0% в 2013 г. до 6% в 2020 г.), *E.faecium* (от 57,0% в 2013 г. до 2% в 2020 г.), чаще – *S.hominis*.

Среди грамотрицательной микрофлоры в данной группе пациентов в половине случаев положительных образцов крови идентифицирована *Klebsiella pneumoniae*, примерно четверть случаев бактериемии вызвана *Escherichia coli*. Другие микроорганизмы составили 25% и включали *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, которые выделялись из положительных образцов гемокультуры в 4,3% и 3,8% случаев, с частотой 2-3% идентифицировались *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella spp.*, в 1% и менее встречались *Acinetobacter ursungii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter gergoviae*, *Citrobacter freundii*.

Ассоциации микроорганизмов, выделенные из парных флаконов, составили в среднем 11,8% (93 случая); распределение по годам наблюдений представлено на рис.4. Случаи микробных ассоциаций в динамике остаются примерно на том же уровне, анализ частоты выде-

ления патогенов показал, что преобладает грамположительная микрофлора, в то время как грамотрицательная микрофлора выделяется реже.

Наблюдается рост случаев выделения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в период 2015-2016 гг., с последующим снижением частоты встречаемости подобного сочетания микроорганизмов к 2020 г. (рис. 5).

Интерпретация данных ассоциаций как клинически значимых, является неблагоприятным фактором, обусловленным, в первую очередь, сложностью этиотропной терапии, требующей, зачастую, назначения нескольких антимикробных препаратов (АМП), что ведёт к увеличению вероятности побочных эффектов, экономической нагрузке, росту летальности. В подавляющем большинстве случаев высевались ассоциации микроорганизмов, представленные двумя патогенами, встречались ассоциации из 3-х и 4-х микроорганизмов. Выделение многокомпонентных ассоциаций является важным критерием нарушения преаналитического этапа при микробиологическом исследовании крови.

На следующем этапе исследования в анализ включались случаи, в которых выделение микроорганизма отмечено только из одного флакона из пары (рис. 6).

Частота выделения патогенов в зависимости от условий культивирования отличалась: чаще положительный результат наблюдался в аэробных флаконах (табл. 2), различия в частоте выделения микроорганиз-

мов в сравниваемых группах статистически значимы ($p < 0,05$).

Частота выделения одного микроорганизма была выше, чем ассоциаций (90% и 10% соответственно). Распределение возбудителей бактериемий, выделенных из одного флакона, представлено на рис. 7.

Среди грамположительной микрофлоры доминировали стафилококки. Относительно стабильную долю занимает *S.aureus*, частота выделения *S. haemolyticus* и *S. epidermidis* различалась: частота выделения *S.epidermidis* увеличилась с 3% в 2013 г. до 34% в 2020 г., выделение *S.haemolyticus*, наоборот, стало происходить реже (28%→4%). Среди других представителей рода *Staphylococcus* наиболее часто и стабильно выделялся *S.hominis*. Энтерококки идентифицированы примерно с одинаковой частотой (*Enterococcus faecalis* – 4,9% и *Enterococcus faecium* – 6,8%), представители рода *Streptococcus* встречались редко. Представители рода *Bacillus* суммарно составили 8,4%, наиболее частым представителем рода являлась *Bacillus cereus* (3,4%), реже встречались *B.licheniformis*, *B.atrophaeus*, *B.mojavensis*, *B.pumilus*. Другими редко встречающимися микроорганизмами являлись *Propionobacterium acnes*, *Dietzia natronolimnaea*, *Paenibacillus residui*, *Paenibacillus polymyxa*, *Brevibacterium casei*, *Lactobacillus mali*,

Таблица 2
Частота выделения патогенов в зависимости от условий культивирования

Годы	Моноинфекция, абс.	Аэробные флаконы, %	Анаэробные флаконы, %
2013	39	41	59
2014	59	76	24
2015	62	69	31
2016	64	60	40
2017	68	83	17
2018	57	55	45
2019	47	62	38
2020	83	67	33

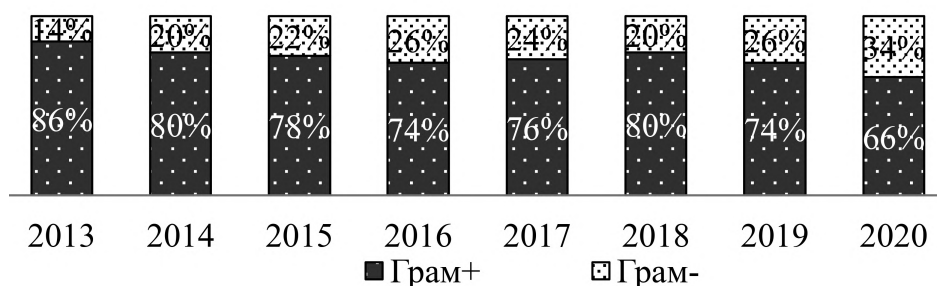


Рис. 7. Возбудители бактериемий, выделенные из одного флакона.

Таблица 3

Выделение возбудителей ИК в зависимости от условий культивирования

Микроорганизмы	Тип флакона	2013, абс.	2014, абс.	2015, абс.	2016, абс.	2017, абс.	2018, абс.	2019, абс.	2020, абс.	Манна-Уитни	p
<i>S.aureus</i>	АН	5	2	3	5	2	5	6	3	31,5	>0,05
	АЭ	2	6	3	7	15	2	3	2		
КОС	АН	6	6	7	8	2	9	7	14	17,5	>0,05
	АЭ	5	19	14	13	7	8	9	12		
Энтерококки	АН	3	3	2	1	1	3	1	1	32	>0,05
	АЭ	6	1	1	-	8	1	1	6		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	АН	1	-	-	1	2	3	-	6	27,5	>0,05
	АЭ	-	-	1	2	1	2	6	5		
<i>E.coli</i>	АН	3	-	1	5	-	-	-	1	23,0	>0,05
	АЭ	-	1	1	1	1	2	2	4		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	АН	-	-	-	-	-	-	-	-	8	<0,05
	АЭ	-	2	-	4	3	2	1	3		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	АН	-	-	1	-	-	-	1	-	22	>0,05
	АЭ	-	1	4	-	-	-	1	2		

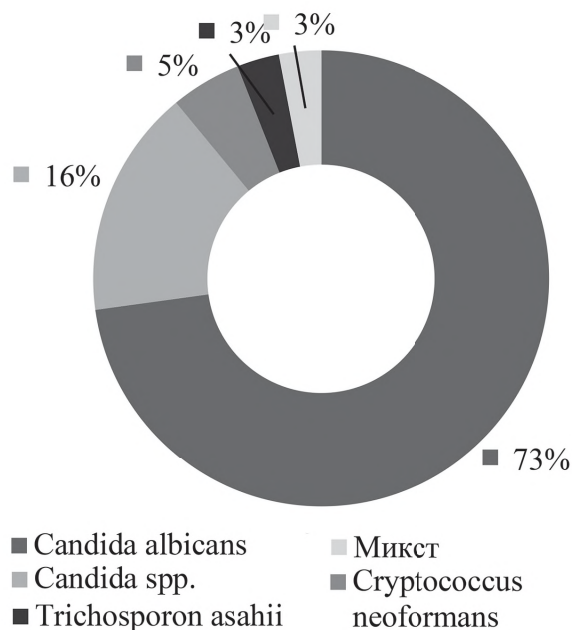


Рис. 8. Структура возбудителей фунгемии.

Nocardia farcinica, частота выделения которых составила менее 1%, представители коринебактерий, микрококков.

Анализ спектра грамотрицательной микрофлоры выявил доминирование *K.pneumoniae* (26,5%), *E.coli* (22,6%), *A.baumannii* (13,0%), *P.aeruginosa* (9,9%). Частота выделения *Achromobacter xylosoxidans*, *Enterobacter cloacae*, *Bacteroides fragilis* составила около 2%, менее 1% заняли представители родов *Myroides*, *Proteus*, *Bacteroides*, *Thauera* (табл. 3).

Грамположительная микрофлора с одинаковой частотой выделяется как из аэробных флаконов, так и в анаэробных условиях (см. табл. 3), *Acinetobacter baumannii* выделялся только в аэробных условиях, по остальным приоритетным грамотрицательным патогенам подобных закономерностей не выявлено.

Ассоциации микроорганизмов встречали с частотой 4,77% и включали наиболее часто комбинации грамположительных бактерий, реже встречались комбинации грамотрицательных и грамположительных патогенов, редкими были сочетания грамотрицательных микроорганизмов, комбинации бактерий и грибов.

Грибы выделялись со средней частотой 3,7% за восьмилетний период, видовое распределение показано на рис. 8. В большинстве случаев фунгемия обусловлена *Candida albicans*; другие представители рода *Candida* выделялись в 16% случаев и включали *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.atropicalis*. В одном случае выделена ассоциация *Candida kefyr* и *Candida inconspicua*. Рост грибов зарегистрирован только в аэробных условиях, что согласуется с особенностями обмена веществ у данных микроорганизмов.

Обсуждение. Превалирующими микроорганизмами, выделяемыми при микробиологическом исследовании крови в многопрофильном стационаре, оказались стафилококки, что коррелирует с отдельными работами отечественных и зарубежных авторов [5-8], однако отдельные исследования, посвященные характеристике этиологии ИК среди групп пациентов, могут демонстрировать иное распределение выделения возбудителей

ИК [9, 10]. Среди стафилококков, отдельно выделяют роль *S.aureus* и коагулазоотрицательных стафилококков (КОС): *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.saprophyticus*; при этом, клиническое значение выделения подобных изолятов остается дискуссионным и требует более тщательного изучения вопроса.

Описанное рядом авторов увеличение доли выделяемой грамотрицательной микрофлоры в течение времени наблюдения в нашем исследовании не подтвердилось, несмотря на некоторую тенденцию к увеличению, которая оказалась статистически незначимой [11].

Не обнаружено взаимосвязи выделяемой микрофлоры от условий аналитического этапа (в частности, условий культивирования), замечено, что штаммы *Acinetobacter baumannii* выделяются, преимущественно, из аэробных флаконов, что согласуется с данными об их типе обмена веществ [12]. Эти данные подтверждают обязательное одновременное использование питательных сред для культивирования как аэробных микроорганизмов, так и возбудителей с анаэробным типом обмена веществ, что позволяет увеличить высеваемость патогенов из крови [13, 14].

Фунгемия по данным нашего исследования в не декретированных группах пациентов наблюдается редко, доминирующим микроорганизмом при этом остается *Candida albicans*. Это согласуется с данными литературы [15], однако отмечается тенденция к снижению частоты выявления кандидемии, что может быть связано с увеличением частоты использования антимикотиков с профилактической целью в группе пациентов ОРИТ, реципиентов костного мозга, онкологических больных [16, 17]. Наблюдается тенденция к увеличению выделения *Candida non-albicans* и других дрожжеподобных грибов [18, 19].

Заключение. Микробиологическое исследование крови остается одним из важных видов анализа при оказании стационарной помощи в ЛПУ. Несмотря на высокую стоимость, необходимо широкое внедрение автоматических анализаторов гемокультур, что позволяет повышать эффективность данного вида исследования и сокращать его сроки. Появление на рынке доступных по цене вариантов оборудования и тест-систем актуализирует повышение уровня знаний преаналитического этапа для среднего медицинского персонала, так как контаминация микрофлорой кожи содержимого флаконов может значительно затруднить верификацию этиологической ценности выделенного микроорганизма. Необходим микробиологический мониторинг с целью определения преобладающей госпитальной микрофлоры в каждом отделении ЛПУ, что позволит своевременно и адекватно реагировать со стороны противоэпидемических мероприятий с целью ограничения распространения высоко вирулентных и резистентных штаммов микроорганизмов – потенциальных возбудителей ИК.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 13 см. REFERENCES)

- Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Миронов А.Ю., Борисова О.Ю., Бурбелло А.Т. Маркёры воспаления и инфекция кровотока (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*; 2019; 64(7): 435-42. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-435-442.
- Миронов А.Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А. Микрофлора гнойно-септических заболеваний у больных в Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*; 2000; 5: 11-5.

4. Стома И.О., Карпов И.А., Искров И.А., Лендина И.Ю., Губанова Т.Н., Парчинская Ю.А. и др. Факторы риска инфекционных осложнений у взрослых пациентов гематологического профиля на фоне химиотерапии: результаты проспективного когортного исследования. *Клиническая инфектология и паразитология*. 2019; 2(8):175-81.
5. Попов Д.А., Надточей Е.А. Алгоритм диагностики бактериемии у кардиохирургических больных в ОРИТ. *Анестезиология и реаниматология*. 2017; 62(5): 382-7. DOI: 10.18821/0201-7563-2017-62-5-382-387.
6. Грувер К.П., Жуховицкий В.Г., Белобородов В.Б. Клинико-эпидемиологические особенности бактериемии. *Инфекционные болезни*. 2010; 4(8): 13-8.
7. Бонда Н.А., Лагун Л.В., Тапальский Д.В. Этиологическая структура инфекций кровотока. *Проблемы здоровья и экологии*; 2018; 4(58): 15-20.
8. Каргальцева Н.М., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Кочеровец В.И., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Инфекция кровотока у госпитальных терапевтических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(6): 355-61. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-6-355-361.
9. Багирова Н.С. Таксономическая структура и резистентность к антибиотикам возбудителей инфекций кровотока у онкогематологических больных. *Клиническая онкогематология*. 2015; 8(2): 191-200.
10. Куцевалова О.Ю., Козель Ю.Ю., Алавердян А.И., Гусак Д.А. Анализ этиологической структуры инфекций кровотока с использованием автоматического бактериологического анализатора Юнона® Labstar 100. *Клиническая лабораторная диагностика*; 2022; 67(2): 101-5. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-2-101-105.
11. Бонда Н.А., Тапальский Д.В., Стома И.О. Клинико-лабораторные характеристики и этиологическая структура инфекций кровотока: результаты мультицентрового клинического исследования. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021; 10(2): 54-9. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-2-54-59.
12. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н., ред. Руководство по медицинской микробиологии: в 3 томах. Т.1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. М.: Бином; 2013.
14. Боронина Л. Г., Саматова Е. В., Кукушкина М. П., Панова С.А., Устюгова С.С. Внутривлабораторный контроль качества питательных сред для автоматического бактериологического анализатора Юнона®Labstar 50. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(2): 110-4. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114.
15. Клясова Г.А. Профилактика, диагностика и лечение инвазивных микозов в многопрофильном стационаре у взрослых больных. *Медицинский алфавит*. 2015; 4(20): Неотложная медицина: 37-48.
16. Багирова Н.С. Инвазивные грибковые инфекции: пересмотр определений, новое в диагностике по данным EORTC/MSGERC. *Злокачественные опухоли*. 2020; 3s1: 39-48.
17. Леонов В.В., Миронов А.Ю., Леонова Л.В., Никитина Л.Ю. Этиологическая структура и биологические свойства возбудителей инфекций кровотока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(11): 790-3. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-11-790-793.
18. Приходченко А.О., Нечушкина В.М., Вяткин П.В. Современные подходы к терапии инвазивных микозов у онкологических пациентов. *Современная онкология*. 2021; 23(2): 349-53. DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200708.
19. Воробьев А. А., Быков А. С., Бойченко М. Н., Несвижский Ю.В., Дратвин С.А., Пашков Е.П. и др. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских вузов. 3-е изд., исправленное. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
2. Kargal'tseva N.M., Kocherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu., Burbello A.T. Markers of inflammation and bloodstream infection (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(7): 435-42. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-435-442. (in Russian)
3. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'yov A.A. Microflora of purulent-septic diseases in patients in the Moscow region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 5: 11-5. (in Russian)
4. Stoma I.O., Karpov I.A., Iskrov I.A., Lendina I.Yu., Gubanova T.N., Parchinskaya Yu.A. Risk factors for infectious complications in adult hematological patients treated with chemotherapy: results of a prospective cohort study. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya*. 2019; 2(8):175-81. (in Russian)
5. Popov D.A., Nadtochey E.A. Algorithm for diagnosing bacteremia in cardiac surgery patients in the ICU. *Anesteziologya i reanimatologiya*. 2017; 62(5): 382-7. DOI: 10.18821/0201-7563-2017-62-5-382-387. (in Russian)
6. Gruver K.P., Zhukhovitskiy V.G., Beloborodov V.B. Clinical and epidemiological features of bacteremia. *Infektsionnye bolezni*. 2010. 4(8): 13-8. (in Russian)
7. Bonda N.A., Lagun L.V., Tapal'skiy D.V. Etiological structure of bloodstream infections. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2018; 4(58): 15-20. (in Russian)
8. Kargal'tseva N.M., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Kocherovets V.I., Pimenova A.S., Gadua N.T. Bloodstream infection in hospital therapeutic patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(6): 355-61. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-6-355-361. (in Russian)
9. Bagirova N.S. Taxonomic structure and resistance to antibiotics of causative agents of bloodstream infections in oncohematological patients. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2015; 8(2): 191-200. (in Russian)
10. Kutsevalova O.Yu., Kozel' Yu.Yu., Alaverdyan A.I., Gusak D.A. Analysis of the etiological structure of bloodstream infections using the automatic bacteriological analyzer Juno® Labstar 100. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(2): 101-5. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-2-101-105. (in Russian)
11. Bonda N.A., Tapal'skiy D.V., Stoma I.O. Clinical and laboratory characteristics and etiological structure of bloodstream infections: results of a multicenter clinical study. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2021; 2(10): 54-9. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-2-54-59. (in Russian)
12. Labinskaya A.S., Kostyukova N.N., eds. Guide to medical microbiology: in 3 volumes. Т.1. Opportunistic infections: pathogens and etiological diagnosis. Moscow: Binom; 2013. (in Russian)
13. Amy L. Leber, ed. Clinical Microbiology. Procedures Handbook. 4th ed. Washington, DC: ASM Press; 2016.
14. Boronina L.G., Samatova E.V., Kukushkina M.P., Panova S.A., Ustjugova S.S. Intralaboratory quality control of nutrient media for automatic bacteriological analyzer Juno®Labstar 50. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(2): 110-4. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-110-114. (in Russian)
15. Klyasova G. A. Prevention, diagnosis and treatment of invasive mycoses in a multidisciplinary hospital in adult patients. *Meditinskij alfavit*. 2015; 4(20), Neotlozhnaya meditsina: 37-48. (in Russian)
16. Bagirova N.S. Invasive fungal infections: redefinition, new in diagnosis according to EORTC/MSGERC. *Zlokachestvennye opukholi*. 2020; 3s1: 39-48. (in Russian)
17. Leonov V.V., Mironov A.Yu., Leonova L.V., Nikitina L.Yu. Etiological structure and biological properties of causative agents of bloodstream infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(11): 790-3. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-11-790-793. (in Russian)
18. Prihodchenko A.O., Nechushkina V.M., Vyatkin P.V. Modern approaches to the treatment of invasive mycoses in cancer patients. *Sovremennaya onkologiya*. 2021; 23(2): 349-53. DOI: 10.26442/18151434.2021.2.200708. (in Russian)
19. Vorob'yov A. A., Bykov A. S., Boychenko M. N., Nesvizhskij Yu.V., Dratvin S.A., Pashkov E.P. et al. Medical microbiology, virology and immunology: A textbook for medical students [Meditinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Uchebnik]. 3rd ed., revised. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian)

REFERENCES

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Мангутов Э.О.¹, Алиева А.А.¹, Харсеева Г.Г.¹, Воронина Н.А.¹, Алексеева Л.П.², Евдокимова В.В.², Якушева О.А.², Попивненко М.Д.¹

CORYNEBACTERIUM SPP.: ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ И РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;

²ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

Corynebacterium spp. входят в состав микробиома человека, но могут явиться причиной развития воспалительных заболеваний различной локализации. Цель – оценить взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к антимикробным препаратам (АМП) изолятов *Corynebacterium spp.* от больных с воспалительными заболеваниями (MALDI-ToFMS), респираторного тракта. Штаммы *Corynebacterium spp.* выделены от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (99 штаммов) и практически здоровых лиц (33 штамма). Изоляты идентифицированы масс-спектрометрическим методом, определена их адгезивная и инвазивная активность на клетках Нер-2, цитопатическое действие (ЦПД) в культуре клеток CHO-K1, резистентность к антимикробным препаратам (АМП). Показатели адгезии ($3,65 \pm 0,679$ (КОЕ $\pm m$) $\times 10^2$ /мл), инвазии ($1,72 \pm 0,230$ (КОЕ $\pm m$) $\times 10^2$ /мл), цитотоксичности ($69,1 \pm 3,8\%$ погибших клеток CHO-K1) штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных, выше ($p \leq 0,05$), чем аналогичные показатели у практически здоровых. Резистентностью к АМП обладали 90,9% изолятов от больных, в большинстве случаев ($57,6 \pm 4,9\%$) отмечена резистентность только к одному АМП, реже – к двум ($25,2 \pm 4,3\%$), трём и более ($8,08 \pm 2,7\%$). По результатам корреляционно-регрессионного анализа, патогенные свойства (адгезивность, инвазивность, цитотоксичность) штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных, находятся, в тесной прямой взаимосвязи с резистентностью к АМП. Это указывает на важность выявления резистентных к АМП штаммов недифтерийных коринебактерий, которые под влиянием формирующейся резистентности к АМП могут увеличивать свой патогенный потенциал, переходя от комменсализма к паразитизму.

Ключевые слова: *Corynebacterium spp.*; адгезивность; инвазивность; цитотоксичность; резистентность к АМП.

Для цитирования: Мангутов Э.О., Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Якушева О.А., Попивненко М.Д. *Corynebacterium spp.*: взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к антимикробным препаратам. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (9): 519-524. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-519-524>

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, проф., зав.каф.; e-mail: galinagh@bk.ru

Финансирование. Исследование проводилось за счет средств Федерального бюджета в рамках государственного задания «Маркеры патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, связанных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта» и Отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.06.2022

Принята к печати 01.07.2022

Опубликовано 12.09.2022

Mangutov E.O.¹, Alieva A.A.¹, Kharseeva G.G.¹, Voronina N.A.¹, Alekseeva L.P.², Evdokimova V.V.², Yakusheva O.A.², Popivnenko M.D.¹

CORYNEBACTERIUM SPP.: RELATIONSHIP OF PATHOGENIC PROPERTIES AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE

¹Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; 344002, Rostov-on-Don, Russian Federation

Corynebacterium spp. are part of the human microbiome, but can cause the development of inflammatory diseases of various localization. Purpose – to evaluate the relationship between pathogenic properties and resistance to antimicrobial drugs (AMD) of *Corynebacterium spp.* from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract. Strains of *Corynebacterium spp.* isolated from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract (99 pcs.) and practically healthy individuals (33 pcs.). Isolates were identified by mass spectrometric method (MALDI-ToFMS), their adhesive and invasive activity on Hep-2 cells, cytopathic effect (CPE) in CHO-K1 cell culture, and resistance to antimicrobial drugs (AMD) were determined. Indicators of adhesion (3.65 ± 0.679 (CFU $\pm m$) $\times 10^2$ /ml), invasion (1.72 ± 0.230 (CFU $\pm m$) $\times 10^2$ /ml), cytotoxicity ($69.1 \pm 3.8\%$ of dead CHO-K1 cells) *Corynebacterium spp.* strains isolated from patients are higher ($p \leq 0.05$) than similar indicators in practically healthy people. 90.9% of isolates from patients had resistance to AMD, in most cases ($57.6 \pm 4.9\%$) resistance to only one AMP was noted, less often to two ($25.2 \pm 4.3\%$), three or more ($8.08 \pm 2.7\%$). According to the results of correlation-regression analysis, pathogenic properties (adhesiveness, invasiveness, cytotoxicity) of *Corynebacterium spp.* strains isolated from patients are in close direct relationship with resistance to AMD. This indicates the importance of identifying strains of non-diphtheria corynebacteria resistant to AMDs, which, under the influence of developing resistance to AMDs, can increase their pathogenic potential, moving from commensalism to parasitism.

Key words: *Corynebacterium spp.*; adhesiveness; invasiveness; cytotoxicity; AMD resistance.

For citation: Mangutov E.O., Alieva A.A., Kharseeva G.G., Voronina N.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V., Yakusheva O.A., Popivnenko M.D. *Corynebacterium spp.*: relationship of pathogenic properties and antimicrobial resistance. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 519-524 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-519-524>

For correspondence: Kharseeva Galina Georgievna, Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2;
e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Mangutov E.O., <https://orcid.org/0000-0001-6959-2540>;
Alieva A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0795-5312>;
Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Voronina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-9655-6876>;
Aleksseeva L.P., <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>;
Evdokimova V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>;
Yakusheva O.A., <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>;
Popivnenko M.D., <https://orcid.org/0000-0002-3383-3223>.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 01.06.2022

Accepted 01.07.2022

Published 12.09.2022

Введение. Род *Corynebacterium*, относящийся к классу *Actinobacteria*, порядку *Actinomycetales*, семейству *Corynebacteriaceae* [1, 2], насчитывает более 132 видов и 11 подвидов, 53 из которых имеют медицинское значение [3]. Три вида коринебактерий обладают способностью продуцировать токсины: *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* (дифтерийный экзотоксин), *C. pseudotuberculosis* (PLD-экзотоксин) [4, 5]. Не продуцирующие токсины виды *Corynebacterium* spp., входят в состав микробиома человека, но при определённых условиях могут явиться причиной развития пневмонии инфекционного эндокардита, остеомиелита, менингита, инфекционных поражений кожи, глаз, урогенитального тракта [6, 7, 8, 9]. Некоторые из них, в частности, *C. striatum*, вызывают инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [10, 11]. У пациентов с гематологическими заболеваниями *C. striatum* и *C. jeikeium* являются основными видами рода *Corynebacterium*, вызывающими инфекции кровотока [12–14]. Эти виды коринебактерий выделяют, в том числе, при bacteriemia из крови у пациентов с COVID-19 [13]. За последние несколько лет число зарегистрированных случаев заболеваний, обусловленных *Corynebacterium* spp., значительно увеличилось, что связывают с совершенствованием методов микробиологического исследования, направленных на точную идентификацию этих микроорганизмов [3]. Учитывая имеющиеся указания на роль в патологии недифтерийных коринебактерий, важное значение имеет установление параметров их патогенности, связанных с иными, помимо токсина, факторами (адгезивность, инвазивность, цитотоксичность, способность ряда видов продуцировать ферменты гемолизин и уреазу) [15, 16]. Учитывая, что в настоящее время изоляты микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) расценивают как высоко патогенные [17], особую важность приобретает определение резистентности штаммов *Corynebacterium* spp. к антимикробным препаратам (АМП).

Цель исследования – оценить взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к АМП штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

Материал и методы. Исследованы штаммы *Corynebacterium* spp., выделенные в 2017–2021 гг. из верхних дыхательных путей (нос, зев) от больных с тонзиллитом, ангиной, ринофарингитом, бронхитом, пневмонией (99 штаммов) и практически здоровых лиц (33 штамма) в бактериологической лаборатории МБУЗ «Детская го-

родская больница № 1 города Ростова-на-Дону», МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону», ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. От каждого пациента получено информированное согласие на участие в исследовании. Штаммы *Corynebacterium* spp. выделены от больных в количестве 10^5 КОЕ/мл и более, практически здоровых лиц – 10^4 КОЕ/мл и менее в соответствии с указаниями [15]. Идентификация проведена масс-спектрометрическим методом (MALDI-ToFMS) на приборе Bruker Daltonics Biotyper (Германия).

Адгезивные свойства исследованы на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при экспозиции 18 часов [18]. Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6–7,8) в течение 18 ч, готовили взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл (по стандарту МакФарланда) и вносили её в объёме 0,5 мл в 4,5 мл сывороточного бульона (рН 7,6–7,8), инкубировали в термостате (+37°C) в течение 24 ч. Выросшую бульонную культуру микроорганизмов центрифугировали при 1509 g, удаляли надосадок и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл по стандарту МакФарланда. По 1 мл полученной взвеси коринебактерий густотой 10^6 КОЕ/мл вносили в лунки с разреженным монослоем Нер-2 и инкубировали в течение 18 ч в CO₂-инкубаторе при температуре +37°C и 5% CO₂. В качестве контроля использована интактная культура клеток Нер-2. Лунки планшета трижды промывали раствором Хенкса, удаляя несвязавшиеся клетки коринебактерий. В лунки вносили 1 мл раствора трипсина (ООО «БиолоТ», Россия) на 5–7 мин для отслоения монослоя клеток Нер-2. После этого трипсин удаляли из лунок. Культуру клеток Нер-2 с адгезированными на них коринебактериями смывали раствором Хенкса. Количество коринебактерий, адгезированных на клетках Нер-2, определяли путём посева смыва на мясопептонный агар с добавлением 20% сыворотки лошадиной нормальной для культивирования микроорганизмов с последующим подсчётом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл и выражали в (КОЕ±m)×10².

Инвазивные свойства исследованы на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при экспозиции 18 ч. [18]. Инвазивные свойства штаммов *Corynebacterium* spp. выражали в (КОЕ±m)×10².

Цитопатическое действие (ЦПД) фильтратов планктонных культур штаммов *Corynebacterium* spp., полученных с использованием мембранных фильтров фирмы

«Millipore» (США) с размером пор 0,45 мкм, исследовали на культуре овариальных клеток китайских хомячков СНО-K1. Фильтраты титровали в 96-луночной планшете в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и вносили в лунки с клетками СНО-K1 по 0,05 мл, предварительно удалив питательную среду. Каждый образец фильтрата культур коринебактерий исследован в 7-8 повторях. Планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч при +37°C, влажности 90% и 5%-ной концентрации CO₂. Учёт количества жизнеспособных и погибших, морфологически изменённых клеток производили с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Для этого лунки с интактной культурой клеток СНО-K1 (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию фильтратов исследованных культур коринебактерий (опыт), фиксировали на предметном столике. Затем клетки фотографировали через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз без дополнительного окрашивания.

Чувствительность к антимикробным препаратам (бензилпенициллину, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, гентамицину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, линкомицину, рифампицину) определяли диско-диффузионным методом [19].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoftInc, США) и MedCalc (версия 9.3.5.0) [20].

Результаты. При рассмотрении патогенных свойств 99 клинических изолятов *Corynebacterium* spp. от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (табл. 1), установлено, что диапазон колебаний показателей адгезии колебался в пределах от 1,50±0,032

(КОЕ±m)×10²/мл (*C. freneyi*, *C. tuberculoostearicum*) до 9,63±3,394(КОЕ±m)×10²/мл (*C. amycolatum*). Средний показатель адгезии для этих штаммов составил 3,65±0,679(КОЕ±m)×10²/мл. Показатели инвазии находились в пределах от 0,70±0,010 (КОЕ±m)×10²/мл (*C. minutissimum*, *C. tuberculoostearicum*, *C. accolens*) до 3,73±1,239(КОЕ±m)×10²/мл (*C. amycolatum*). Средний показатель инвазии для этих штаммов составил 1,72±0,230 (КОЕ±m)×10²/мл. Показатели цитотоксичности имели минимальные значения (25,0±4,1% погибших клеток) у штаммов, относящихся к виду *C. accolens*, и максимальные (100% погибших клеток) у штаммов *C. striatum* и *C. aurimucosum*. Показатель ЦПД этих штаммов недифтерийных коринебактерий составил, в среднем, 69,1±3,8%. Резистентностью к АМП обладали 90,9% всех исследованных штаммов. В большинстве случаев (57,6±4,9%) отмечена резистентность только к одному АМП, реже – к двум (25,2±4,3%), трём и более (8,08±2,7%).

При определении патогенных свойств 33 штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от практически здоровых лиц (табл. 2), установлено, что диапазоны колебаний показателей адгезии (0,79-2,07(КОЕ±m)×10²/мл), инвазии (0,30-0,87 (КОЕ±m)×10²/мл), цитотоксичности (15,0-40,0%) значительно ниже, чем недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных. Средние показатели адгезии, инвазии и цитотоксичности этих штаммов, соответственно, имели более низкие ($p \leq 0,05$) значения. Показатели резистентности к АМП существенно не отличались от аналогичных у изолятов коринебактерий, выделенных от больных. Всего обнаружено 75,7% резистентных к АМП штаммов коринебактерий, из ко-

Таблица 1

Показатели адгезивности, инвазивности, цитотоксичности, резистентности к АМП штаммов *Corynebacterium* spp., выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта

Вид	Количество штаммов	Адгезия (КОЕ±m)×10 ² /мл	Инвазия (КОЕ±m)×10 ² /мл	ЦПД (% повреждённых клеток СНО-K1 (M±SD)	Количество резистентных к АМП штаммов (абс./%±m)		
					1	2	3 и более
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	37	3,24±0,625	1,76±0,315	70,3±6,3	21	12	1
<i>C. propinquum</i>	17	2,84±0,574	1,59±0,296	67,6±13,9	14	2	2
<i>C. accolens</i>	10	2,38±0,447	0,77±0,315	25,0±4,1	4		
<i>C. afermentans</i>	8	2,94±0,595	1,34±0,660	82,5±6,5	4	2	1
<i>C. argentoratense</i>	8	8,43±3,345	2,69±0,870	85,0±11,5	5	3	
<i>C. amycolatum</i>	4	9,63±3,394	3,73±1,239	87,5±11,1	3		1
<i>C. tuberculoostearicum</i>	3	1,53±0,385	0,73±0,002	66,7±3,2	1	2	
<i>C. falsenii</i>	2	1,60±1,033	1,45±0,667	90,0±1,7		1	1
<i>C. mucifaciens</i>	2	3,70±0,600	1,65±0,350	65,0±5,0	2		
<i>C. simulans</i>	2	3,45±0,288	1,80±0,002	80,0±1,3		2	
<i>C. aurimucosum</i>	1	2,70±0,115	2,80±0,100	100,0±4,4		1	
<i>C. freneyi</i>	1	1,50±0,032	1,00±0,003	80,0±1,7	1		
<i>C. coyleae</i>	1	3,20±0,002	2,50±0,005	90,0±1,3			1
<i>C. durum</i>	1	2,20±0,015	1,70±0,012	40,0±3,4	1		
<i>C. striatum</i>	1	4,30±0,324	2,50±0,002	100,0±0,2			1
<i>C. minutissimum</i>	1	4,00±0,001	0,70±0,010	70,0±1,2	1		
Всего:	99	3,65±0,679	1,72±0,23	69,1±3,8	57 57,6±4,9	25 25,2±4,3	8 8,08±2,7

Таблица 2

Показатели адгезивности, инвазивности, цитотоксичности, резистентности
к АМП штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от практически здоровых людей

Вид	Количество штаммов	Адгезия (КОЕ±m)×10 ² /мл	Инвазия (КОЕ±m)×10 ² /мл	ЦПД (% поврежденных клеток CHO-K1 (M±SD)	Количество резистентных к АМП штаммов (абс./%±m)		
					1	2	3 и более
<i>C. accolens</i>	11	0,79±0,068	0,57±0,079	18,2±1,8	6		
<i>C. propinquum</i>	11	1,09±0,217	0,66±0,153	34,5±3,1	8	2	
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	7	0,84±0,138	0,87±0,029	24,3±2,0	4	1	1
<i>C. durum</i>	2	1,00±0,059	0,30±0,002	15,0±5,0	1		
<i>C. xerosis</i>	1	2,07±0,152	0,80±0,010	40,0±1,7	1		
<i>C. amycolatum</i>	1	2,00±0,001	0,70±0,002	20,0±1,4	1		
Всего	33	0,99±0,095	0,66±0,061	25,5±1,9	21 63,6±8,3	3 9,09±5,0	1 3,03±2,9

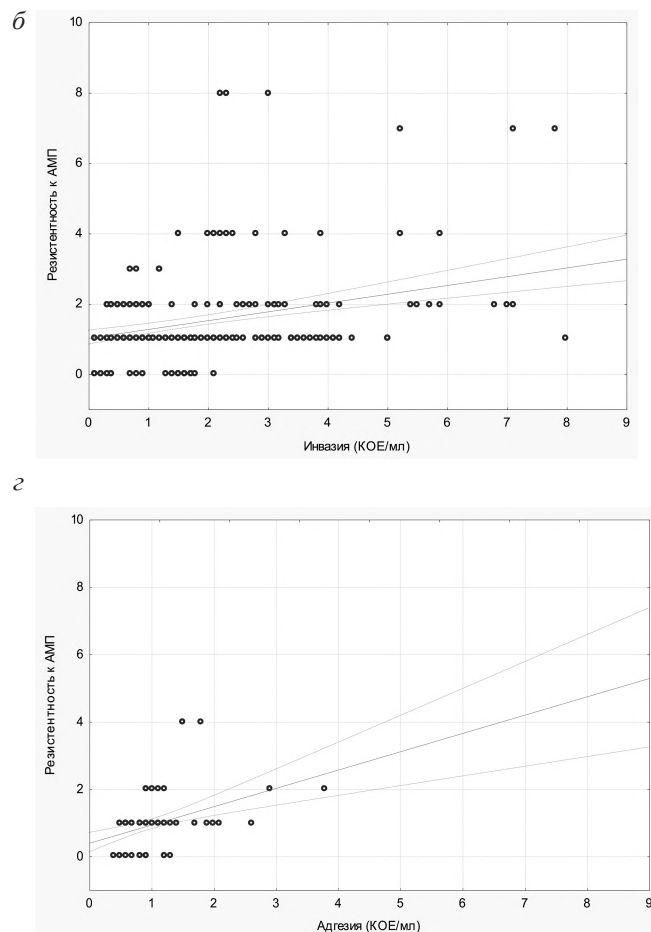
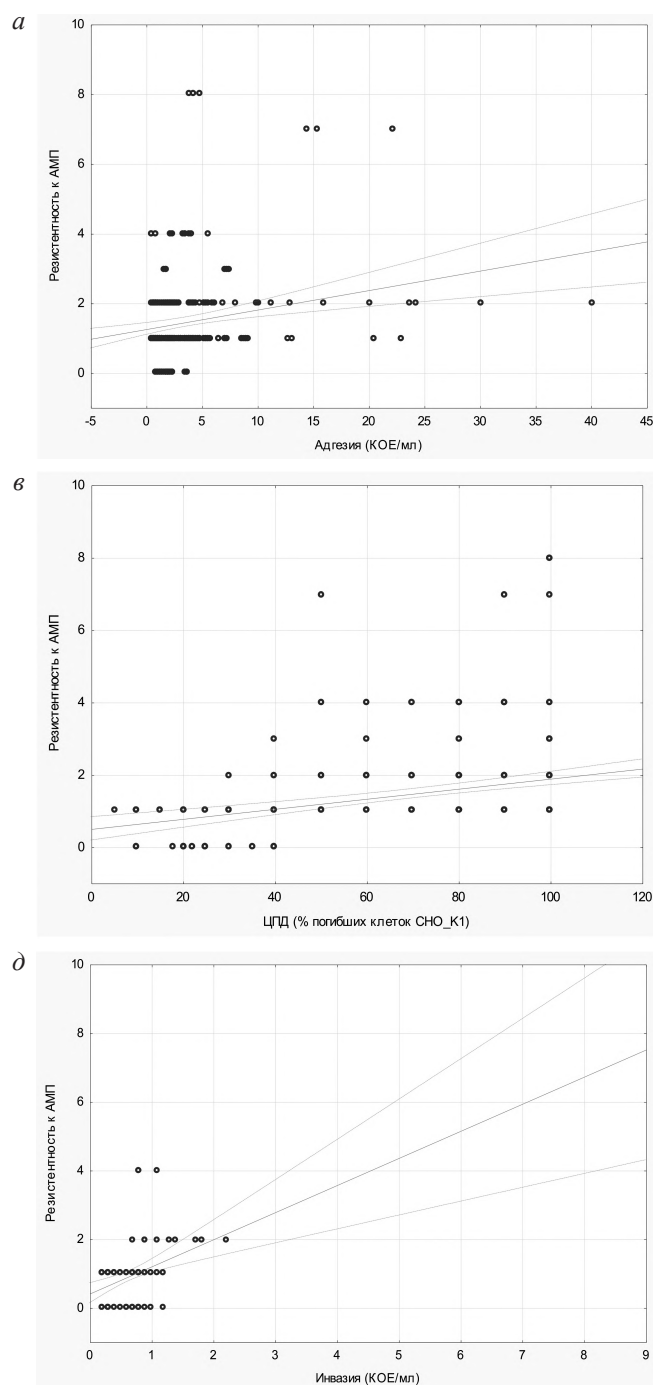
торых у 63,6±8,3% отмечена резистентность к одному, 9,09±4,3% – к двум, 3,03±2,9% – трём и более АМП.

По результатам корреляционно-регрессионного анализа (см. рисунок, *a-d*) между показателями адгезивности и резистентности к АМП штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных как от больных, так и практически здоровых лиц, выявлена тесная прямая взаимосвязь, что отражено высоким градиентом наклона линии регрессии к оси абсцисс и скученностью точек корреляционного поля около линии регрессии на небольшой площади. Наиболее тесные взаимосвязи между этими показателями у штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных, проявлялись в диапазоне от 0 до 10 по шкале адгезии, и от 0 до 4- резистентности к АМП ($p=0,016689$). У штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от практически здоровых лиц, диапазон выявления тесной взаимосвязи между этими показателями более узкий и находится в пределах от 0,4 до 2 по шкале адгезии, и от 0 до 2- резистентности к АМП ($p=0,001115$). Аналогичные результаты получены и при проведении корреляционно-регрессионного анализа между показателями инвазивности и резистентности к АМП штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных как от больных ($p=0,011752$), так и практически здоровых лиц ($p=0,000416$). Результаты корреляционно-регрессионного анализа показателей ЦПД и резистентности к АМП выявили тесную взаимосвязь только при исследовании изолятов недифтерийных коринебактерий от больных с патологией респираторного тракта ($p=0,000000$), но не практически здоровых обследованных.

Обсуждение. Недифтерийные коринебактерии, являясь представителями микробиома человека, отличаются широким видовым разнообразием. Многочисленные указания на роль этих микроорганизмов в развитии воспалительных заболеваний различной локализации [6 – 9] указывают на необходимость проведения микробиологической диагностики, направленной на их выявление и идентификацию. Определение видовой принадлежности не продуцирующих токсин *Corynebacterium spp.* не является достаточным для установления их этиологической значимости в формировании патологического процесса. Необходима дифференциация процессов колонизации и инфекции, обусловленной недифтерийнымикоринебактериями, которая является достаточно сложной задачей и связана с определением факторов патогенно-

сти. По нашим данным, показатели адгезивной, инвазивной, цитотоксической активности изолятов недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, в среднем, достоверно выше ($p\leq 0,05$), чем выделенных от практически здоровых лиц. Среди изолированных от больных штаммов коринебактерий некоторые имели низкие значения адгезивности, инвазивности и цитотоксичности. При проведении корреляционно-регрессионного анализа удалось обнаружить тесную взаимосвязь между показателями адгезии, инвазии и резистентности к АМП штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных как от лиц с патологией респираторного тракта, так и практически здоровых. Показатели ЦПД и резистентности к АМП находились в тесной корреляционной взаимосвязи только при исследовании изолятов недифтерийных коринебактерий от больных. При этом наклон линий регрессии ниже (см. рисунок). Это позволило предположить, что под влиянием формирующейся резистентности к АМП у изолятов *Corynebacterium spp.* происходит модификация поверхностных структур бактериальной клетки и, как следствие, увеличение способности к адгезии и инвазии. Это коррелирует с данными о том, что предшествующее лечение пациентов АМП, по-видимому, даже способствует колонизации *C. pseudodiphtheriticum* их организма [21]. Цитотоксичность штаммов недифтерийных коринебактерий, по всей видимости, может быть связана не только с адгезинами, но и с другими факторами патогенности коринебактерий. По нашим данным, резистентность изолятов *Corynebacterium spp.* к АМП обусловлена штаммовыми различиями, а не видовой принадлежностью и тесно связана с проявлением патогенных свойств. Это свидетельствовало в пользу проведения постоянного мониторинга резистентности к АМП штаммов недифтерийных коринебактерий, выделяемых от пациентов с воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

Заключение. Патогенные свойства (адгезивность, инвазивность, цитотоксичность) штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, находятся, по результатам корреляционно-регрессионного анализа, в тесной прямой взаимосвязи с резистентностью к АМП. Это указывает на важность выявления резистентных к АМП штаммов недифтерийных коринебактерий, которые под



Корреляционное поле точек и линии регрессии, характеризующие зависимость между показателями адгезии, инвазии, цитотоксичности и резистентности к АМП штаммов *Corynebacterium spp.*, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (а, б, в) и практически здоровых лиц (з, д).

влиянием формирующейся резистентности к АМП могут увеличивать свой патогенный потенциал, переходя от комменсализма к паразитизму.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-8, 10-13, 15, 16, 18, 19, 21 см. REFERENCES)

2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник для студентов медицинских вузов. Воробьев А.А., Быков А.С., Бойченко М.Н., ред. и др. 3-е издание, исправленное. ред. М.: Медицинское информационное агентство; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2.
9. Миронов А. Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А. Условно-патогенные микроорганизмы при заболеваниях дыхательных путей

- у больных региона Московской области. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2000; 1:81-4.
14. Каргальцева Н.М., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Кочеровец В.И., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Инфекция кровотока у госпитальных терапевтических больных. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (6): 355-61.
17. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (Постановление Главного санитарного врача РФ № 4 от 28.01.2021 г.).
19. Материалы Европейского комитета по определению чувствительности к АМП (EUCAST, 2021). <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>.
20. Омельченко В.П., Демидова А.А. Информатика, медицинская информатика, статистика. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2021.

REFERENCES

1. Lehmann K.B., Neumann R. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. Pub. München, Lehmann, 1919-1920.
2. Medical microbiology, virology and immunology. Textbook. Vorob'yov A.A., Bykov A.S., Boychenko M.N., eds. Moscow: Medical News Agency; 2022. ISBN 978-5-9986-0478-2. (in Russian).
3. Zasada A.A., Mosiej E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. *Lett Appl. Microbiol.* 2018; 66: 472-83.
4. Williams M.M., Waller J.L., Aneke J.S., Weigand M.R., Diaz M.H., Bowden K.E. et al. Detection and Characterization of Diphtheria Toxin Gene-Bearing *Corynebacterium* Species through a New Real-Time PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58 (10): e00639-20.
5. McKean S., Davies J., Moore R. Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology.* 2007; 153(7): 2203-11.
6. Valdoleiros S.R., Neves C.S., Carvalho J.A., Gonçalves C., Pereira P., Vasconcelos O. et al. Infection and colonization by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: a 9-year observational study in a university central hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39 (9): 1745-52.
7. Chauvelot P., Ferry T., Tafani V., Diot A., Tasse J., Conrad A. et al. Bone and joint infection involving *Corynebacterium* spp.: from clinical features to pathophysiological pathways. *Front Med. (Lausanne)*. 2021; 7: 539501.
8. Clariot S., Constant O., Lepeule R., Fihman V., Razazi K., Cook F. et al. Clinical relevance and impact of *Corynebacterium* isolation in lower respiratory tract of critically ill patients requiring mechanical ventilation. *Infection.* 2020; 48 (3): 413-20.
9. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'yov A. A. Opportunistic pathogens in diseases of the respiratory tract in patients in the region of the Moscow region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2000; 1: 81-4. DOI:10.17816/EID40582. (in Russian)
10. Silva-Santana G., Silva C.M.F., Olivella J.G.B., Silva I.F., Fernandes L.M.O., Sued-Karam B.R. et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections, nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug resistance, 1976–2020. *Archives of Microbiology.* 2021; 203(5):1863-80. DOI: 10.1007/s00203-021-02246-1.
11. Souza C., Faria Y.V., Sant'Anna L.O., Gonçalves Viana V., Seabra S. H., Souza M. C. et al. Biofilm production by multi-resistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015; 110 (2): 242-8. DOI: 10.1590/0074-02760140373.
12. Gupta R., Popli T., Ranchal P., Khosla J., Aronow W.S., Frishman W.H. et al. *Corynebacterium jeikeium* endocarditis: a review of the literature. *Cardiology in Review Journal.* 2021; 29 (5): 259-62. DOI: 10.1097/CRD.0000000000000355.
13. Marino A., Campanella E., Stracquadanio S., Ceccarelli M., Zagami A., Nunnari G. et al. *Corynebacterium striatum* bacteremia during SARS-CoV2 infection: case report, literature review, and clinical considerations. *Infectious Disease Reports.* 2022; 14 (3): 383-90. DOI: 10.3390/idr14030042.
14. Kargaltseva N.M., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Kocherovets V.I., Pimenova A.S., Gadua N.T. Bloodstream infection in hospital therapeutic patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2022; 67 (6): 355-61. (in Russian)
15. Möller J., Busch A., Berens C., Hotzel H., Burkovski A. Newly isolated animal pathogen *Corynebacterium silvaticum* is cytotoxic to human epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22 (7): 3549. DOI: 10.3390/ijms22073549.
16. Aygun G., Midilli K., Cilingir H., Yilmaz M., Kutuksu A., Eker E. A fatal case of urosepsis due to *Corynebacterium riegelii*. *Braz. J. Microbiol.* 2013; 44 (2): 475-6. DOI: 10.1590/S1517-83822013000200022.
17. Sanitary rules and regulations 3.3686-21 "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases" (Resolution of the Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation N 4 dated January 28, 2021). (in Russian)
18. Ott L., Höller M., Rheinlaender J., Schäffer T.E., Hensel M., Burkovski A. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. *BMC Microbiology.* 2010; 10: 257. DOI: 10.1186/1471-2180-10-257.
19. Materials of the European Committee for the determination of susceptibility to AMPs (EUCAST, 2021). <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>.
20. Omelchenko V.P., Demidova A.A. Informatics, medical informatics, statistics. Moscow: GEOTAR-Media; 2021. (in Russian)
21. Diez-Aguilar M., Ruiz-Garbjosa P., Fernandez-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C. et al. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* 2013; 32 (6): 769-71. DOI: 10.1007/s10096-012-1805-5.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Челпаченко О.Е.¹, Данилова Е.И.², Перунова Н.Б.¹, Иванова Е.В.^{1,2}, Никифоров И.А.¹, Чайникова И.Н.^{1,2}, Бекпергенова А.В.¹, Бондаренко Т.А.¹

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ КОПРОШТАММОВ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКОГО АРТРИТА

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460000, Оренбург, Россия;

² ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», Минздрава РФ, 460000, Оренбург, Россия

На основе проведенного клинико-микробиологического мониторинга двух групп детей от 3 до 17 лет с острым ($n=78$) и хроническим ($n=46$) течением реактивного артрита (РеА) разработан способ ранней диагностики хронического артрита путем определения количества антибиотикорезистентных копроштаммов у больных РеА, отличающийся отсутствием необходимости выделения чистой культуры возбудителя и ее идентификации; высевом фекалий в разведении 10^{-5} на твердый 1,5% ГРМ-агар с антибактериальным препаратом, использованным в лечении конкретного больного, в минимальной подавляющей концентрации в диапазоне устойчивости с последующим инкубированием и подсчетом выросших на чашке колоний микроорганизмов. Выявлена достоверная связь количества антибиотикорезистентных копроштаммов с течением артрита (острое, хроническое), а также определено пограничное значение количества антибиотикорезистентных копроштаммов – 5×10^3 КОЕ/г, позволяющее дифференцировать острое течение от хронического: при остром течении $< 5 \times 10^3$ КОЕ/г, при хроническом – $\geq 5 \times 10^3$ КОЕ/г. Метод позволяет на этапе завершения противовоспалительной терапии в активную фазу болезни выделить среди больных РеА группу риска по развитию хронического течения артрита, что может способствовать проведению своевременных лечебных мероприятий, направленных на предупреждение рецидивов болезни и инвалидизации больного.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность; копроштаммы; реактивный артрит; хроническое течение; ранняя диагностика.

Для цитирования: Челпаченко О.Е., Данилова Е.И., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Никифоров И.А., Чайникова И.Н., Бекпергенова А.В., Бондаренко Т.А. Количественный метод определения антибиотикорезистентных копроштаммов для ранней диагностики хронического артрита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 525-529.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-525-529>

Для корреспонденции: Бекпергенова Анастасия Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. инфекционной симбиологии; e-mail: nsavasteeva@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.04.2022

Принята к печати 11.04.2022

Опубликовано 12.09.2022

Chelpachenko O.E.¹, Danilova E.I.², Perunova N.B.¹, Ivanova E.V.^{1,2}, Nikiforov I.A.¹, Chainikova I.N.^{1,2}, Bekpergenova A.V.¹, Bondarenko T.A.¹

QUANTITATIVE METHOD FOR THE DETERMINATION OF ANTIBIOTIC-RESISTANT GUT BACTERIAL STRAINS FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF CHRONIC ARTHRITIS

¹ Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Department of the Russian Academy of Sciences, 460000, Orenburg, Russia;

² Orenburg State Medical University, 460000, Orenburg, Russia

Based on the clinical and microbiological monitoring of two groups of children aged 3 to 17 years with acute ($n=78$) and chronic ($n=46$) course of reactive arthritis (ReA), a method for early diagnosis of chronic arthritis was developed by determining the number of antibiotic-resistant coprostrains in patients with ReA, characterized by the absence of the need to isolate a pure culture of the pathogen and its identification; inoculation of faeces at a dilution of 10^{-5} on solid 1.5% GRM-agar with an antibacterial agents used in the treatment of a particular patient, at a minimum inhibitory concentration in the resistance range, followed by incubation and counting of the colonies of microorganisms grown on the plate. A significant relationship between the number of antibiotic-resistant gut bacterial strains and the course of arthritis (acute, chronic) was revealed, and the borderline value of the number of antibiotic-resistant gut bacterial strains was determined – 5×10^3 CFU/g, which allows differentiating the acute course from the chronic one: in the acute course $< 5 \times 10^3$ CFU/g, with chronic – $\geq 5 \times 10^3$ CFU/g. The method allows, at the stage of completion of anti-inflammatory therapy in the active phase of the disease, to identify a risk group for the development of a chronic course of arthritis among patients with ReA, which can contribute to timely therapeutic measures aimed at preventing recurrence of the disease and making the patient disabled.

Key words: antibiotic resistance; gut bacterial strains; reactive arthritis; chronic course; early diagnosis.

For citation: Chelpachenko O.E., Danilova E., Perunova N.B., Ivanova E.V., Nikiforov I.A., Chainikova I.N., Bekpergenova A.V., Bondarenko T.A. Quantitative method for the determination of antibiotic-resistant gut bacterial strains for the early diagnosis of chronic arthritis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 525-529 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-525-529>

For correspondence: Bekpergenova Anastasia Vladimirovna, PhD, Senior Researcher Laboratory of Infectious Symbiology; e-mail: nsavasteeva@gmail.com

Information about authors:

Chelpachenko O.E., <https://orcid.org/0000-0002-6719-5805>;
Danilova E.I., <https://orcid.org/0000-0003-0910-6525>;
Perunova N.B., <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>;
Ivanova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>;
Nikiforov I.A., <https://orcid.org/0006-0002-1470-9083>;
Chainikova I.N., <https://orcid.org/0000-0002-8923-8829>;
Bekpergenova A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5020-2493>;
Bondarenko T.A., <https://orcid.org/0000-0001-5186-6865>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 06.04.2022

Accepted 11.04.2022

Published 00.09.2022

Введение. Антибиотикорезистентность микроорганизмов в настоящее время является не только важной медицинской, но и социально-экономической проблемой. Инфекции, вызванные антибиотикоустойчивыми штаммами микроорганизмов, отличаются более длительным течением, чаще требуют госпитализации, повышают риск летальности [1]. В то же время, наряду с патогенами, мишенью при антибактериальной терапии является и кишечная микробиота – наибольший резервуар микробиома человека. Известно, что именно изменение кишечного микробиома с развитием дисбиоза дистального отдела толстого кишечника выполняет роль одного из важных факторов, ведущих к ряду соматических и ментальных заболеваний [2 – 4]. Данный феномен актуален, в том числе, и для развития воспалительных заболеваний суставов, среди которых самой частой патологией являются артриты, связанные с инфекцией (реактивный и инфекционный артриты). Концепция о роли нарушений микробиоты кишечника в развитии артрита анализируется в работах ряда исследователей, показавших, что эубиоз кишечника поддерживает полноценное морфо-функциональное состояние суставов. Напротив, нарушения кишечного микробиоценоза являются одним из важных патогенетических звеньев, способствующих формированию артрита [5–8]. Последнее десятилетие характеризуется ростом числа грамотрицательных условно-патогенных энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и т.д.), отличающихся множественной устойчивостью к антимикробным препаратам [9 – 11] и являющихся микроорганизмами с доказанными «артритогенными» свойствами ввиду высокого сродства к HLA-B27 антигену и способности к феномену перекрестной «молекулярной мимикрии» [12]. Необходимо отметить, что высокая частота встречаемости перехода острого артрита в хронический (до 75%), а также связь реактивного артрита (РеА) с выполняющим триггерную роль микробным фактором, диктуют необходимость включения антибактериальных препаратов (АБП) в комплекс лечебных мероприятий. Однако, использование антибиотиков ведет к «параллельному ущербу», который заключается в селекции полирезистентных микроорганизмов и влиянии не только на штаммы возбудителей заболевания, но и на микроорганизмы, не являющиеся этиологически значимыми, в первую очередь, на кишечную микробиоту [13, 14].

Целью нашего исследования явилась разработка количественного теста определения антибиотикорезистентных копроштаммов у больных с реактивным артритом для ранней диагностики хронического течения заболевания.

Материал и методы. Микробиологические исследования проводились на базе лаборатории инфекци-

онной симбиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН. Клинический отбор детей с реактивным артритом, а также формирование исследуемых групп осуществлялись на базе отделения кардиоревматологии детского стационара городской клинической больницы № 6 г. Оренбурга с 2017 по 2019 гг. При поступлении детей в отделение кардиоревматологии, законные представители пациента (мать, отец, опекун) были ознакомлены и расписывались в документе об информированном добровольном согласии на медицинское вмешательство в соответствии с главой 4 Федерального закона от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», которое включало добровольное согласие на проведение необходимых клинических и лабораторных методов исследования, в том числе бактериологических и иммунологических методов.

Диагноз реактивного артрита выставляли в соответствии с критериями, представленными в Федеральных клинических рекомендациях по оказанию медицинской помощи детям с реактивным артритом (2015). Проведен клинико-микробиологический мониторинг групп детей в возрасте от 3-х до 17 лет с острым ($n=78$) и хроническим ($n=46$) течением РеА. Группы были репрезентативны по полу и возрасту.

Независимо от течения артрита (острое, хроническое), забор фекалий на бактериологическое исследование кишечной микробиоты проводили в активную фазу заболевания после окончания курса антибактериальной терапии. Исследование микробиоценоза кишечника осуществлялось в соответствии с Методическими рекомендациями «Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» (№ 10-11/31 14.04.1986 г.). Оценка состояния кишечного микробиоценоза по степеням проводилась в соответствии с Отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (приказ Минздрава РФ № 231 от 09.06.2003 г.). Идентификацию выделенных штаммов микроорганизмов проводили на основании морфологических, культуральных, биохимических свойств. Выделение и идентификацию анаэробных микроорганизмов проводили в соответствии с руководством «Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual» (2002). Биохимический профиль факультативно-анаэробных микроорганизмов оценивали с помощью коммерческих тест-систем: «ENTEROtest 24», «STREPTOtest 16», «STAPHYtest 16» (Lachema, Чехия) и «API20CAUX» (bioMérieux, Франция).

Определение количества антибиотикорезистентных копроштаммов, по разработанному нами способу, про-

водили следующим образом. В активную фазу болезни, после завершения курса антибактериальной терапии у пациента с артритом производили забор кала в количестве 1 г в стерильные контейнеры. Транспортировка в лабораторию осуществлялась в течение 2-х часов после забора. Далее готовили разведения антибактериального препарата, который использовался в лечении данного конкретного больного. Для этого определяли величину МПК антибиотиков (в мкг/мл) в диапазоне устойчивости в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий в соответствии с критериями Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; (2017, 2018, 2019 гг.).

Например, если больному проводили лечение ампициллином, то, в соответствии с вышеупомянутыми стандартами, использовали МПК ампициллина в диапазоне устойчивости, которая составляет 32 мкг/мл. Для приготовления разведения ампициллина в указанной концентрации, во флакон с сухим веществом антибактериального препарата вводили 10 мл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия, брали микропипеткой 64 мкл полученного раствора и смешивали со 100 мл готового расплавленного до 37°C 1,5% ГРМ-агара, тщательно перемешивали полученную среду и разливали на чашки Петри. Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливали на строго горизонтальную поверхность, глубина агарового слоя в чашке составляла 3–4 мм. После заполнения чашки оставляли при комнатной температуре для застывания и подсушивания на 10-15 мин (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019).

На следующем этапе готовили разведение фекалий 10^{-5} в 0,9% физиологическом растворе хлорида натрия. Для этого помещали 1 г фекалий в пробирку № 1 и добавляли 9,0 мл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия. Брали 0,1 мл суспензии из пробирки № 1 и вносили в пробирку № 2, смешивали с 9,9 мл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия. Затем, брали 0,1 мл суспензии из пробирки № 2 и вносили в пробирку № 3, смешивали с 9,9 мл 0,9% физиологического раствора хлорида натрия и получали разведение фекалий 10^{-5} .

Исследуемое разведение (10^{-5}) в объеме 0,1 мл высевали на чашку Петри с 1,5% ГРМ-агаром и антибактериальным препаратом, применяемым при лечении данного больного, в минимальной подавляющей концентрации в диапазоне устойчивости. Инокулят растирали шпателем равномерно по всей поверхности чашки. Чашки инкубировали в термостате в течение 24-х часов при температуре 37° С, после чего проводили подсчет выросших на чашке колоний микроорганизмов (КОЕ/г).

Полученные результаты были статистически обработаны с помощью программного обеспечения STATISTICA 10 (модуль Classification Tree). При построении дерева решений (ДР) учитывались такие критерии, как

течение болезни (острое, хроническое) и количество колоний копроштаммов после лечения АБП.

Результаты. При проведении исследования состояния кишечного микробиоценоза классическим бактериологическим методом у подавляющего большинства детей с РеА ($96,0 \pm 1,2\%$) выявлены дисбиотические нарушения дистального отдела толстого кишечника, как при остром, так и при хроническом течении болезни [17]. В активную фазу артрита после окончания курса антибактериальной терапии проводили определение количества антибиотикорезистентных копроштаммов, предложенным нами методом. Результаты проведенных исследований представлены в таблице.

Представленные в таблице данные демонстрируют наличие роста антибиотикорезистентных колоний у всех больных с хроническим течением артрита. В то же время, у большинства больных с острым течением РеА ($96,2 \pm 2,2\%$) рост колоний определялся на уровне менее 5×10^3 КОЕ/г.

Для решения вопроса о статистически достоверной связи количества антибиотикорезистентных копроштаммов с течением артрита (острое или хроническое), а также для определения пограничного уровня обсемененности, который позволял бы дифференцировать острое течение от хронического, мы использовали метод автоматического анализа данных «Classification Tree». Архитектура многоуровневого дерева решений позволила выявить зависимость течения заболевания от количества антибиотикорезистентных копроштаммов и установить показатель, соответствующий 5×10^3 КОЕ/г, который четко разделил исследуемый контингент больных на две группы по течению артрита (острое и хроническое).

Полученные результаты демонстрируют, что при остром течении артрита у подавляющего большинства больных ($96,2 \pm 2,2\%$) отмечается рост колоний микроорганизмов при посеве фекалий на 1,5% ГРМ-агар с антибактериальным препаратом в количестве менее 5×10^3 КОЕ/г, и лишь у 3,8% детей определяется рост колоний в количестве более 5×10^3 КОЕ/г. Напротив, у всех больных с хроническим течением РеА количество выросших колоний микроорганизмов оказалось равным или более 5×10^3 КОЕ/г.

Таким образом, при выявлении колоний микроорганизмов в количестве меньше 5×10^3 КОЕ/г можно прогнозировать благоприятный исход артрита (выздоровление), в то время как количество, равное или больше 5×10^3 КОЕ/г, указывает на неблагоприятный исход (рецидивирование, хронизация).

Обсуждение. Клинико-микробиологическое обследование детей с реактивным артритом и проведенный дискриминантный анализ с использованием классификационного дерева решений позволили определить

Зависимость количества антибиотикорезистентных копроштаммов микроорганизмов, выросших на среде с антибактериальным препаратом, от течения заболевания

Течение артрита	Число больных (n=124)	Количество выросших колоний на 1,5% ГРМ-агаре с антибактериальным препаратом (КОЕ/г):			
		< 5×10^3		$\geq 5 \times 10^3$	
Острое течение	78	75	$96,2\% \pm 2,2$	3	$3,8\% \pm 2,2$
Хроническое течение	46	0	0	46	100%

Примечание. n - абсолютное число пациентов; % - относительное количество пациентов; КОЕ/г – колониеобразующие единицы на 1 грамм фекалий.

связь между количеством антибиотикорезистентных копроштаммов, выделенных от больных РеА, и течением артрита (острое или хроническое). Выявлено пограничное значение количества копроштаммов, позволяющее дифференцировать больных с острым и хроническим течением артрита, которое соответствует 5×10^3 КОЕ/г. Следовательно, количество антибиотикорезистентных колоний кишечных микросимбионтов является микробиологическим маркером, который можно использовать для ранней диагностики хронического артрита.

Основой для разработки нашего способа определения количества антибиотикорезистентных копроштаммов у больных с РеА явился метод серийных разведений в агаре [15]. Отличия нашего метода включают следующие моменты: 1. способ не предполагает выделение чистой культуры возбудителя и его идентификации; 2. для бактериологического посева использовали разведение фекалий 10^{-5} , посев которых производили на твердый 1,5% ГРМ-агар, в который вводился антибактериальный препарат (АБП), использованный в лечении конкретного больного, в минимальной подавляющей концентрации (МПК) в диапазоне устойчивости с последующим инкубированием и подсчетом выросших на чашке колоний микроорганизмов [16]. Величину МПК антибиотиков (в мкг/мл) в диапазоне устойчивости в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий определяли в соответствии со стандартами эффективности тестирования на чувствительность к противомикробным препаратам (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017, 2018, 2019 гг.).

Полученные результаты согласуются с гипотетической моделью развития артрита [5, 18], предполагающей участие кишечной микробиоты в инициации и прогрессировании заболевания [19–21], а также свидетельствуют об этиологической и патогенетической значимости кишечного дисбиоза человека в качестве одного из факторов, определяющих характер течения реактивного артрита.

Необходимо отметить, что правомерность разработанного способа подтверждается проведенными ранее исследованиями, основанными на принципе клонального анализа, свидетельствующими об изменении структуры популяции микроорганизмов за счет снижения их персистентного адаптационного потенциала с последующей элиминацией под воздействием антибактериальных препаратов [22, 23].

Заключение. Полученные данные свидетельствуют, что представленный метод ранней диагностики хронического течения артрита позволяет на этапе завершения противовоспалительной терапии в активной фазе болезни выделить среди больных РеА группу риска по развитию хронического течения артрита. Применение предложенной методики в условиях первичного звена здравоохранения, может служить дополнительным тестом для выбора пациентов, которым особенно необходимо своевременно проводить лечебные мероприятия, направленные на предупреждение рецидивов болезни и инвалидизации больного.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3 – 8, 12, 18–22 см. REFERENCES)

1. Яковлев С.В. Новая концепция рационального применения антибиотиков в амбулаторной практике. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; 64:47-57. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-10017.

2. Намазова-Баранова Л.С., Баранов А.А. Антибиотикорезистентность в современном мире. *Педиатрическая фармакология*. 2017; 14(5):341-54. DOI: 10.15690/pf.v14i5.1782.
9. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Шайдуллина Э.Р., Азизов И.С. с соавт. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16:254-65. DOI: 10.36488/смач.2019.2.147-159.
10. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е., Шляхто Е.В. Продукция карбопенемаз нозокомиальными штаммами *K. pneumoniae* в Санкт-Петербурге. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016; 18:196-200.
11. Гордinskaya Н.А., Бруснигина Н.Ф., Алексеева А.Е., Солнцев Л.А., Савочкина Ю.А., Сабирова Е.В. и др. Молекулярная характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в травматологических стационарах. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(3):243-6.
13. Руина О.В., Васильева Н.П., Сухачева Н.Н., Коньшклина Т.М., Саперкин Н.Н., Чуева Т.О. и др. Микробиологический мониторинг в многопрофильном стационаре и пути оптимизации затрат на антибактериальные препараты. *Медицинский альманах*. 2013; 5(29):187-90.
14. Назарчук А.А., Фаустова М.А., Колодий С.А. Микробиологическая характеристика инфекционных осложнений, актуальные аспекты их профилактики и лечения у хирургических пациентов. *Новости хирургии*. 2019; 27(3):318-27. DOI: 10.18484/2305-0047.2019.3.318.
15. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I. Лабинская А.С., Волина Е.Г., ред. М.: БИНОМ; 2008.
16. Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Данилова Е.И., Никифоров И.А. и др. Способ прогнозирования исхода реактивных и инфекционных артритов. Патент РФ № 2607375; 2017.
17. Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Данилова Е.И., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. и др. Микросимбиоз кишечника у детей с реактивным артритом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 6: 41-8. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-41-48.
23. Кириллов Д.А., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Челпаченко О.Е., Паньков А.С., Смолягин А.И., Вальшев А.В. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на биологические свойства микроорганизмов. *Журнал микробиологии*. 2003; 4: 74-8. 23.

REFERENCES

1. Yakovlev S.V. A new concept for the rational use of antibiotics in outpatient practice. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2019; 64:47-57. (in Russian)
2. Namazova-Baranova L.S., Baranov A.A. Antibiotic resistance in the modern world. *Pediatricskaya farmakologiya*. 2017; 14(5):341-54. (in Russian)
3. Meropol S.B., Haupt A.A., Debanne S.M. Incidence and outcomes of infections caused by multidrug-resistant enterobacteriaceae in children, 2007-2015. *J. Pediatric infectious diseases society*. 2018; 7(1):36-45. DOI: 10.1093/jpids/piw093.
4. Yoo J.Y., Groer M., Dutra S.V.O., Sarkar A., McSkimming D.I. Gut microbiota and immune system interactions. *Microorganisms*. 2020; 8(10): 1587. DOI: 10.3390/microorganisms8101587.
5. Yeoh N., Burton J.P., Suppiah P., Reid G., Stebbings S. The role of the Microbiome in Rheumatic Diseases. *Curr. Rheumatol. Rep*. 2013; 15:314. DOI: 10.1007/s11926-012-0314-y.
6. Jethwa H., Abraham S. The evidence for microbiome manipulation in inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2017; 56(9):1452-60. DOI: 10.1093/rheumatology/kew374.
7. De Luca F., Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clinical and experimental immunology*. 2019; 195(1): 74–85. DOI: 10.1111/cei.13158.
8. Vural M., Gilbert B., Üstün I., Caglar S., Finckh A. Mini-review: human microbiome and rheumatic diseases. *Frontiers in cellu-*

- lar and infection microbiology. 2020; 10:491160. DOI: 10.3389/fcimb.2020.491160.
9. Sukhorukova M.V., Eidel'shtein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Shaidullina E.R., Azizov I.S. et al. Antibiotic resistance of nosocomial strains of *Enterobacteriaceae* in Russian hospitals: results of the MARATHON multicenter epidemiological study in 2011-2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya I antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16:254-65. (in Russian)
 10. Barantsevich E.P., Barantsevich N.E., Shlyakhto E.V. Production of carbopenemase by nosocomial strains of *K. pneumoniae* in St. Petersburg. *Klinicheskaya mikrobiologiya I antimikrobnaya khimioterapiya*. 18:196-200. (in Russian)
 11. Gordinskaya N.A., Brusnigina N.F., Alekseeva A.E., Solntsev L.A., Savochkina Yu.A., Sabirova E.V. et al. Molecular characteristics of antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated in trauma hospitals. *Klinicheskaya mikrobiologiya I antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(3):243-6. (in Russian)
 12. Tian P., Li B., He C., Song W., Hou A., Tian S. et al. Antidiabetic (type 2) effects of *Lactobacillus* G15 and Q14 in rats through regulation of intestinal permeability and microbiota. *Food Funct*. 2016; 7:3789-97. DOI: 10.1039/c6fo00831c.
 13. Ruina O.V., Vasil'yeva N.P., Sukhacheva N.N., Konyshkina T.M., Saperkin N.N., Chueva T.O. et al. Microbiological monitoring in a multidisciplinary hospital and ways to optimize the cost of antibacterial drugs. *Meditinskiy al'manakh*. 2013; 5(29):187-90. (in Russian)
 14. Nazarchuk A.A., Faustova M.A., Kolodiy S.A. Microbiological characteristics of infectious complications, topical aspects of their prevention and treatment in surgical patients. *Novosti khirurgii*. 2019; 27(3):318-27. (in Russian)
 15. Guide to medical microbiology. General and sanitary microbiology. Book I. Labinskaya A.S., Volina E.G., eds. Moscow: BINOM; 2008. (in Russian)
 16. Bukharin O.V., Chelpachenko O.E., Perunova N.B., Ivanova E.V., Danilova E.I., Nikiforov I.A. et al. A method for predicting the outcome of reactive and infectious arthritis. Patent RF No. 2607375; 2017. (in Russian)
 17. Bukharin O.V., Chelpachenko O.E., Danilova E.I., Chainikova I.N., Perunova N.B., Ivanova E.V. Intestinal microsymbiocenosis in children with reactive arthritis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii I immunobiologii*. 2016; 6: 41-8. (in Russian)
 18. Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C.M., Finlay B.B. Gut microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev*. 2010; 90:859-904. DOI: 10.1152/physrev.00045.2009.
 19. Gill T., Asquith M., Rosenbaum J.T., Colbert R.A. The intestinal microbiome in spondyloarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol*. 2015; 27(4):319-25. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000187.
 20. Manasson J., Shen N., Garcia Ferrer H.R., Ubeda C., Iraheta I., Heguy A. et al. Gut Microbiota Perturbations in Reactive Arthritis and Postinfectious Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2018; 70(2):242-54. DOI: 10.1002/art.40359.
 21. Mauro D., Ciccio F. Gut dysbiosis in Spondyloarthritis: Cause or effect? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2019; 33(6):101493. DOI: 10.1016/j.berh.2020.101493.
 22. Lederberg J., McCray A.T. 'Ome Sweet 'Omics – a genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001; 15:8.
 23. Kirillov D.A., Chainikova I.N., Perunova N.B., Chelpachenko O.E., Pankov A.S., Smolyagin A.I., Valyshev A.V. Influence of the immunomodulator polyoxidonium on the biological properties of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii*. 2003; 4:74-8. (in Russian)

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Останкова Ю.В.¹, Серикова Е.Н.¹, Семенов А.В.², Тотолян Арег А.¹

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В ПРИ НИЗКОЙ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКЕ НА ОСНОВЕ ГНЕЗДОВОЙ ПЦР С ДЕТЕКЦИЕЙ ПО ТРЕМ ВИРУСНЫМ МИШЕНЯМ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, 197191, Санкт-Петербург, Россия;

² ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 620030, Екатеринбург, Россия

Разработан способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени. При разработке метода использованы образцы плазмы крови 128 больных ХГВ, проживающих в регионах РФ и странах средней Азии и 173 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО. ВГВ выявляли методом «гнездовой» ПЦР. Аналитическую чувствительность проверяли методом поэтапного разведения. Согласно разработанному нами методу, на первом этапе осуществляли амплификацию ДНК ВГВ с использованием олигонуклеотидов, комплементарных областям наибольшего сходства геномов различных изолятов ВГВ, фланкирующих полный геном вируса. На втором этапе при использовании в качестве матрицы продукта амплификации первого этапа, проводили ПЦР с применением трех пар олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов к трем регионам (ген Core, ген S и ген X) генома вируса, а также одной пары праймеров и соответствующего зонда комплементарных участку гена человека HPRT. Чувствительность метода при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы составила 10 МЕ/мл, получение порогового цикла Ct только по одному флуорофору может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл, выявление ВГВ при этом возможно при повторном ПЦР-исследовании соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл). Разработанный способ позволяет идентифицировать заболевание при различных суб-генотипах ВГВ и может быть использован для диагностики ХГВ в популяции и группах риска, в том числе при HBsAg-негативной форме заболевания.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В; скрытый гепатит В; низкая вирусная нагрузка; метод идентификации, диагностика.

Для цитирования: Останкова Ю. В., Серикова Е.Н., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 530-537.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537>

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. иммунологии, зав. лаб. иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции; e-mail: shennal@yandex.ru

Финансирование. Отраслевая НИР «Парентеральные вирусные гепатиты: скрытая форма хронических гепатитов В и С при моно- и коинфекции в популяции и в группах риска, а также в зависимости от генетического полиморфизма генов хозяина» № АААА-А21-121021600219-5.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.05.2022

Принята к печати 06.06.2022

Опубликовано 12.09.2022

Ostankova Yu. V.¹, Serikova E. N.¹, Semenov A. V.², Totolian Areg A.¹

METHOD FOR HEPATITIS B VIRUS DNA DETECTING IN BIOLOGICAL MATERIAL AT LOW VIRAL LOAD BASED ON NESTED PCR WITH DETECTION ON THREE VIRAL TARGETS IN REAL-TIME MODE

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

² SRC VB «Vector» of Rospotrebnadzor, 620030, Ekaterinburg, Russia

A method has been developed for HBV DNA finding in biological material at low viral load based on nested PCR with real-time detection of three viral targets. When developing the method, blood plasma samples were used from 128 CHB patients living in the regions of the Russian Federation and countries of Central Asia and 173 hemodialysis center patients living in the North-West Federal District. Analytical sensitivity was tested using the stepwise dilution method. HBV was detected by nested PCR. According to the method developed by us, at the first stage, the HBV DNA is amplified using at the first stage oligonucleotides complementary to the greatest similarity regions of the various HBV isolates genomes flanking the entire virus genome. At the second stage, when using the amplification product of the first stage as a template, PCR was performed using three pairs of oligonucleotides and the corresponding oligonucleotide fluorescently labeled probes to three virus genome regions (Core gene, S gene and X gene), as well as one pair of primers and the corresponding probe complementary to a human HPRT gene region. The method sensitivity for DNA extraction from plasma with a 100 µl volume was 10 IU/ml. Obtaining a threshold Ct cycle for only one fluorophore may indicate the presence of HBV DNA in the sample at a load of less than 10 IU/ml, HBV detection in this case is possible with a repeated

PCR study of the corresponding sample with HBV DNA extraction from an increased plasma volume (200-1000 µl). The developed method makes it possible to identify the disease in various HBV subgenotypes and can be used to diagnose CHB in the population and risk groups, including those with the HBsAg-negative form of the disease.

Key words: *chronic hepatitis B; occult hepatitis B; low viral load; identification method, diagnostics.*

For citation: Ostankova Yu. V., Serikova E.N., Semenov A. V., Totolian Areg A. Method for hepatitis B virus DNA detecting in biological material at low viral load based on nested PCR with detection on three viral targets in real-time mode. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 530-537 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537>

For correspondence: Ostankova Yu. V., PhD senior researcher at the Laboratory of Molecular Immunology, Head at the Laboratory of Virology and Immunology HIV Infection; e-mail: shennal@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu. V. <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>;

Serikova E.N. <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>;

Semenov A.V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>;

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *Branch research work «Parenteral viral hepatitis: occult form of chronic hepatitis B and C with mono- and coinfection in the population and in risk groups, as well as depending on the genetic polymorphism of the host's genes».*

Received 06.05.2022

Accepted 06.06.2022

Published 12.09.2022

Введение. Вирус гепатита В (ВГВ) является самым распространенным гепатотропным вирусом, способным приводить как к острой, так и хронической форме заболевания. К концу 2019 г., по оценкам всемирной организации здравоохранения, примерно 296 млн человек, или 3,5% населения мира, были больны хроническим вирусным гепатитом В (ХГВ), причем полтора миллиона из них были инфицированы в 2019 г. [1].

Поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) остается основой для диагностики острой и хронической инфекции, для скрининга крови и продуктов крови, а также для определения эффективности лечения и ответа на противовирусную терапию. Отличительной чертой инфекции, вызванной ВГВ, является большое количество субвирусных частиц, содержащих HBsAg, но не содержащих ДНК вируса, причем количество это может широко варьировать в зависимости от фазы инфекции [2]. Распространенность ХГВ в разных регионах мира оценивается по частоте встречаемости HBsAg среди населения, различается в зависимости от географического региона, а также определяет возможные пути передачи. Так, в Российской Федерации показана умеренная (2-7%) распространенность ХГВ. Долгосрочный анализ заболеваемости на территории РФ острым гепатитом В (ОГВ) показал значительное снижение ее уровня. Несмотря на это, отмечена значительная тенденция к росту заболеваемости ХГВ как в среднем по стране, так и в Северо-Западном федеральном округе [3].

Одной из естественных форм течения заболевания является HBsAg-негативный (скрытый) ХГВ. Скрытый гепатит В (СкГВ) определяют, как стадию заболевания, при которой в ткани печени обнаруживают ДНК ВГВ при неопределяемом уровне HBsAg в сыворотке периферической крови, вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом ПЦР в периферической крови [4]. Хотя элиминации вируса при СкГВ не происходит, репликация вируса и экспрессия его генов в большинстве случаев подавлены, а из-за крайне низкой вирусной нагрузки выявление вируса стандартными методами осуществить не удается [5]. Исходя из вышесказанного, оценка распространенности ХГВ в популяциях разных стран и регионов в целом, как и в группах риска, в част-

ности, ошибочна за счет остающихся не выявленными случаев HBsAg-негативного заболевания. Для увеличения диагностической достоверности определения ХГВ необходимо одновременное выявление скрытой формы заболевания.

Как известно, на ранних этапах развития ХГВ клиническая симптоматика может быть крайне ограничена или отсутствовать вовсе. В то же время, несмотря на низкую вирусную нагрузку, при СкГВ сохраняются те же факторы риска, что и при HBsAg-позитивной форме течения заболевания. Так, например, показано, что у 70% HBsAg-негативных пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой выявляли СкГВ, что свидетельствует о значимости его роли в развитии заболевания [6]. Кроме того, иммуносупрессия у пациентов с HBsAg-негативным ХГВ может приводить к реактивации как у моноинфицированных больных, так и у лиц с коинфекцией ВГВ + ВИЧ, ВГВ + ВГС, ВГВ + ВГД. Таким образом, ранняя лабораторная диагностика ХГВ в целом, как и проблема совершенствования средств диагностики HBsAg-негативного ХГВ, остается крайне актуальной для здравоохранения.

«Золотым стандартом» диагностики СкГВ является обнаружение в тканях печени способной к репликации ДНК ВГВ. Однако использование инвазивной диагностики недоступно при скрининге групп риска, тестировании доноров крови и других популяционных исследованиях. Применение инвазивной диагностики возможно только в качестве дополнительного метода в случаях, когда пункционная биопсия печени осуществляется по клиническим показаниям. Согласно международным рекомендациям, для достоверного выявления СкГВ необходимо применение nested-ПЦР вкупе с обнаружением не менее чем двух различных областей вирусного генома. Важно при этом, чтобы анализ был одинаково эффективен для различных генотипов и субгенотипов вируса [7].

Разработанный нами ранее метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови позволяет обнаруживать вирус при низкой вирусной нагрузке, согласно вышеупомянутым рекомендациям [8], однако высокая гетерогенность вируса и низкая вирусная нагрузка могут при-

водить к тому, что тот или иной целевой регион вируса не будет выявлен, а отсутствие внутреннего контроля не позволит определить ложноотрицательный результат анализа. В связи с этим представляется очевидным необходимость разработать способ, включающий амплификацию трех регионов генома ВГВ, а также амплификацию фрагмента одного из генов домашнего хозяйства человека в качестве внутреннего контроля.

Целью нашей работы являлось: разработать способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени.

Материал и методы. В работе были использованы образцы плазмы крови, полученные от 128 больных ХГВ, проживающих в регионах РФ и странах Средней Азии, уровень кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК в печени которых был нами описан ранее [9] и 173 пациентов гемодиализного центра, проживающих в СЗФО.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции производителя. Вирусную нагрузку в плазме крови предварительно измеряли с помощью стандартизированного набора для количественного определения ДНК ВГВ в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции.

Качественное определение ДНК вируса проводили двумя способами: методом ПЦР-РВ при помощи коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ эпидемиологии, Россия) в соответствии с инструкциями производителя, затем, при низкой вирусной нагрузке и/или отрицательном качественном результате,

полученном при использовании стандартизированного набора, проводили выявление методом nested-ПЦР с использованием олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов (табл. 1).

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 10 пМ каждого олигопраймера и 3 пМ каждого зонда, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НCl, (pH 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

На первом этапе ПЦР проводили с использованием прямого и обратного праймеров HBV long (см. табл. 1) при указанных параметрах амплификации (табл.2).

На следующем этапе в качестве матрицы использовали продукт амплификации первого этапа и проводили ПЦР с «вложенными» олигонуклеотидами и зондами, комплементарными трем регионам ВГВ, а также фрагменту ДНК гена человека HPRT, в одной пробирке – HBV SrtF, HBV SrtR, HBV Srt-Z, HBV XrtF, HBV XrtRd, HBV Xrt-Z, HBV CoreF, HBV CoreR, HBV Core-Z, HPRT F, HPRT R, HPRT-Z (см. табл. 1) – при указанных в табл. 3 параметрах амплификации.

Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализировали по четырем каналам. По трем каналам сигналы, относящиеся к вирусному геному: по каналу для флуорофора FAM – сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ Core-региона, по каналу для флуорофора HEX – о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ S-региона, по каналу для флуорофора ROX – о на-

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, использованные для выявления ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем мишеням в режиме реального времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность
HBV longF	5'- TTTTTCACCTCTGCCTAATCA - 3'
HBV longR	5' - AAAAAGTTGCATGRTGMTGG - 3'
HBV SrtF	5'- GATGTGTCTGCGGCGTTT - 3'
HBV SrtR	5'- GCAACATACCTTGATAGTCCAGAAGAA - 3'
HBV Srt-Z	5- HEX - CCTCTICATCCTGCTGCTATGCCTCA - BHQ1 - 3'
HBV XrtF	5'- GTCTGTGCCTTCTCATCTGCC - 3'
HBV XrtRd	5'- GTCGGTCGTTGACATTGCAG - 3'
HBV Xrt-Z	5'- ROX - TGTGCACTTCGCTTCACCTCTGC - BHQ2/RTQ2 - 3'
HBV CoreF	5'- TTCCGGAAACTACTGTTGTTAGAC - 3'
HBV CoreR	5'- ATTGAGATTCCTGAGATTGAGA - 3'
HBV Core-Z	5'- FAM - CCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGCCTC - BHQ1-3'
HPRT F	5'- CTGCTCGAGATGTGATGAAGG - 3'
HPRT R	5'- CAGCAGGTCAGCAAAGAATTTATAG - 3'
HPRT-Z	5'- Cy5 - ATCATTGTAGCCCTCTGTGTGCTCAAGG - RTQ2 - 3'

коплении продукта амплификации фрагмента ДНК ВГВ X-региона. И по одному каналу для флуорофора Cy5 регистрировали сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК человека высококонсервативного гена гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), выступающего в качестве эндогенного внутреннего контроля. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (устанавливается в середине линейного участка прироста флуоресценции положительного контроля в логарифмической шкале), что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы значения порогового цикла *Ct* в соответствующей графе в таблице результатов.

Для оценки применимости разработанного способа при выявлении ДНК ВГВ при пулировании были изготовлены минипулы. Минипулы готовили путем смешивания шести и десяти случайных образцов в одной 1,5 мл емкости/пробирке по 100 мкл каждого образца. Всего было изготовлено 30 минипулов, то есть 15 минипулов по шесть образцов и 15 минипулов по десять образцов. Анализ проводили слепым методом, при котором исполнитель не знал в какие минипулы входят те или иные образцы. Оценку проводили с использованием двух способов экстракции ДНК: в первом случае из минипула брали 100 мкл смешанной плазмы и проводили выделение ДНК, во втором случае выделение проводили из всего объема пулированной плазмы.

Для исключения контаминации в качестве дополнительного контроля секвенировали нуклеотидные последовательности генома вируса в выявленных ВГВ-позитивных образцах. Для получения полногеномной нуклеотидной последовательности вируса проводили асимметричную ПЦР с использованием протяжённых олигонуклеотидов, на втором этапе проводили ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и набором внутренних (гнездовых) перекрывающихся праймеров, совместно фланкирующих полный

геном ВГВ, как было показано ранее [10]. Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), продуктов секвенирующих реакций анализировали с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США). Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов осуществляли с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Используемые в рамках работы полные геномы ВГВ, полученные из HBsAg-негативных образцов с низкой вирусной нагрузкой, субгенотипов В2, В4, С1, С2, С3, С5, Е депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами ON402774-ON402785).

Результаты и обсуждение. На базе ранее предложенных нами методик был разработан способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени [8, 10].

Согласно разработанному нами способу, на первом этапе осуществляли амплификацию ДНК ВГВ с использованием олигонуклеотидов, комплементарных областям наибольшего сходства геномов различных изолятов ВГВ, фланкирующих полный геном вируса. На втором этапе при использовании в качестве матрицы продукта амплификации первого этапа, проводили ПЦР с применением трех пар олигонуклеотидов и соответствующих олигонуклеотидных флуоресцентно меченых зондов к трем регионам (ген Core, ген S и ген X) генома вируса, а также одной пары праймеров и соответствующего зонда комплементарных участку гена человека HPRT (см. табл.1). По каналам FAM, HEX, ROX и Cy5 детектировали продукты амплификации ДНК ВГВ Core, S, X-регионов и гена человека HPRT, соответственно (рис. 1).

Выделение и амплификацию ДНК образца считали успешными, если на канале Cy5 получено значение порогового цикла *Ct*. Образцы считали положительным по содержанию ДНК ВГВ, если на каналах FAM, HEX, ROX или любых двух из них получали значение порого-

Таблица 2

Параметры программы амплификации первого этапа на планшетном амплификаторе CFX96

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	5 мин	1
	95	20 с	
2	52	30 с	20
	72	3 мин 50 с	
3	72	7 мин	1
	95	20 с	
4	52	30 с	20
	72	3 мин 50 с	
5	72	7 мин	1
	95	20 с	
6	50	30 с	10
	72	3 мин 50 с	
7	72	7 мин	1
8	4	Хранение	

Таблица 3

Параметры программы амплификации второго этапа на планшетном амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США)

Цикл	Температура, °C	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	95	5 мин		1
	95	10 с		
2	50	20 с		7
	72	40 с		
3	72	5 мин		1
	95	10 с		
4	58	20 с	FAM, HEX, ROX, CY5	45
	72	40 с		
5	4	Хранение		

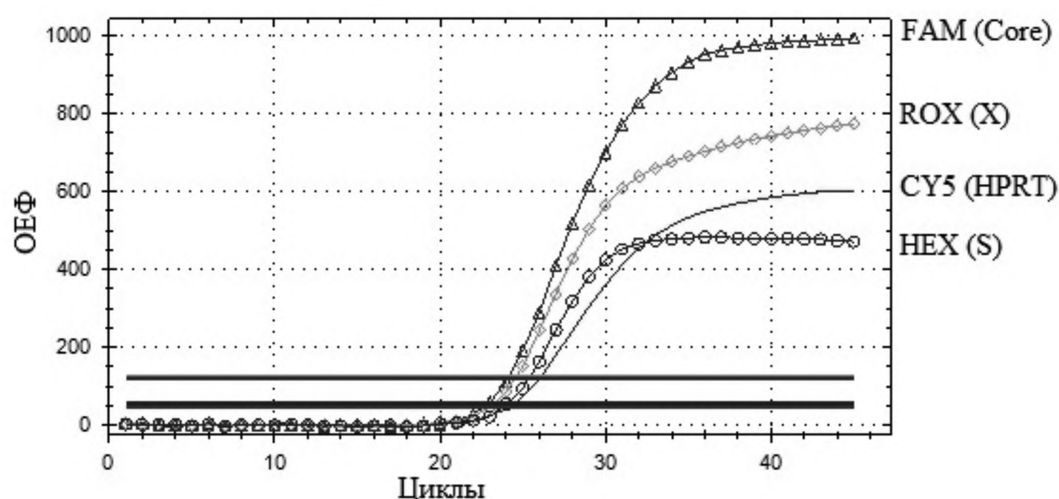


Рис. 1. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе второго этапа амплификации. ОЕФ — относительные единицы флуоресценции. Треугольниками обозначен сигнал флуорофора FAM, кружками — сигнал HEX, ромбами — сигнал ROX, представляющие собой результат амплификации трех регионов генома ВГВ (Core, S, X). Без дополнительных отметок — сигнал Cy5, представляющий собой результат амплификации гена человека HPRT, свидетельствующая об успешности экстракции ДНК и последующей амплификации.

вого цикла C_t при одновременном получении значения порогового цикла C_t на канале Cy5 и отрицательными — если на каналах FAM HEX, ROX отсутствовало значение C_t . Получение порогового цикла C_t на канале Cy5 при одновременном получении значения порогового цикла C_t только по одному флуорофору FAM, HEX или ROX может свидетельствовать о наличии ДНК ВГВ в образце в нагрузке менее 10 МЕ/мл. В этом случае рекомендуется повторное исследование соответствующего образца с экстракцией ДНК ВГВ из увеличенного объема плазмы (200-1000 мкл).

На втором этапе в работу вводили положительный контрольный образец, позволяющий оценить успешность амплификации, представляющий собой плазмиду, содержащую синтетические последовательности, соответствующие фрагментам трех целевых регионов ВГВ — Core, S, X.

Аналитическую чувствительность метода проверяли двумя способами с использованием двух видов анализируемых матриц. В первом случае были выбраны 10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГВ. Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГВ следующим образом: аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл ВГВ-негативной плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и 100 мкл нового пула переносили в третью пробирку и т. д. до получения серии последовательных разведений. После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца. Полученные образцы ДНК амплифицировали, согласно предложенному способу. Аналитическая чувствительность 10 МЕ/мл при объеме экстрагируемого материала 100 мкл, 3 МЕ/мл при объеме экстрагируемого материала 500 мкл.

Во втором случае в качестве матрицы использовали контрольную плазмиду, концентрацию которой предварительно оценивали с помощью цифровой ПЦР, проводили десятикратные разведения следующим образом:

аликвоту объемом 10 мкл вносили в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 90 мкл ТЕ-буфера, тщательно пипетировали и переносили 10 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 90 мкл ТЕ-буфера и т. д. до получения серии последовательных десятикратных разведений. Для каждого плазмидного образца из полученной серии разведений проводили второй этап амплификации (рис. 2).

Определение специфичности разработанного способа осуществляли двумя способами.

Анализ in silico. При сравнении с помощью алгоритма BLASTn целевых последовательностей с представленными в базе данных GenBank геномными последовательностями патогенов и человека было установлено, что искомые последовательности имеют сходство только с соответствующими последовательностями в геноме ВГВ (Core, S, X) и в геноме человека (HPRT), соответственно.

Для оценки специфичности эмпирическим методом проводили выделение НК с последующей nested-ПЦР с использованием ранее охарактеризованных коллекционных образцов плазмы крови, как «чистых» (не содержащих патогенов), так и инфицированных различными вирусными патогенами в виде моно- и коинфекций, в том числе: вирус гепатита А, вирус гепатита С, вирус гепатита D, вируса гепатита Е, вируса гепатита G, вирус иммунодефицита человека, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус герпеса 6 и 8 типов, парвовирус В19, вирус клещевого энцефалита. Анализ проводили «слепым» методом, для чего пробирки с анализируемыми негативными образцами объединяли с пробирками, содержащими ВГВ-положительную плазму крови больных, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Для исключения возможной контаминации в качестве контрольных ВГВ-положительных образцов использовали плазму, содержащую ВГВ субгенотипов A1, D4, E, присутствие которых в используемых для анализа специфичности группах маловероятно. Неспецифических реакций выявлено не было, что является подтверждением спец-

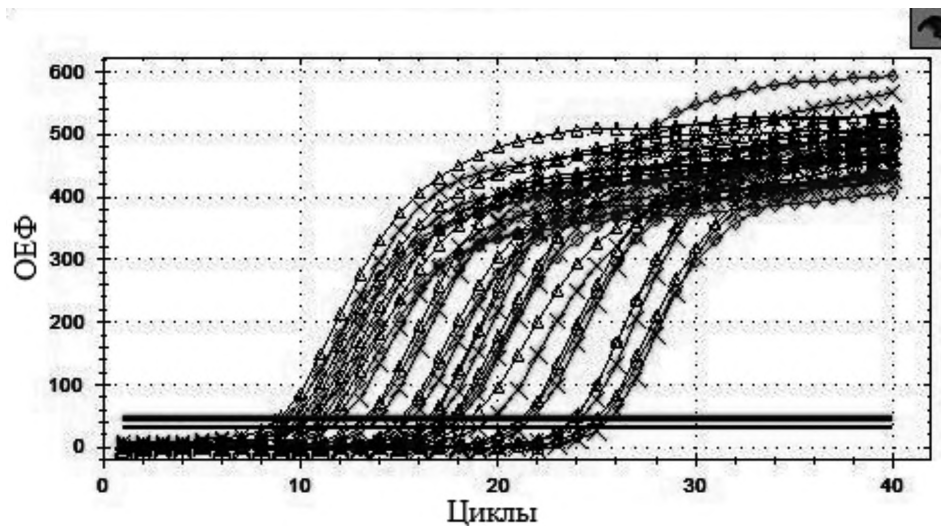


Рис. 2. Кривые флуоресценции, отражающие динамику образования продуктов реакции в ходе второго этапа амплификации с использованием последовательных разведений синтетического контрольного образца. ОЕФ – относительные единицы флуоресценции. Ромбами обозначен сигнал флуорофора FAM, треугольниками – сигнал HEX, крестами – сигнал ROX, представляющие собой результат амплификации трех синтетических фрагментов позитивного контроля ДНК ВГВ, соответствующих трем регионам генома ВГВ (Core, S, X).

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Hepatitis B virus isolate XZ74, complete genome	Hepatitis B virus	246	246	100%	4e-61	100.00%	3212	MN657315.1	
Hepatitis B virus isolate XZ79, complete genome	Hepatitis B virus	246	246	100%	4e-61	100.00%	3215	MN683717.1	
Hepatitis B virus isolate XZ175, complete genome	Hepatitis B virus	246	246	100%	4e-61	100.00%	3215	MN683701.1	

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Hepatitis B virus ayw2 isolate Bushehr-PW-HBS35 S protein (S) and polymerase (pol) genes, partial cds	Hepatitis B virus ayw2	223	223	100%	4e-54	100.00%	412	OK490614.1	
Hepatitis B virus strain BSY675 polymerase (P) gene, partial cds	Hepatitis B virus	223	223	100%	4e-54	100.00%	777	MW244564.1	
Hepatitis B virus strain BSM688 polymerase (P) gene, partial cds	Hepatitis B virus	223	223	100%	4e-54	100.00%	777	MW244555.1	
Hepatitis B virus strain BSM549 polymerase (P) gene, partial cds	Hepatitis B virus	223	223	100%	4e-54	100.00%	777	MW244552.1	

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Hepatitis B virus genotype D B-H10-Ban DNA, complete genome	hepatitis B virus genotype D	286	286	100%	6e-73	100.00%	3125	LC519824.1	
Hepatitis B virus isolate HBV occult Arkh33, complete genome	Hepatitis B virus	286	286	100%	6e-73	100.00%	3182	MK618428.1	
Hepatitis B virus isolate HBV occult Arkh15, complete genome	Hepatitis B virus	286	286	100%	6e-73	100.00%	3182	MK618427.1	
Hepatitis B virus isolate 12/16/0148, complete genome	Hepatitis B virus	286	286	100%	6e-73	100.00%	3182	MK541688.1	

Sequences producing significant alignments									
Download New Select columns Show 100									
select all 2 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Transcripts									
Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), mRNA	Homo sapiens	294	294	100%	1e-77	100.00%	1395	NM_000194.3	
Genomic sequences									
Homo sapiens chromosome X, GRCh38.p13 Primary Assembly	Homo sapiens	237	301	100%	2e-60	100.00%	156040895	NC_000023.11	

Рис. 3. Анализ in silico анализируемых фрагментов Core (а), S (б), X (в) ДНК ВГВ и фрагмента ДНК человека гена HPRT (г). Приведены фрагменты полученных таблиц результатов анализа соответствующих генов с использованием метода BLASTn.

ифичности разработанного способа и его диагностической ценности.

Метод был апробирован при обследовании большого контингента лиц разных групп риска и дозорных групп в различных географических регионах мира, в том числе в группах больных ХГВ при моно- и коинфекции с ВИЧ из РФ и стран Средней Азии, условно здоровых жителей Южного Вьетнама, беременных женщин из Гвинейской Республики [11-14]. Полученные результаты подтверждают диагностическую ценность разработанного способа для выявления ХГВ, независимо от генотипов и субгенотипов вируса в разных географических регионах мира. В ряде случаев при наличии сигнала *Cy5* (HPRT) регистрировали сигналы только одного «вирусного» флуорофора, однако при повторной экстракции ДНК из большего объема плазмы регистрировали сигналы двух или всех трех флуорофоров, свидетельствовавших о выявлении вирусных мишеней. Первичная регистрация сигнала даже по одному из каналов, свидетельствующих о наличии вирусной ДНК в образце, позволяет обратить внимание на обследуемого пациента и, проведя дополнительные исследования, своевременно диагностировать заболевание.

Особого внимания заслуживает оценка применимости разработанного нами способа при выявлении ДНК ВГВ в минипулах. При экстракции ДНК из полного объема минипулов вирус был выявлен во всех ВГВ-положительных минипулах. При экстракции ДНК из 100 мкл смешанной плазмы в минипулах по десять образцов удалось выявить ДНК вируса только в тех случаях, когда в пул входили 2-3 образца с приблизительной вирусной нагрузкой более 30 МЕ/мл, при этом сигнал флуоресценции получали только по одному из каналов. Если в минипул входил только один ВГВ-положительный образец или 2-3 образца с предположительной вирусной нагрузкой менее 10 МЕ/мл, ДНК вируса выявить не удавалось. В минипулах по шесть образцов достаточно было одного образца с концентрацией около 50 МЕ/мл для получения сигнала флуорофора одного из каналов. Таким образом, несмотря на высокую чувствительность разработанного способа, пулирование плазмы крови при выявлении СГВВ значительно снижает вероятность выявления вируса. В целом чувствительность снижается в соответствии с коэффициентом разбавления в процессе пулирования.

Описанный способ был разработан с использованием в качестве матричных образцов ВГВ вариантов, преобладающих на территории РФ (D1, D2, D3, A2). Однако предложенный метод позволяет выявить ВГВ среди пациентов из географически отдаленных регионов мира, в том числе были определены генотипы/субгенотипы вируса не встречающиеся или встречающиеся крайне редко на территории России. Так, были определены субгенотипы A1, B2, B4, C1, C2, C3, C5, E вируса, что также свидетельствует о диагностической чувствительности и специфичности разработанного способа и его применимости для диагностики СГВВ независимо от геноварианта вируса.

Отметим также потенциальную клинико-диагностическую значимость выявления в исследуемых образцах только одного фрагмента генома ВГВ даже при повторном анализе с увеличением объема биологического материала при экстракции ДНК. Такие случаи могут свидетельствовать о выявлении фрагментов ДНК ВГВ интегрированных в геном человека, что, как известно, может способствовать онкогенезу и развитию ГЦК [15,

16]. Однако применимость разработанного способа для выявления интегрированных фрагментов генома ВГВ в геном хозяина и связь с развитием заболевания печени нуждается в дальнейших исследованиях.

Заключение. Разработанный способ выявления ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке на основе метода двухэтапной ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени позволяет идентифицировать различные геноварианты ВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Результаты испытаний свидетельствуют о возможности эффективного использования двухэтапного метода с мультиплексной ПЦР на втором этапе для комплексной диагностики. Способ может быть использован для диагностики ХГВ при различных генотипах/субгенотипах вируса, в том числе, при HBsAg-негативной форме заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 4-7, 15-16 см. REFERENCES)

3. Эсауленко Е.В., Сухорук А.А., Иванова Н.В. Возможность элиминации парентеральных вирусных гепатитов на территории Российской Федерации и Северо-Западного федерального округа. *Актуальные вопросы фундаментальной, клинической медицины и фармации*. 2018; 230-3.
8. Серикова Е.Н., Семенов А. В., Останкова Ю. В., Тотолян Арег А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (1): 59-64.
9. Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(9): 565-70.
10. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (10): 635-40.
11. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Габдрахманов И.А., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян Арег А. Разнообразие геновариантов вируса гепатита В у военнослужащих. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(3):46-53. DOI:10.22625/2072-6732-2019-11-3-46-53.
12. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Банцевич М.Д., Филиппович-Вигнiewicz С.Б., Зуева Е.Б. и др. Характеристика связанных с HBsAg-негативной формой заболевания мутаций вируса гепатита В у пациентов гемодиализных центров. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4: 96-104. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-96-104.
13. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Щемелев А.Н., Валутите Д.Э. и др. Распространенность маркеров вирусов гепатита В и С среди условно-здоровых жителей южного региона Социалистической Республики Вьетнам. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(6): 1131-40.
14. Балде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Семенов А.В. Сравнительный анализ вертикального риска передачи некоторых гемоконтактных инфекций в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 1:87-94. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-87-94.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. Available at <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>. Accessed 2022.04.08.

2. Kuhns M.C., Holzmayer V., Anderson M., McNamara A.L., Sauleda S., Mbanya D., Duong P.T., Dung N.T.T., Cloherty G.A. Molecular and Serological Characterization of Hepatitis B Virus (HBV)-Positive Samples with Very Low or Undetectable Levels of HBV Surface Antigen. *Viruses*. 2021; 13(10): 2053. DOI:10.3390/v13102053.
3. Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Ivanova N.V. The possibility of elimination of parenteral viral hepatitis in the territory of the Russian Federation and the North-Western Federal District. *Aktual'nyye voprosy fundamental'noy, klinicheskoy meditsiny i farmatsii*. 2018; 230-3. (in Russian)
4. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2008; 49: 652-7.
5. Calux S.J., Silva V.C.M., Compri A.P., Lemos M.F., Santos A.P.T, Oba I.T., Mendes-Correa M.C.J., Moreira R.C. Hepatitis B: Prevalence and occult infection in HIV-infected patients. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2020; 53: e20180533.
6. Wong D.K., Cheng S.C.Y., Mak L.L., To E.W., Lo R.C., Cheung T.T. Among Patients with Undetectable Hepatitis B Surface Antigen and Hepatocellular Carcinoma, a High Percentage Has Integration of HBV DNA into Hepatocyte DNA and No Cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2019; 18: 449-56. DOI:10.1016/j.cgh.2019.06.029.
7. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F. Anna S. Lok, Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol*. 2019; 71(2): 397-408. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.03.034.
8. Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A. Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66 (1): 59-64. DOI: 10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64. (in Russian)
9. Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (9): 565-70. (in Russian)
10. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (10): 635-40. (in Russian)
11. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Gabdrakhmanov I.A., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Variety of the hepatitis B virus genovariants in the military. *Zhurnal infektologii*. 2019; 11(3): 46-53. (in Russian)
12. Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Bancevic M.D., Filipovic-Vignjevic S.B., Zueva E.B. et al. Profile of Hepatitis B Virus Mutations Associated with HBsAg-Negative Disease in Patients of Hemodialysis Centers. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; 4: 96-104. (in Russian)
13. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Schemelev A.N., Valutite D.E. et al. The prevalence of hepatitis B and C virus's markers among conditionally healthy residents of the Socialist Republic of Vietnam (Southern Vietnam). *Infektsiya I immunitet*. 2021; 11(6): 1131-40. DOI:10.15789/2220-7619-TPO-1793. (in Russian)
14. Balde T.A.L., Boumbaly S., Serikova E.N., Valutite D.E., Schemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V. Comparative analysis of the vertical risk of transmission of some blood-borne infections in the Republic of Guinea. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (1): 87-94. (in Russian)
15. Shao Y., Su L., Hao R., Wang Q., Naranmandura H. Advances on molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2021; 50(1): 113-22. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2021-0032.
16. Tu T., Zhang H., Urban S. Hepatitis B Virus DNA Integration: In Vitro Models for Investigating Viral Pathogenesis and Persistence. *Viruses*. 2021; 13(2): 180. DOI: 10.3390/v13020180.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНА БЕЛКА-АДГЕЗИНА *BABA2* У КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *HELICOBACTER PYLORI*

ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 197191, Санкт-Петербург, Россия

Приведены результаты сравнительного анализа эффективности двух наборов праймеров для детекции и оценки распространённости гена *babA2* (контролирует синтез фактора вирулентности функционально-активного белка-адгезина *BabA*) у 52 клинических изолятов *H. pylori*, выделенных от пациентов с хроническим гастритом (ХГ, $n=32$), язвенным поражением двенадцатиперстной кишки (ЯДК, $n=16$) и раком желудка (РЖ, $n=4$) в Санкт-Петербурге. Детекция гена *babA2* проводилась методом ПЦР с использованием 271 п.н.- и 832 п.н.- наборов праймеров с последующим секвенированием продуктов амплификации. Наибольшая доля *babA2*-позитивных штаммов – 90,4% (47/52) выявлена с использованием праймеров для детекции продукта амплификации 271 п.н.; детекция ПЦР-продукта 832 п.н. наблюдалась лишь в 51,9% случаев (27/52), статистически значимые различия не установлены ($p>0,05$). Биоинформационный анализ выявил гомологию секвенированных по Сэнгеру ПЦР-продуктов 271 п.н. и 832 п.н. гена *babA2* с участками генов *babA2*, *babA1* и химерного генома (*babB/babA1*) штаммов *H. pylori*, аннотированных в базе данных NCBI. Вне зависимости от использованного набора праймеров, связь между выявлением гена *babA2* у штаммов *H. pylori* с принадлежностью пациентов к группам с различными формами заболевания (ХГ, ЯДК, РЖ) статистически не значима ($p>0,05$). Анализ сочетания трёх генов вирулентности *babA2*, *cagA*, *vacAs1* не выявил связи *babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacAs1*⁺ генотипа штаммов *H. pylori* с различными клиническими проявлениями *H. pylori*-инфекции ($p>0,05$). Ни один из двух наборов праймеров (271 п.н., 832 п.н.) не является достаточно надёжным для детекции гена *babA2* с целью оценки вирулентности российских штаммов *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*; *babA2*; генотипирование; хронический гастрит; язвенная болезнь; рак желудка; *H. pylori*-инфекция.

Для цитирования: Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С. Выявление гена белка-адгезина *babA2* у клинических изолятов *Helicobacter pylori*. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (9): 538-543. DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-538-543

Для корреспонденции: Старкова Дарья Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. идентификации патогенов, науч. сотр. лаб. мол. эпидемиологии и эволюционной генетики; e-mail: dariastarkova13@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 11.02.2022

Принята к печати 18.05.2022

Опубликовано 12.09.2022

Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S.

DETECTION OF THE *BABA2* ADHESIN PROTEIN GENE IN *HELICOBACTER PYLORI* CLINICAL ISOLATES

St. Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia

The study compared the effectiveness of two different primer sets for detecting and evaluating the prevalence of the *babA2* gene in 52 *H. pylori* clinical isolates from patients with chronic gastritis ($n=32$), duodenal ulcer ($n=16$) and stomach cancer ($n=4$) in St. Petersburg, Russia. The PCR was used for detection of the *babA2* gene with 271 bp and 832 bp primer sets followed by sequencing of the PCR-amplificons. The largest proportion of *babA2*-positive strains – 90.4% (47/52) was detected using a 271 bp PCR primer set. Detection of the 832 bp PCR positive samples was observed only in 51.9% of cases (27/52). The largest proportion of *babA2*-positive strains – 90.4% (47/52) was detected using 271 bp PCR primer set; detection of 832 bp PCR product was observed only in 51.9% cases (27/52), however, there were no significant differences in the *babA2* gene detection rates ($p>0.05$). Bioinformatic analysis revealed a homology of Sanger sequenced PCR products 271 bp and 832 bp of *babA2* gene with regions of the *babA2*, *babA1*, and chimeric *babA/B* genes of *H. pylori* strains annotated in the NCBI database. Regardless of the primer set used, the presence of *babA2* was not significantly associated with duodenal ulcer nor gastric cancer ($p>0.05$). The combination of the three *babA2*, *cagA*, and *vacAs1* genes did not reveal any association between the presence of *babA2* gene and *cagA/vacAs1* genes in *H. pylori* strains ($p>0.05$). Thus, none of the two primer sets (271 bp and 832 bp) appears sufficiently informative for detecting the *babA2* gene to assess virulence of *H. pylori* Russian strains.

Key words: *Helicobacter pylori*; *babA2* gene; genotyping; gastritis; duodenal ulcer; gastric cancer.

For citation: Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S. Detection of the *babA2* adhesin protein gene in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2022; 67 (9): 538-543 (in Russ.) DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-538-543

For correspondence: Starkova D.A., Ph.D., Senior researcher at Laboratory of Identification of Pathogens, researcher at Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics; e-mail: dariastarkova13@gmail.com

Information about authors:

Svarval A.V., https://orcid.org/0000-0001-9340-4132;

Starkova D.A., https://orcid.org/0000-0003-3199-8689;

Ferman R.S., https://orcid.org/0000-0001-7661-3725.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 11.02.2022

Accepted 18.05.2022

Published 12.09.2022

Введение. *Helicobacter pylori* является этиологическим агентом гастродуоденальных заболеваний человека различной степени тяжести (хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и/или язвенное поражение двенадцатиперстной кишки, рак желудка). Развитию *H. pylori*-ассоциированных заболеваний способствует длительная колонизация бактериями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) за счёт прочного прикрепления *H. pylori* к эпителиальным клеткам [1].

Геном *H. pylori* содержит более 30 генов, кодирующих семейство белков-адгезинов – Helicobacter Outer-Membrane Protein (НОР=OMP), для многих из которых идентифицированы соответствующие рецепторы клеток хозяина [2]. К числу этих белков принадлежат BabA (англ., *Blood group Antigen-Binding Adhesin*) – антигенсвязывающие адгезины групп крови (ABO). Описаны три паралога *bab* – BabA, BabB, BabC. Наиболее изученный белок BabA обеспечивает связывание бактерий с фукозилированным антигеном Lewis-b (Le^b) и другими антигенами ABO на поверхности эпителиальных клеток ЖКТ, что повышает вирулентность *H. pylori* [2, 3].

Функционально активный белок BabA кодируется геном *babA2*; аллельный вариант *babA1* содержит делецию 10 п.н. в сайте инициации трансляции, в результате чего продукт данного гена не взаимодействует с антигенами Le^b . Присутствие *babA2* в геноме *H. pylori* связывают с повышенным риском развития язвы двенадцатиперстной кишки и аденокарциномы желудка человека, штаммы *babA2*⁺ могут различаться по уровню продукции белка BabA [4, 5]. Регуляцию экспрессии BabA обеспечивают механизмы рекомбинации (внутригеномные транслокации) в области гомологичных N- и C-терминальных участков генов *babA* и *babB*, что приводит к образованию различных вариантов химер *babA/babB* и химерных белков, обладающих различными уровнями функциональной активности [3, 6].

Ряд исследователей указывают на взаимосвязь между статусом *babA2*⁺ и присутствием детерминант вирулентности *cagA* и *vacAs1* в геноме клинических изолятов *H. pylori*, ассоциации «трижды-положительных» штаммов (*babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacAs1*⁺) с развитием язвы и рака желудка [7-10].

Детекция гена *babA2* проводится с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием двух наиболее распространённых наборов праймеров. Праймеры, сконструированные Gerhard et al. (1999), используют для амплификации полиморфного участка (832 п.н.) гена *babA2* с целью выявления делеции 10 п.н., которая позволяет различать *babA1* и *babA2* [7]. Другая пара праймеров (разработана Sheu et al., 2003) амплифицирует полиморфный фрагмент (271 п.н.) в промоторной области гена *babA2* [11]. При использовании различных наборов праймеров наблюдаются различия в определении превалентности гена *babA2* в популяциях возбудителя, что существенно влияет на оценку клинической значимости выявления данного гена у изолятов *H. pylori* [4].

Цель исследования – сравнительный анализ эффективности двух наборов праймеров для детекции и оценки распространённости гена *babA2* у клинических изолятов *H. pylori* в Санкт-Петербурге.

Материал и методы. Изучены 52 штамма *H. pylori*, выделенные от пациентов с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями: 32 – с хроническим гастритом (ХГ), 16 – с язвенным поражением двенадцатиперстной кишки (ЯДК), четырёх больных раком желудка (РЖ) за период с 2014 по 2019 гг. в ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробио-

логии им. Пастера» (СПбНИИЭМ). Средний возраст пациентов составлял 44 года (от 17 до 88 лет). Исследование одобрено независимым локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 50 /04-2019, 22.06.2020).

Бактериологическому исследованию подлежали полученные при эндоскопии биоптаты слизистой оболочки антрального отдела желудка. Культивирование *H. pylori* осуществляли на селективной среде на основе Колумбийского агара (с добавлением 5-7% дефибрированной лошадиной крови и 1% раствора IsoVitalex) при 37° С. Посевы инкубировали в микроаэрофильных условиях (содержание кислорода ~5%) с использованием анаэроэстатов системы GasPac 100. Видимый рост культур бактерий наблюдали в течение 5-7 дней. Для первичной идентификации мазки из колоний окрашивали по Граму. Видовую идентификацию клинических изолятов проводили с использованием биохимических тестов (уреазный, каталазный, оксидазный). При положительном результате трёх тестов культуру идентифицировали как *H. pylori*.

Хромосомную ДНК из чистых культур *H. pylori* выделяли с помощью набора «Хеликопол II» (НПФ «Литех», Москва) и использовали для постановки ПЦР с целью детекции гена *babA2*. Амплификацию проводили в термощиклере Bio-Rad C1000 Thermal Cycler (США). Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига и характеристика продуктов амплификации приведены в табл. 1. Условия проведения ПЦР: 95° С – 3 мин.; 35 циклов: 94° С – 30 сек., температура отжига – 40 сек., 72° С – 45 сек.; 72° С – 5 мин. Продукты ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Размер продуктов амплификации определяли с использованием маркёров молекулярной массы 100 bp DNA Ladder (ООО «Интерлабсервис», г. Москва). Результаты визуализировали с помощью системы документации гелей «GelDoc» (BioRad, США).

Секвенирование (по Сэнгеру) шести продуктов амплификации проводили с использованием «Big Dye Terminator v3.1» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Капиллярный электрофорез выполняли на автоматическом секвенаторе «ABI PRISM 3130» (Applied Biosystems, США). Обработка хроматограмм секвенирования проведена с использованием пакета программ Unipro UGENE 38.1 (Россия). Полиморфизм гена *babA2* оценивали путём сравнения полученных последовательностей с базой секвенированных геномов штаммов *H. pylori*, используя ресурс – BLAST (англ., Basic Local Alignment Search Tool), NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Степень генетического родства между штаммами на основе полиморфизма участка гена *babA2* оценивали с использованием алгоритма Neighbour-Joining и графически отображали в виде дендрограммы, построенной с помощью программы MEGA v. X.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием ресурса «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе четырёхпольных таблиц сопряжённости выполнялось с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) Пирсона и точного критерия Фишера. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Видимый рост бактерий на селективной среде, окраска по Граму (изогнутые граммотрица-

Праймеры для ПЦР-детекции гена *babA2*

Праймер	Последовательность	Температура отжига праймеров, °C	Размер ПЦР продукта, п.н.	Ссылка
<i>babA2F</i>	aatccaaaaaggagaaaaagtatgaaa	54	832	7
<i>babA2R</i>	tgttagtgatttcgggttaggaca			
<i>bab7-F</i>	ccaaacgaacaaaaagcgt	45	271	11
<i>bab7-R</i>	gcttggtgtaaaagccgtcgt			

Детекция участков гена *babA2* (271 п.н. и 832 п.н.) двумя наборами праймеров

Статус гена	832 п.н.	
	<i>babA2</i> ⁺ (n=27)	<i>babA2</i> ⁻ (n=25)
271 п.н. <i>babA2</i> ⁺ (n=47)	26	21
<i>babA2</i> ⁻ (n=5)	1	4

babA2-позитивные штаммы *H. pylori* при различных формах инфекции

Ген <i>babA2</i> ⁺	ХГ, N(%) (n=32)	ЯДК, N(%) (n=16)	РЖ, N(%) (n=4)	χ^2	p
271 п.н.	31 (96,9)	13 (81,3)	3 (75,0)	4,177	0,12
832 п.н.	16 (50,0)	9 (56,3)	2 (50,0)	0,173	0,92

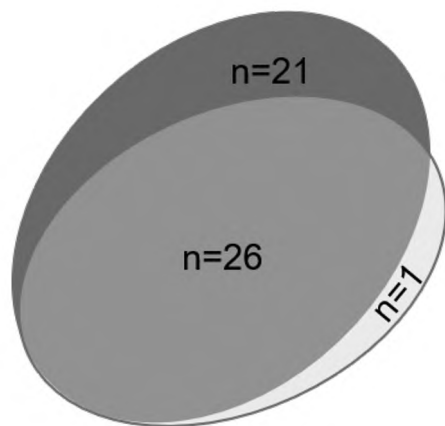


Рис. 1. Диаграмма Венна, отображающая комбинации статусов гена *babA2*, определённых с использованием 832 п.н. (□) и 271 п.н. (■) наборов праймеров. Комбинация *babA2*-негативных штаммов с использованием 832 п.н. и 271 п.н. наборов праймеров (n=4) не показана.

тельные палочки), положительные результаты биохимических тестов (каталаза/уреаза/цитохромоксидаза) позволили отнести 52 штамма бактерий к виду *H. pylori*.

Анализ продуктов амплификации с использованием двух наборов праймеров для детекции участков гена *babA2* размером 832 п.н. и 271 п.н. выявил различия у штаммов *H. pylori* данной выборки (табл. 2).

Наибольшая доля *babA2*-позитивных штаммов – 90,4% (47/52) выявлена с использованием набора праймеров для детекции продукта амплификации размером 271 п.н. Детекция ПЦР-продукта размером 832 п.н.

наблюдалась лишь в 51,9% случаев (27/52). Двадцать один штамм *H. pylori* явился *babA2*-негативным при использовании 832 п.н.-набора праймеров, но *babA2*-позитивным при использовании 271 п.н.-набора праймеров. Один из 832 п.н.-позитивных штаммов *H. pylori* набор праймеров для детекции 271 п.н. дал отрицательный результат. При анализе результатов выявления гена *babA2* у штаммов *H. pylori* в зависимости от набора праймеров статистически значимые различия не установлены: $p > 0,05$ (использован точный критерий Фишера (двусторонний)). Результаты исследования представлены на рис. 1.

Характеристика распределения *babA2*-позитивных штаммов возбудителя (с использованием двух пар праймеров) у пациентов с различными клиническими проявлениями *H. pylori*-инфекции представлена в табл. 3. Вне зависимости от использованного набора праймеров связь между выявлением гена *babA2* у штаммов *H. pylori* и принадлежностью пациентов к группам с различными формами заболевания статистически не значима ($p > 0,05$; критическое значение χ^2 при двух степенях свободы и уровне значимости $p < 0,05$ составляет 5,991).

Секвенирование продукта амплификации 271 п.н. штаммов HP64, HP73, HP95, HP271 показало 98% гомологию нуклеотидных последовательностей (208 из 211) участку генома штамма *H. pylori* Lithuania75 (GenBank acc. no. CP002334.1) (рис. 2).

Гомология нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов и референс-последовательности гена *babA2* *H. pylori* NCTC11637 (=ATCC 43504=CCUG 17874 (GenBank acc. no. AF033654.1)) составила 96,3%. При дальнейшем поиске гомологов искомая последовательность обнаружена в геномах других аннотированных штаммов *H. pylori* – в нескольких участках, которые относятся не только к генам *babA2*, но и *babA1*, *babB* и псевдогенам с одинаковым уровнем сходства. Это может быть связано с особенностями нуклеотидных последовательностей (многочисленные повторы) в промоторной области генов, которые амплифицируются с использованием 271 п.н.- набора праймеров.

В результате секвенирования ПЦР-продуктов размером 832 п.н. у штаммов HP64 и HP789 выявлена вариативность нуклеотидных последовательностей данного участка гена *babA2*. Последовательности амплифицированных участков на 93,6% и 93,9% гомологичны участкам генома штаммов *H. pylori* 476-A2-EK2 и 476-A-EK5 (GenBank acc. no. CP032473.1, CP032900.1), выделенных в Германии. Гомология нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов и референсной последовательности гена *babA2* *H. pylori* NCTC11637 (=ATCC 43504=CCUG 17874 (GenBank acc. no. AF033654.1)) составила 93,2% и 93,7% соответственно. С геном *babA1* этого же референсного штамма (GenBank acc. no. AF001388.1) гомология секвенированных последовательностей аналогична и составила 93,2% и 93,7%.

На основе полиморфизма участков гена *babA2* (832 п.н.), проведён анализ филогенетического родства штаммов *H. pylori* (рис. 3).

Штаммы *H. pylori* образовали на филогенетическом дереве две обособленные ветви (кластеры) А и В. Монофилетический кластер В с высоким уровнем bootstrap-поддержки (100%) объединял референсные последовательности гена *babB*. Ветвь А объединяла референсные

		Strand: Plus/Minus	
HP271 CP002334.1	1 903586	AAAATTTTAAAGAAATGACaaaaaaacCGCTTTATGCTATAATACTCCAATACA	60 903527
HP271 CP002334.1	61 903526	TTCCAATGCAAATGCATTCTAATGCAAATGTATAATGAATGTGAAATCCCTAATACTA	120 903468
CDS: Putative HP271 CP002334.1 CDS: omp28	1 121 903467 1	ATCCAATTTAATCCAAAAGGAGAAACATGAAAAACACATCCTTTCATTAACCTTAGG M K K H I L S L T L G	180 903408
CDS: Putative HP271 CP002334.1 CDS: omp28	12 181 903407 12	S L L V S T L S A E CTCGCTTTAGTTTCCACTTTGAGCGCTGAA 211 S L L V S T L S A E	903377

Рис. 2. Вывравнивание нуклеотидных последовательностей промоторного участка гена *babA2* штамма *H. pylori* Lithuania75 (GenBank acc. no. CP002334.1) и штамма HP271. Идентичные нуклеотиды обозначены точками. Цифрами обозначены нуклеотидные позиции в геноме *H. pylori* Lithuania75.

последовательности близкородственных генов *babA2* и *babA1*, химерную последовательность двух генов *H. pylori* – *babB/babA1* fusion gene, которая являлась ближайшим соседом по отношению к секвенированным последовательностям штаммов HP64 и HP789 (гомология штаммов HP64, HP789 и *H. pylori babB/babA1* fusion gene составила 92,9% и 93,5%).

В предыдущем исследовании нами выявлена взаимосвязь между присутствием гена *cagA* и аллельным вариантом *s1* гена *vacA* у штаммов данной выборки. Объединив имеющиеся данные, мы провели анализ сочетания трёх генов *babA2*, *cagA*, *vacAs1*, в результате которого связи между наличием гена *babA2* и присутствием генов *cagA* и *vacAs1* у штаммов *H. pylori* не выявлено ($p > 0,05$) (табл. 4).

Распределение генотипа *babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacAs1*⁺ штаммов возбудителя (с использованием двух пар праймеров) у пациентов с различными формами инфекции представлено в табл. 5. Связь между выявлением *babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacAs1*⁺ штаммов *H. pylori* с различными клиническими проявлениями *H. pylori*-инфекции статистически не значима ($p > 0,05$).

Обсуждение. Сравнительный анализ двух наборов праймеров, используемых для детекции гена *babA2* у клинических изолятов *H. pylori*, выявил различия полученных результатов: доля *babA2*-позитивных штаммов с использованием праймеров для амплификации участка 271 п.н. в 1,7 раза превышала таковую при использовании 832 п.н.-набора праймеров (90,4% против 51,9%), однако статистически значимые различия не установлены ($p > 0,05$).

Результаты секвенирования ПЦР-продуктов двух участков (271 п.н. и 832 п.н.) гена *babA2* позволили выявить неспецифичность используемых праймеров в обоих случаях. Показано, что 271 п.н.- и 832 п.н.- наборы праймеров амплифицируют не только ген *babA2*, но также *babA1*, *babB* и псевдогены, что ведёт к появлению ложноположительных результатов. Полученные данные согласуются с исследованиями А. Šterbenc и соавт. [4].

Чувствительность 832 п.н.-набора праймеров составляет менее 50% (36-49%) [12]. Столь низкий уровень чувствительности отразился на одинаковом уровне гомологии секвенированных последовательностей *H. pylori* с генами *babA2* и *babA1* в нашем исследовании. Филогенетический анализ показал, что ближайшим соседом к последовательностям российских штаммов является химерная последовательность *H. pylori babB/babA1* fusion gene, в которой отсутствует дифференциация между генами *babA* и *babB*. Рекомби-

национные события между двумя близкородственными генами *babA* и *babB* являются результатом адаптивного ответа и распространены в естественной среде у клинических изолятов *H. pylori* [6].

В многочисленных исследованиях зарубежных авторов, посвящённых генетическому разнообразию *H. pylori*, выявлен разный уровень распространённости *babA2*-позитивных штаммов в зависимости от географического региона. Наименьшая доля (менее 50%) *babA2*-позитивных штаммов выявлена в Португалии (12%), США (36%), Мексике (8%), Франции (49%), Италии (36%), Швеции (40%), Болгарии (48%) [10, 13-18]. Максимальный уровень детекции гена *babA2* (80-100%) наблюдался у штаммов, выделенных в Индии, Таиланде, Тайване, Малайзии, Венесуэле [19-23]. В большинстве случаев в странах с высоким уровнем выявляемости гена *babA2* (около 95-100%) использован набор праймеров для детекции 271 п.н. ПЦР-продукта. Имеющиеся в литературе данные об уровне распространённости и клинической значимости гена *babA2* следует интерпретировать с осторожностью.

В литературе представлена единственная публикация, посвящённая детекции гена *babA2* у российских штаммов *H. pylori* с использованием 832 п.н.-набора праймеров [24]. Согласно результатам исследования, доля *babA2*-позитивных штаммов *H. pylori* у больных ЯДК и ХГ суммарно составляла 74% (31/42). В исследованиях других отечественных авторов выявление гена *babA2* в клинических изолятах или непосредственно из биопсийного материала осуществлялось с использованием «коммерческого набора праймеров «Литех» (Россия)» без указания размера амплифицируемого участка. В данных исследованиях наличие гена *babA2* *H. pylori* выявлено в 19% (Казань), 39% (Москва), 52% (Ростов) случаев [25-27].

Данные об ассоциации гена *babA2* с тяжестью клинических проявлений *H. pylori*-инфекции противоречивы. Установлена корреляция между статусом *babA2*⁺ (с использованием 832 п.н.-набора праймеров, но не 271 п.н.), плотностью бактериальной колонизации *H. pylori* и степенью активного воспаления, однако ассоциации *babA2*-позитивных штаммов с атрофией желудка и кишечной метаплазией авторами не выявлено [4]. Приводятся данные не только о корреляции *babA2*-позитивных штаммов *H. pylori* с язвенной болезнью и раком желудка, но и взаимосвязи статуса *babA2*⁺ с присутствием генов *cagA* и *vacAs1*, ассоциации комбинированного генотипа *babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacAs1*⁺ *H. pylori* с развитием тяжёлых форм инфекции [9, 14, 16, 17].

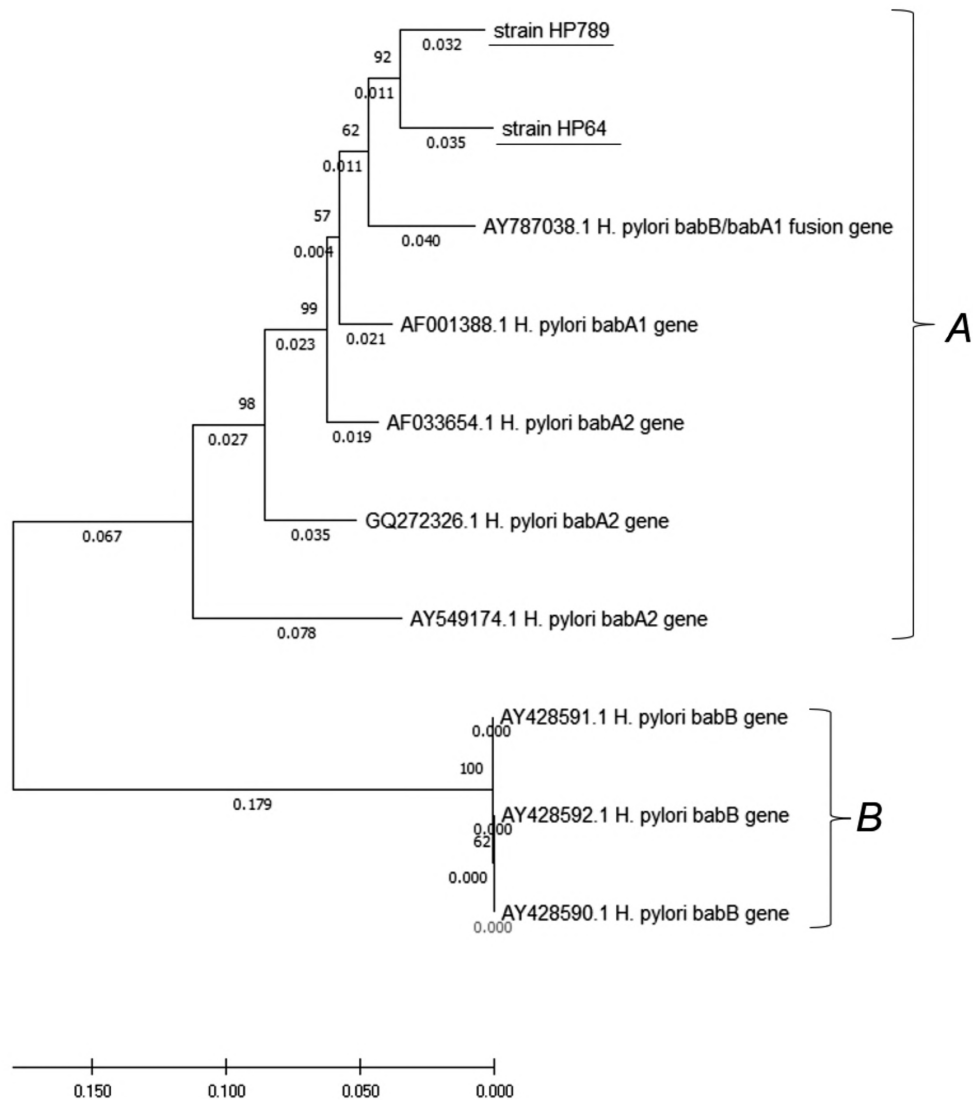


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное с использованием алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей 832 п.н.- участка гена *babA2* штаммов *H. pylori*. Масштаб дерева соответствует эволюционным расстояниям, которые рассчитаны с использованием модели Jukes-Cantor. Цифрами показана достоверность ветвления с помощью bootstrap-анализа. Секвенированные последовательности участка гена *babA2* двух штаммов *H. pylori* подчеркнуты линиями.

Таблица 4

Доли гена *babA2* у аллельных вариантов *vacAs1* и *vacAs2* и гена *cagA* у *babA2*-позитивных штаммов *H. pylori* (при использовании двух наборов праймеров 271 п.н. и 832 п.н.)

Ген <i>babA2</i>	<i>cagA</i> ⁺ , N(%) (n=31)	<i>cagA</i> ⁻ , N(%) (n=21)	<i>p</i>	<i>vacAs1</i> ⁺ , N(%) (n=39)	<i>vacAs2</i> ⁺ , N(%) (n=13)	<i>p</i>
271 п.н. <i>babA2</i> ⁺ (n=47)	29 (93,5)	18 (85,7)	0,35	35 (89,4)	12 (92,3)	0,79
832 п.н. <i>babA2</i> ⁺ (n=29)	18 (58,1)	9 (42,8)	0,28	23 (58,9)	4 (30,8)	0,08

Таблица 5

Доли комбинированного генотипа *babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacAs1*⁺ штаммов *H. pylori* при различных формах инфекции (при использовании двух наборов праймеров 271 п.н. и 832 п.н.)

Генотип	ХГ, N(%) (n=32)	ЯДК, N(%) (n=16)	РЖ, N(%) (n=4)	χ^2	<i>p</i>
271 п.н. <i>babA2</i> ⁺ / <i>cagA</i> ⁺ / <i>vacAs1</i> ⁺	16 (50,0)	11 (68,7)	1 (25,0)	2,960	0,23
832 п.н. <i>babA2</i> ⁺ / <i>cagA</i> ⁺ / <i>vacAs1</i> ⁺	9 (28,1)	7 (43,7)	1 (25,0)	1,300	0,52

В нашем исследовании статистически значимых различий в распределении гена *babA2* (по результатам ПЦР с 271 п.н.- и 832 п.н.- наборами праймеров) между группами пациентов не выявлено. Не выявлено ассоциации комбинированного генотипа *babA2*⁺/*cagA*⁺/*vacA**sI*⁺ с тяжестью клинических проявлений *H. pylori*-инфекции, что согласуется с результатами исследований в России [25-27] и большинстве стран (Беларусь, Таиланд, Венесуэла, Мексика, Португалия, Франция) [13, 15, 18, 19, 23, 28].

Исследования продемонстрировали, что ни один из двух наборов праймеров (271 п.н., 832 п.н.) не является достаточно надёжным для детекции гена *babA2* у клинических изолятов *H. pylori*. Полученные данные ставят вопрос о целесообразности использования наборов праймеров, амплифицирующих фрагменты 271 п.н. и 832 п.н. для выявления гена *babA2* с целью оценки вирулентности российских штаммов *H. pylori*.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-24 см. REFERENCES)

25. Березняк Е.А., Сорокин В.М., Карпова И.О., Ступина Н.А., Терентьев А.Н. Особенности генотипов штаммов *Helicobacter pylori*, циркулирующих в Ростовской области. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2013; 4(71):30-3.
26. Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Смирнова О.В., Челышева В.В., Кудрявцева Л.В., Сергиенко В.И. и др. Современные подходы к молекулярной диагностике и типированию клинических изолятов *Helicobacter pylori* в России. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2002; 12(3):57-65.
27. Ахтереева А. Р., Давидюк Ю.Н., Файзуллина Р.А., Ивановская К.А., Сафин А.Г., Сафина Д.Д. и др. Распространённость генотипов *Helicobacter pylori* у пациентов с гастродуоденальной патологией в Казани. *Казанский медицинский журнал*. 2017; 98(5):723-8. DOI: 10.17750/KMJ2017-723.
28. Макаренко Е.В., Воропаева А.В. Гены *vacA*, *cagA* и *babA* *Helicobacter pylori* у больных дуоденальной язвой и хроническим гастритом. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2004; 3(1):74-7.

REFERENCES

1. de Brito B.B., da Silva F.A.F., Soares A.S., Pereira V.A., Santos M.L.C., Sampaio M.M., et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J. Gastroenterol*. 2019; 25(37):5578-89. DOI: 10.3748/wjg.v25.i37.5578.
2. Xu C., Soyfoo D.M., Wu Y., Xu S. Virulence of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins: an updated review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39:1821-30. DOI: 10.1007/s10096-020-03948-y.
3. Ilver D., Arnqvist A., Ogren J., Frick I.M., Kersulyte D., Incecik E.T., Berg D.E., Covacci A., Engstrand L. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 1998; 279(5349):373-7. DOI:10.1126/science.279.5349.373.
4. Šterbenc A., Lunar M.M., Homan M., Luzar B., Zidar N., Poljak M. Prevalence of the *Helicobacter pylori* *babA2* gene in children mainly depends on the PCR primer set used. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2020;4080248. DOI:10.1155/2020/4080248.
5. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J. Gastroenterol*. 2008; 14(27):4265-72. DOI:10.3748/wjg.14.4265.
6. Pride D.T., Blaser M.J. Concerted evolution between duplicated genetic elements in *Helicobacter pylori*. *Mol. Biol.* 2002; 316:629-42. DOI:10.1006/jmbi.2001.5311.
7. Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Borén T., Rad R., Schepp W. et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigenbinding adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(22):12778-83. DOI: 10.1073/pnas.96.22.12778.
8. Lee D.-H., Ha J.-H., Shin J.-I., Kim K.-M., Choi J.-G., Park S. et al. Increased risk of severe gastric symptoms by virulence factors *vacAsIc*, *alpA*, *babA2*, and *hopZ* in *Helicobacter pylori* infection. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2021; 31(3):368-79. DOI: 10.4014/jmb.2101.01023.
9. Torres L.E., Melián K., Moreno A., Alonso J., Sabatier C.A., Hernández M. et al. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J. Gastroenterol*. 2009;

- 15(2):204-10. DOI:10.3748/wjg.15.204.
10. Olfat F.O., Zheng Q., Oleastro M., Volland P., Borén T., Karttunen R. et al. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005; 44(2):151-6. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.010.
11. Sheu B.S., Sheu S.M., Yang H.B., Huang A.H., Wu J.J. Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in *babA2* genopositive infection. *Gut*. 2003; 52(7):927-32. DOI:10.1136/gut.52.7.927.
12. Fujimoto S., Olaniyi O., Arnqvist A., Wu J.Y., Odenbreit S., Haas R. et al. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007; 5(1):49-58. DOI: 10.1016/j.cgh.2006.09.015.
13. Almeida N., Donato M.M., Romãozinho J.M., Luxo C., Cardoso O., Cipriano M.A. et al. Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European Country. *Dig. Dis. Sci.* 2015; 60:74-85. DOI: 10.1007/s10620-014-3319-8.
14. Podzorski R.P., Podzorski D.S., Wuertel A., Tolia V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *sI vacA* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 46(2):83-8. DOI: 10.1016/S0732-8893(03)00034-8.
15. Lehours P., Menard A., Dupouy S., Bergey B., Richy F., Zerbib F. et al. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect. Immun.* 2004; 72: 880-8. DOI: 10.1128/IAI.72.2.880-888.2004.
16. Zambon C.F., Navaglia F., Basso D., Rugge M., Plebani M. *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *sI vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J. Clin. Pathol.* 2003; 56(4):287-91. DOI: 10.1136/jcp.56.4.287.
17. Boyanova L., Yordanov D., Gergova G., Markovska R., Mitov I. Association of *iceA* and *babA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010; 98:343-50. DOI: https://doi.org/10.1007/s10482-010-9448-y.
18. González-Vázquez R., Córdova-Espinoza M.G., Escamilla-Gutiérrez A., Morales-Méndez I., Ochoa-Pérez S.A., Armendáriz-Toledano F., et al. Frequency of virulence genes in mixed infections with *Helicobacter pylori* strains from a Mexican population. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 2016; 81(1):11-20. DOI: 10.1016/j.rgm.2015.10.001.
19. Chomvarin C., Namwat W., Chaicumpar K., Mairiang P., Sangchan A., Sripa B. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int. J. Infect. Dis.* 2008; 12(1):30-6. DOI: 10.1016/j.ijid.2007.03.012.
20. Elhashima T., Mahmuda M.I.M., Amjad N., Harun N., Alania I.M. Clinical and histopathological relevance of *Helicobacter pylori* *babA2* genotype. 2016; 15(2):43-9. DOI: 10.31436/imjm.v15i2.388.
21. Ghosh P., Sarkar A., Ganguly M., Raghwan, Alam J., De R. et al. *Helicobacter pylori* strains harboring *babA2* from Indian subpopulation are associated with increased virulence in ex vivo study. *Gut Pathog.* 2016; 8(1). DOI: 10.1186/s13099-015-0083-z.
22. Lai C.H., Kuo C.H., Chen Y.C., Chao F. Y., Poon S. K., Chang C. S., et al. High prevalence of *cagA* and *babA2*-positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 40(10):3860-2. DOI:10.1128/JCM.40.10.3860-3862.2002.
23. Chiurillo M.A., Moran Y., Cañas M., Valderrama E., Granda N., Sayegh M. et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. *Int. J. of Inf. Dis.* 2013; 17(9):750-6. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.03.004.
24. Momynaliev K., Sмирнова О., Кудрявцева Л., Говорун В. *Helicobacter pylori* Genotypes in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 22:573-4. DOI: 10.1007/s10096-003-0987-2.
25. Березняк Е.А., Сорокин В.М., Карпова И.О., Ступина Н.А., Терентьев А.Н. Genotype Peculiarities of Regional *Helicobacter Pylori* Strains from the Rostov District. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2013; 4(71):30-3. (in Russian)
26. Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Смирнова О.В., Челышева В.В., Кудрявцева Л.В., Сергиенко В.И. et al. Modern approaches to molecular diagnosis and genotyping of clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Russia. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2002; 12 (3): 57-65. (in Russian)
27. Akhtereeva A.R., Davidyuk Y.N., Faizullina R.A., Ivanovskaya K.A., Safin A.G., Safina D.D. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes in patients with gastroduodenal pathology in Kazan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 98(5):723-8. (in Russian)
28. Makarenko E.V., Voropaeva A.V. *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA* and *babA* genes in patients with duodenal ulcer and chronic gastritis. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2004; 3(1):74-7. (in Russian)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ GENEXPERT MTB/RIF И XPERT MTB/RIF (ULTRA) В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Туберкулёз в последние годы является основной причиной заболеваемости и смерти среди больных ВИЧ-инфекцией. Современная диагностика туберкулёза включает в себя массовый скрининг населения: цифровая флюорография с 15 лет и иммунодиагностика у детей и подростков. Выявление микобактерий туберкулёза методом микроскопии происходит при формах туберкулёза с распадом лёгочной ткани. Такие пациенты представляют высокую эпидемическую опасность. Для повышения верификации диагностики в практике фтизиатра все шире используются молекулярно-генетические методы детекции микобактерий, основанные на выявлении специфических фрагментов цепи ДНК в диагностическом материале. Самым применяемым является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в основе которого лежит направленная амплификация ДНК. Последними инновациями являются полностью автоматизированные системы с использованием картриджной технологии GeneXpert. Преимуществами GeneXpert является высокая чувствительность, скорость (результат через 2 часа), детекция ПЦР в реальном времени, исключение – контаминации образцов. Методика картриджной технологии постоянно совершенствуется, на её платформе применяются различные картриджи, с помощью которых не только обнаруживаются *M. tuberculosis*, но и определяется чувствительность к противотуберкулёзным препаратам (ПТП) – рифампицину (картридж MTB/RIF) или нескольким ПТП (MTB/XDR). Разработаны картриджи, способные выявить микобактерию туберкулёза (МБТ) при ещё меньшей концентрации в исследуемом материале – MTB/RIF (Ultra). Технология GeneXpert может быть применена для диагностики внелёгочного туберкулёза путём исследования различных биологических материалов, именно их эффективнее применять при выявлении туберкулёза у детей и подростков, у ВИЧ-позитивных лиц.

Ключевые слова: обзор; платформа Xpert; картридж MTB/RIF; картридж MTB/RIF (Ultra); картридж MTB/XDR; чувствительность.

Для цитирования: Бородулина Е.А., Пискун В.В., Ураксина М.В., Шубина А.Т. Молекулярно-генетические тесты GeneXpert MTB/rif и Xpert MTB/rif (Ultra) в диагностике туберкулёза (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 544-549 DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-544-549>

Для корреспонденции: Бородулина Елена Александровна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. фтизиатрии и пульмонологии; e-mail: borodulinbe@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.04.2022

Принята к печати 26.05.2022

Опубликовано 12.09.2022

Borodulina E.A., Piskun V.V., Uraksina M.V., Shubina A.T.

MOLECULAR GENETIC TESTS GENEXPERT MTB / RIF AND XPERT MTB / RIF (ULTRA) IN THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS (REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

*In recent tuberculosis years is the main cause of morbidity and death among patients with HIV infection. Modern diagnostics of tuberculosis includes mass screening of the population: digital fluorography from the age of 15 and immunodiagnostics in children and adolescents. Detection of mycobacterium tuberculosis by microscopy occurs in forms of tuberculosis with the decay of lung tissue. Such patients represent a high epidemic risk. To improve the verification of diagnosis in the practice of a phthisiologist, molecular genetic methods for the search for mycobacteria are increasingly used, based on the identification of specific fragments of the DNA chain in the diagnostic material. The most widely used method is the polymerase chain reaction (PCR), which is based on directed DNA amplification. The latest innovation is fully automated systems using cartridge technology GeneXpert. The advantages of GeneXpert are high sensitivity, speed (result in 2 hours), real-time PCR detection, exclusion of sample contamination. The technique of cartridge technology is constantly being improved, various cartridges are used on its platform, which not only detect *M. tuberculosis*, but also determine the sensitivity to anti-tuberculosis drugs – rifampicin (MTB / RIF cartridge) or several anti-TB drugs (MTB / XDR). Cartridges have been developed that are able to detect Mycobacterium tuberculosis (MBT) at an even lower concentration in the test material – MTB / RIF (Ultra). GeneXpert technology can be used to diagnose extrapulmonary tuberculosis by examining various biological materials, which are more effective in detecting tuberculosis in children and adolescents, in HIV-positive individuals.*

Key words: review; GeneXpert; MTB/RIF; MTB/RIF (Ultra); MTB/XDR; sensitivity.

For citation: Borodulina E.A., Piskun V.V., Uraksina M.V., Shubina A. T. Molecular genetic tests GeneXpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF (Ultra) in the diagnosis of tuberculosis (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 544-549 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-544-549>

For correspondence: Borodulina E. A., MD, Professor, Head of the Department of Phthisiology and Pulmonology; e-mail: borodulinbe@yandex.ru

Information about authors:

Borodulina E.A., <https://orcid.org/0000-0002-3063-1538>;
Piskun V.V., <https://orcid.org/0000-0003-3246-4953>;
Uraksina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-6682-2440>;
Shubina A.T., <https://orcid.org/0000-0002-8096-7611>.

Conflict of interests. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 01.04.2022

Accepted 26.05.2022

Published 12.09.2022

Туберкулёз – заболевание, вызываемое микобактериями *Mycobacterium tuberculosis complex*. Методом своевременного выявления локальных форм поражения лёгких является скрининг населения с 15 лет и старше с помощью флюорографии органов грудной клетки. «Золотой стандарт» диагностики – культивирование микобактерий на питательных средах применяется только в специализированных противотуберкулёзных учреждениях, требует длительного времени, не всегда позволяет верифицировать туберкулёз, не применимо на этапе первичного звена здравоохранения. Для диагностики туберкулёза актуальна разработка и внедрение быстрых высокочувствительных методов. Создаваемые в последние годы молекулярно-генетические тесты изменяют диагностику туберкулёза, обеспечив лучшее выявление туберкулёза и являются перспективными для лиц с выраженной иммуносупрессией, как группы особого риска по туберкулёзу. Изучены данные литературы по определению места молекулярно-генетических тестов в диагностике туберкулёза в современных условиях. Поиск литературы осуществлялся по базам данных РИНЦ, CyberLeninka, Scopus, Web of Science, MedLine, PubMed, Google Scholar. Для поиска статей применялись ключевые слова: диагностика туберкулёза, бактериоскопия мокроты, Xpert MTB/RIF, *M. tuberculosis*, HIV-infection, TB/HIV и др. Проработано 59 публикаций, из которых 47 включены в окончательную базу данных.

Туберкулёз остается глобальной проблемой для здоровья человека, являясь второй причиной смерти среди инфекционных болезней после ВИЧ-инфекции [1-3]. Текущими задачами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) являются задачи ликвидации эпидемии туберкулёза к 2035 году. На данный момент продолжает доминировать выявление больных туберкулёзом при самостоятельном обращении пациента с жалобами и проявлениями заболевания разной степени выраженности в первичное звено здравоохранения. На начальном этапе заболевания туберкулёз часто принимают за внебольничную пневмонию. Клинический анализ крови не позволяет провести дифференциальную диагностику внебольничной пневмонии и туберкулёза, так как не имеет специфических изменений [4]. Особенностью микобактериальной инфекции является длительное бессимптомное течение, в результате чего треть случаев пропускается на начальном этапе заболевания [5-10]. Несвоевременное выявление больных ведёт к распространению туберкулёза среди членов семей и сообществ, что увеличивает заболеваемость на 3 млн случаев в год [5]. С целью коррекции сложившейся ситуации и дополнения «пассивной» диагностики туберкулёза предложена «активная» диагностика туберкулёза. Она открывает возможности ранней диагностики для лечения туберкулёза, что обеспечивает

борьбу с туберкулёзом на популяционном уровне [11]. Данная диагностика должна быть направлена на лиц с высоким риском инфицирования. Отличие активной диагностики от пассивной в том, что в её основе лежит скрининг, а не самостоятельное обращение пациента при развившихся клинических признаках [5, 12]. Скрининг включает плановую флюорографию, и если на снимке имеются изменения, то выполняют микроскопическое исследование мокроты [1, 5]. Микроскопия остается самым распространённым методом диагностики туберкулёза, позволяя установить диагноз до 68% случаев [1]. Золотым стандартом диагностики туберкулёза остаются методы, основанные на культивировании микобактерий туберкулёза. Микроскопия мокроты не всегда позволяет установить диагноз туберкулёза, а определение чувствительности к противотуберкулёзным препаратам (ПТП) на жидких/плотных питательных средах ещё больше отсрочивает лечение туберкулёза [1, 13-16]. В дальнейшем это приводит к распространению инфекции и развитию лекарственной устойчивости. Важной частью стратегии ВОЗ является разработка быстрых диагностических тестов туберкулёза, что обеспечит своевременное лечение и снизит смертность, распространение среди здорового населения [17]. Скрининг должен давать быстрый, точный и развёрнутый результат. С целью разрешения проблемы диагностики разработаны молекулярные методы, в основе которых лежит амплификация нуклеиновой кислоты – к ним относится GeneXpert MTB/RIF [1, 5, 6, 13, 17, 18]. Тесты амплификации нуклеиновых кислот применяют с 1990-х годов, ранее они были ограничены высокой стоимостью и необходимостью специальной подготовки сотрудников. GeneXpert представляет собой полностью автоматизированную систему, в основе которой лежит ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Она выдает результат в течение 2-х часов и может выполняться персоналом с минимальной подготовкой [17]. Тест-система GeneXpert MTB/RIF позволяет амплифицировать геномную ДНК с помощью ПЦР и идентифицировать большинство клинически значимых мутаций гена *rpoB*, индуцирующих устойчивость к рифампицину. ВОЗ внедрила эту технологию в 2010 г. для ранней диагностики и определения устойчивости к рифампицину [1, 17]. В свою очередь невосприимчивость МБТ к рифампицину может быть косвенным признаком множественной лекарственной устойчивости, так как эта закономерность прослеживается у 95% штаммов МЛУ-ТБ [1]. Он выступает основным методом скрининга, если у пациента отсутствует соответствующая симптоматика, а рентгенологическая картина неясная или же имеется соответствующая клиника при отрицательной бактериоскопии. Применение Xpert MTB/RIF в долгосрочной перспективе может

оказать существенное влияние на снижение заболеваемости ТБ и, как следствие, уменьшение затрат на борьбу с ним [3, 17-19].

GeneXpert не может быть более чувствительным, чем культуральное исследование [20,21]. Имеются сведения, что при обследовании образцов мокроты методом Xpert и культуральным, больше положительных показателей предоставил первый метод [20]. В ходе проспективного исследования выяснено, что процент отрицательного результата при посеве слюнной мокроты выше, чем при посеве слизистой мокроты [20,22]. Выявлено, что пациенты, которые ранее прошли лечение туберкулёза, с большей вероятностью дают отрицательный результат посева в случае повторного заражения. GeneXpert в таких случаях оказался более чувствительным и показал положительный результат как при исследовании слюнной мокроты, так и при исследовании образца от переболевшего пациента.

Xpert MTB/RIF рекомендован как исследование первой линии при обследовании лиц с высоким риском туберкулёза, например, с ВИЧ инфекцией [5, 9, 13, 17, 23, 24]. В Малави при высокой смертности от туберкулёза у ВИЧ-инфицированных при внедрении молекулярно-генетического метода исследования уменьшились сроки диагностики, повысилась выявляемость, что привело к раннему лечению с учётом чувствительности микобактерий к ПТП. При сравнении методов диагностики 348 образцов установлено, что метод Xpert MTB/RIF выявил на 58 случаев туберкулёза больше по сравнению с микроскопией мокроты. Чувствительность и специфичность метода Xpert MTB/RIF у ВИЧ-положительных пациентов 90.0(82.4-95.1)% и 96.0(90.1-98.9)% и ВИЧ-отрицательных 97.9(92.5-99.7)% и 100(93.4-100)%, соответственно, чем при микроскопии мазка мокроты. Чувствительность к *M. tuberculosis* метода Xpert MTB/RIF в образцах от ВИЧ-инфицированных значительно превосходит чувствительность при микроскопии (51.5 (41.4-61.4)%) в таких же случаях. В итоге получен результат, что Xpert MTB/RIF увеличил выявление случаев туберкулёза на 31% в данном исследовании [13,25]. Имеются исследования, в которых процент диагностики увеличивается до 50% при применении молекулярно-генетического метода [26,27]. Данный метод выявил у 89% пациентов устойчивость *M. tuberculosis* к рифампицину, что позволило сразу начать лечение препаратами второй линии. Это сократило срок начала лечения второй линией до одной недели с 1-1,5 месяцев [13, 28].

В другом исследовании отобрано 233 образца мокроты из 268. При микроскопии образцов выявлено 61 (26,2%) положительных проб, в 172 пробах (73,8%) МБТ не обнаружены; в то время как при использовании MTB/RIF МБТ выявлены в 86 (36,9%) случаях и в 147 (63,1%) результат оказался отрицательным. Выявлено 7 положительных образцов при помощи культивирования, которые являлись отрицательными при применении микроскопии и GeneXpert. Данный факт может быть связан с минимально определяемой концентрацией МБТ – для культивирования она составляет 10-100 КОЕ/мл, для картриджа MTB/RIF 131 КОЕ/мл. В 10 случаях отмечалась устойчивость к рифампицину. Дальнейшее исследование при помощи LPA установило, что в 9 из 10 образцов имела место МЛУ [1].

Применение Xpert MTB/RIF возможно не только для исследования образцов из лёгких, но и других материалов, например, спинномозговой жидкости. Имеется

ограничение, которое выражается в снижении чувствительности при применении стандартного картриджа для исследования образцов из других локусов. Тем не менее, если при исследовании СМЖ результат окажется положительным, то он будет иметь важное клиническое значение [29-33]. ВОЗ не рекомендует использовать Xpert для образцов мочи, крови, стула из-за отсутствия адекватных доказательств [34]. Имеется исследование 2019 г., обнаружившее, что чувствительность Xpert MTB/RIF при исследовании кала составила 67% по сравнению с эталонным исследованием, включающим посев биоматериала из респираторного тракта или Xpert MTB/RIF [35].

ВОЗ выступает за расширение возможностей выявления лекарственно-устойчивого туберкулёза. Новые технологии играют ключевую роль в улучшении диагностики, назначении рационального лечения и как результата окончательной ликвидации туберкулёза [29,36].

При отсутствии в большинстве случаев фенотипического теста на лекарственную устойчивость к этионамиду, на первое место выступают генотипические методы [29, 37].

Установка GeneXpert может использовать разные картриджи, основной – MTB/RIF, позволяющий выявить микобактерии туберкулёза и их устойчивость к рифампицину. В Калифорнии (США) внедрён новый картридж – MTB/XDR, который по достоинству оценён фтизиатрическим сообществом. Xpert MTB/XDR детектирует устойчивость к изониазиду, этионамиду, фторхинолонам и препаратам второй линии. Данное исследование позиционирует себя как дополнение к основному Xpert MTB/RIF, который хорошо себя зарекомендовал в диагностике туберкулёза и назначении рационального и своевременного лечения [29,30,38]. Золотым стандартом теста на лекарственную устойчивость являются фенотипические и генотипические методы, однако их применение ограничено. Прибегают к MTBDRsl, где применение ограничено необходимостью специализированной инфраструктуры и хорошо оборудованных центров [29,39]. Оптимизации лечения можно добиться именно дополнением Xpert MTB/XDR к Xpert MTB/RIF. Преимущества картриджа MTB/XDR заключаются в определении мутаций, которые позволяют идентифицировать резистентность к изониазиду, этионамиду, фторхинолонам и препаратам второй линии. Техника выполнения не отличается от Xpert MTB/RIF, возможно применение его в «полевых» условиях, быстрое получение результата. Анализ может быть готов в течение 90 мин, что значительно превосходит культуральный метод исследования, при котором результат будет получен через несколько недель. ВОЗ придаёт важное значение применению фторхинолонов при лечении ТБ с МЛУ [29,40]. Поскольку новый картридж позволяет определять устойчивость к фторхинолонам, он имеет решающее значение в лечении МЛУ-ТБ. Xpert MTB/XDR имеет чувствительность 91,4%, специфичность 98,5% в отношении диагностики устойчивости к фторхинолонам. Данные значения приближены к показателям, установленным ВОЗ для быстрого определения лекарственной устойчивости [29,41].

В марте 2017 г. внедрён метод Xpert MTB/RIF (Ultra) после проведения исследований в 10 центрах в 8 странах [17]. Его преимущество по сравнению с обычным Xpert MTB/RIF в том, что в картридже применяются камеры большего размера, за счёт чего вмещается больший объём исследуемого образца, больше генети-

ческого материала; добавлены 2 молекулярные мишени. Данные изменения привели к снижению минимального числа обнаруживаемых бактерий со 131 для картриджа MTB/RIF до 16 для картриджа MTB/RIF (Ultra) [17,42]. Новый картридж полностью совместим с уже существующей платформой Xpert.

Во время исследований при сравнении двух систем установлено, что Xpert MTB/RIF (Ultra) обладает большей чувствительностью при сравнительном анализе с Xpert *in vitro* [17,43]. Специфичность у Ultra может быть ниже, чем у Xpert, что связано с излеченным туберкулезом в анамнезе (остатки ДНК или нежизнеспособные микобактерии туберкулеза). Эксперты полагают, что при обследовании лиц с туберкулезом в анамнезе необходимо подтверждение результата альтернативным способом. При обработке данных 19 исследований, в которых изучено 5855 образцов при помощи двух методов, получены такие результаты: чувствительность и специфичность MTB/RIF составила 0.69 (95% CI: 0.57-0.78) и 0.99 (95% CI: 0.98-0.99) соответственно, в то время как для второго метода – 0.84 (95% CI: 0.76-0.90) и 0.97 (95% CI: 0.96-0.98) [43]. Более высокая чувствительность позволяет применять Ultra для достоверной диагностики туберкулеза с незначительным бактериовыделением, например, туберкулезного плеврита, туберкулезного менингита, туберкулеза у детей [17,43].

Туберкулез – проблема не только взрослых, но и детей. Каждый год не менее 1 млн детей заболевают ТБ и около 200 тыс. умирают [35, 42]. Трудности диагностики туберкулеза у детей связаны с разнообразными проявлениями из-за высокой доли внелёгочных случаев туберкулеза, логистическими проблемами получения подходящих образцов (ребёнок часто не может добровольно откашливать мокроту), определёнными трудностями чтения рентгенограмм грудной клетки у детей, «малобациллярная» природа заболевания. 96% смертей детей с туберкулезом происходит до начала противотуберкулезного лечения, что указывает на серьёзные проблемы в диагностике [17].

Xpert MTB / RIF и Xpert Ultra рекомендованы ВОЗ как быстрые молекулярные тесты для диагностики туберкулеза у ВИЧ-инфицированных и детей, как более чувствительные [24,35]. Проведено сравнение чувствительности данного метода у ВИЧ-отрицательных и ВИЧ-положительных детей 68% и 67%, соответственно, что свидетельствует о незначительной разнице [24].

Возможно использование Ultra и для диагностики внелёгочного туберкулеза, используя СМЖ, аспират ЛУ и другие образцы тканей [34]. Для диагностики туберкулезного менингита рекомендуется Ultra. По данным исследований его чувствительность составляет 95% по сравнению с 45% Xpert или посева.

Для оптимизации производительности Xpert или Ultra большие объёмы следует концентрировать центрифугированием [44]. Чувствительность молекулярно-генетического теста может быть повышена не только применением нового картриджа MTB/RIF Ultra или простым центрифугированием, но и путём специальной обработки образца. Исследования показали, что применение гипохлорита натрия (NaOCl) и гранулирование улучшают чувствительность Xpert по сравнению с необработанной мокротой 73,8% против 63,2%, в то время как специфичность не изменялась и в обоих случаях составила 95% [18]. Концентрированную мокроту получают путём добавления ко второй части утреннего образца

5% отбеливателя равного объёма. Пробирку перемешивают и оставляют на 15 мин при комнатной температуре и встряхивают 30 с каждые 5 минут. В пробирку добавляют PBS, доводя объём до 15 мл, и центрифугируют 3000 оборотов в течение 15 минут. Осадок ресуспендируют в 1 мл стерильного PBS (pH=6,8). Реагент образца добавляется в отношении 3:1, интенсивно встряхивается 15 секунд. Далее исследование происходит стандартно через систему Xpert.

Увеличение чувствительности – не единственный положительный эффект от применения гипохлорита натрия. Он снижает риск лабораторного заражения, так как является сильнодействующим дезинфицирующим средством. Что касается экономической целесообразности: NaOCl дешев и доступен практически везде в качестве бытового отбеливателя, но значительно улучшает диагностику «малобациллярного» туберкулеза.

Использование молекулярно-генетического теста GeneXpert MTB/RIF ограничено в странах с низким и средним уровнем доходов, что связано со стоимостью картриджа и необходимостью калибровки и переоборудования приборов Xpert. Для установки данного оборудования оно должно быть релевантным, поэтому в районах с плохой инфраструктурой, финансовыми, техническими и материальными ограничениями его применение пока ограничено [5,29,45]. Из других молекулярно-генетических методов возможно применение мультикомплексной ПЦР-РВ [46,47]. Несмотря на такие недостатки мультикомплексной ПЦР-РВ, как необходимость в высокотехнологичном оборудовании и высококвалифицированных специалистах, этот метод позволяет в течение нескольких часов одновременно амплифицировать в исследуемом материале (в одной пробирке) ДНК микобактерий и выявлять мутации по генам *katG*, *inhA* (детерминируют устойчивость к изониазиду), *rpoB* (к рифампицину), *gyrA*, *gyrB* (к фторхинолонам) и, соответственно, идентифицировать МЛУ и ШЛУ штаммы, тогда как для определения МЛУ и ШЛУ МБТ на основе картриджной технологии необходимо использовать не только тест-системы GeneXpert MTB/RIF и Xpert MTB/RIF (Ultra), но и картридж – MTB/XDR. Просматривается перспективность применения этих методов в общей лечебной сети, пульмонологической и фтизиатрической практике на этапе первичного обследования пациентов с рисками туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 5-9, 13-15, 17-45 см. REFERENCES)

3. Бородулина Е.А., Маткина Т.Н., Вдоушкина Е.С. Причины смерти больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом. *Туберкулез и болезни легких*. 2015; (5):44-5.
4. Шубина А.Т., Бородулина Е.А., Кудлай Д.А., Герасимов А.Н., Яковлева Е.В. Клинический анализ крови при дифференциальной диагностике туберкулеза легких и внебольничной пневмонии у пациентов с ВИЧ-инфекцией. *Вестник современной клинической медицины*. 2022; 15(1): 7-16. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).7-16.
10. Бородулина Е., Скопцова Н., Бородулин Б., Амосова Е., Поваляева Л. Сложности диагностики туберкулеза. *Врач*. 2018; (2): 30-32. DOI: 10.29296/25877305-2018-02-07.
11. Бородулина Е.А., Кудлай Д.А., Власова Б., Кузнецова А.Н. Возможности тестов *in vitro* в диагностике туберкулеза (обзор литературы) *Медицинский Альянс*. 2021; 9(2): 15-21. DOI: 10.36422/23076348-2021-9-2-15-21.
12. Бородулина Е.А., Поваляева Л.В., Бородулина Э.В., Вдоушкина Е.С., Бородулин Б.Е. Проблема диагностики туберку-

- леза в практике врача-пульмонолога. *Вестник современной клинической медицины*. 2017; 10(1): 89-93. DOI: 10.20969/VSKM.2017.10(1).89-93.
16. Шубина А.Т., Бородулина Е.А., Герасимов А.Н., Яковлева Е.В. Туберкулез легких в пульмонологической практике. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41(3): 78–84. DOI: 10.18699/SSMJ20210311.
 46. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Распространенность мутаций в генах микобактерий туберкулеза, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду и рифампицину, у больных туберкулезом в разных возрастных группах. *Туберкулез и болезни легких*. 2019; 97 (4): 12-8. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-4-12-18.
 47. Аляпкина Ю.С., Алексеев Я.И., Варламов Д.А., Домотенко Л.В., Шипина Л.К., Владимирский М.А. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам резервного ряда: фторхинолонам, амикацину и капреомицину. *Туберкулез и болезни легких*. 2014;(12):69-75.
-
- ## REFERENCES
1. Yasemin A., Ahmad S., Afzal S., Ullah A., Sheed, A. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF Assay for Detection of Pulmonary Tuberculosis on Sputum Samples. *Journal of the College of Physicians and Surgeons—Pakistan*. 2019; 29(1): 66-9. DOI: 10.29271/jcpsp.2019.01.66.
 2. Li S., Liu B., Peng M., Chen M., Yin W., Tang H. et al. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2017; 12(7): e0180725. DOI: 10.1371/journal.pone.0180725.
 3. Borodulina E.A., Matkina T.N., Vdoushkina E.S. Causes of death in patients with HIV infection and tuberculosis. *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2015; (5):44-5. (in Russian)
 4. Shubina A.T., Borodulina E.A., Kudlai D.A., Gerasimov A.N., Yakovleva E.V. GX technologies for rapid diagnosis of tuberculosis in general healthcare network. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2022; 15(1): 7-16. DOI: 10.20969/VSKM.2022.15(1).7-16. (in Russian)
 5. Ho J., Fox G.J., Marais B.J. Passive case finding for tuberculosis is not enough. *Int. J. Mycobacteriol*. 2016; 5(4): 374-378. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.09.023.
 6. WHO, Systematic Screening for Active Tuberculosis (2013).
 7. Onozaki I., Law I., Sismanidis C., Zignol M., Glaziou P., Floyd K. National tuberculosis prevalence surveys in Asia, 1990–2012: an overview of results and lessons learned. *Trop. Med. Int. Health*. 2015; 20(9): 1128–45. DOI: 10.1111/tmi.12534.
 8. Report FIRST National TB Prevalence Survey 2012, Nigeria.
 9. Balcha T.T., Sturegård E., Winqvist N., Skogmar S., Reepalu A., Jemal ZH. et al. Intensified Tuberculosis Case-Finding in HIV-Positive Adults Managed at Ethiopian Health Centers: Diagnostic Yield of Xpert MTB/RIF Compared with Smear Microscopy and Liquid Culture. *PLoS ONE*. 2014; 9(1): e85478. DOI: 10.1371/journal.pone.0085478.
 10. Borodulina E., Skoptsova N., Borodulin B., Amosova E., Povalyayeva L. Difficulties of tuberculosis diagnosis. *Vrach*. 2018; (2): 30-2. DOI: 10.29296/25877305-2018-02-07. (in Russian)
 11. Borodulina E.A., Kudlai D.A., Vlasova B., Kuznetsova A.N. Potential use of in vitro tests in the diagnosis of tuberculosis (literature review). *Meditsinskiy Al'yans*. 2021; 9(2): 15-21. DOI: 10.36422/23076348-2021-9-2-15-21. (in Russian)
 12. Borodulina E.A., Povalyayeva L.V., Borodulina E.V., Vdoushkina E.S., Borodulin B.E. Problem of tuberculous detection in pulmonologist's practice. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2017; 10(1): 89-93. DOI: 10.20969/VSKM.2017.10(1).89-93. (in Russian)
 13. Chikaonda T., Nguluwe N., Barnett B., Gokhale R., Krysiak R., Thengolose I. et al. Performance of Xpert® MTB/RIF among tuberculosis outpatients in Lilongwe, Malawi. *African Journal of Laboratory Medicine*. 2017; 6(2), a464. DOI: 10.4102/ajlm.v6i2.464.
 14. Malawi National Tuberculosis Programme. National tuberculosis control programme manual. 7th ed. Lilongwe, Malawi: Ministry of Health; 2012.
 15. Rachow A, Zumla A, Heinrich N, Rojas-Ponce G, Mtafya B, Reither K, et al. Rapid and accurate detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay—a clinical validation Study. *PLoS One*. 2011; 6(6): e20458. DOI: 10.1371/journal.pone.0020458.
 16. Shubina A.T., Borodulina E.A., Gerasimov A.N., Yakovleva E.V. Pulmonary tuberculosis in clinical practice. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*. 2021; 41(3): 78–84. DOI: 10.18699/SSMJ20210311. (in Russian)
 17. Atherton R.R., Cresswell F.V., Ellis J., Kitaka S.B., Boulware D.R. Xpert MTB/RIF Ultra for Tuberculosis Testing in Children: A Mini-Review and Commentary. *Front. Pediatr*. 2019; 7: 34. DOI: 10.3389/fped.2019.00034.
 18. Tadesse M., Aragaw D., Rigouts L., Abebe G. Increased detection of smear-negative pulmonary tuberculosis by GeneXpert MTB/RIF® assay after bleach concentration. *Int. J. Mycobacteriol*. 2016; 5(2): 211-8. DOI: 10.1016/j.ijmyco.2016.03.005.
 19. Azman A.S., Golub J.E., Dowdy D.W. How much is tuberculosis screening worth? Estimating the value of active case finding for tuberculosis in South Africa, China, and India. *BMC Med*. 2014; 12: 216. DOI: 10.1186/s12916-014-0216-0.
 20. Shi J., Dong W., Ma Y., Liang Q., Shang Y., Wang F. et al. GeneXpert MTB/RIF Outperforms Mycobacterial Culture in Detecting Mycobacterium tuberculosis from Salivary Sputum. *BioMed. Research International*. 2018; 2018: 5. DOI: 10.1155/2018/1514381.
 21. Marlowe E. M., Novak-Weekley S. M., Cumpio J., Sharp S.E., Momeny M.A., Babst A. et al. Evaluation of the cepheid xpert MTB/RIF assay for direct detection of mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(4): 1621–3. DOI: 10.1128/JCM.02214-10.
 22. Acuña-Villaorduña C., Orikiriza P., Nyehangane D., White L.F., Mwanga J., Kim S.H. et al. Effect of previous treatment and sputum quality on diagnostic accuracy of XpertW MTB/RIF. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2017; 21(4): 389–97. DOI: 10.5588/ijtld.16.0785.
 23. Al-Darraj H.A., Abd Razak H., Ng K.P., Altice F.L., Kamarulzaman A. The diagnostic performance of a single GeneXpert MTB/RIF assay in an intensified tuberculosis case finding survey among HIV-infected prisoners in Malaysia. *PLoS One*. 2013; 8(9): e73717. DOI: 10.1371/journal.pone.0073717.
 24. Dorman S.E., Schumacher S.G., Alland D., Nabeta P., Armstrong D.T., King B. et al. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study. *Lancet Infect. Dis*. 2018; 18: 76–84. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30691-6.
 25. Geleta D.A., Megerssa Y.C., Gudeta A.N., Akalu G.T., Debele M.T., Tulu K.D. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis in sputum specimens in remote health care facility. *BMC Microbiol*. 2015; 15: 220. DOI: 10.1186/s12866-015-0566-6.
 26. Hmwe H.K., Maddison E.R., Nathaniel J.H., Mumford J.U., Barber R., Shields C. et al. The global burden of tuberculosis: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Infect. Dis*. 2019; 18(3): 261-84. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30703-X.
 27. Calligaro G.L., Zijenah L.S., Peter J.G., Theron G., Buser V., McNerney R. et al. Effect of new tuberculosis diagnostic technologies on community-based intensified case finding: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis*. 2017; 17(4): 441-50. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30384-X.
 28. Hargreaves N.J., Kadzakumanja O., Whitty C., Salaniponi F.M.L., Harries A.D., Squire S.B. ‘Smear-negative’ pulmonary tuberculosis in a DOTS programme: Poor outcomes in an area of high HIV seroprevalence. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2001; 5(9): 847–54.
 29. Bainomugisa A., Gilpin C., Coulter C., Marais B.J. New Xpert MTB/XDR: added value and future in the field. *Eur. Respir. J*. 2020; 56(5): 2003616. DOI: 10.1183/13993003.03616-2020.
 30. Cao Y., Parmar H., Gaur R.L., Lieu D., Raghunath S., Via N. et al. Xpert MTB/XDR: a ten-color reflex assay suitable for point of care

- settings to detect isoniazid, fluoroquinolone, and second line injectable drug-resistance directly from *Mycobacterium tuberculosis* positive sputum. *J. Clin. Microbiol.* 202; 59(3): e02314-20. DOI: 10.1128/JCM.02314-20.
31. Ligthelm L.J., Nicol M.P., Hoek K.G., Jacobson R.K., Helden P., Marais B. et al. Xpert MTB/RIF for rapid diagnosis of tuberculous lymphadenitis from fine-needle-aspiration biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 3967–70. DOI: 10.1128/JCM.01310-11.
32. Denkinger C.M., Schumacher S.G., Boehme C.C., Dendukuri N., Pai M., Steingart K.R. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.* 2014; 44(2): 435–46. DOI: 10.1183/09031936.00007814.
33. Xie Y.L., Chakravorty S., Armstrong D.T., Hall S.L., Via L.E., Song T. et al. Evaluation of a rapid molecular drug-susceptibility test for tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377: 1043–54. DOI: 10.1056/NEJMoa1614915.
34. WHO. Policy Update: Xpert MTB/RIF Assay for the Diagnosis of Pulmonary and Extrapulmonary TB in Adults and Children. Geneva; 2014.
35. Kay A.W., González Fernández L., Takwoingi Y., Eisenhut M., Detjen A.K., Steingart K.R. et al. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra assays for active tuberculosis and rifampicin resistance in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2020; 8(8): CD013359. DOI: 10.1002/14651858.CD013359.pub2.
36. Lönnroth K., Migliori G.B., Abubakar I., D'Ambrosio L., de Vries G., Diel R. et al. Towards tuberculosis elimination: an action framework for low-incidence countries. *Eur. Respir. J.* 2015; 45(4): 928–52. DOI: 10.1183/09031936.00214014.
37. Van Ingen J., Simons S., De Zwaan R., Van Der Laan T., Kamst-van Agterveld M., Boeree M.J. et al. Comparative study on genotypic and phenotypic second-line drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2749–53. DOI: 10.1128/JCM.00652-10.
38. Chakravorty S., Roh S.S., Glass J., Smith L.E., Simmons A.M., Lund K. et al. Detection of isoniazid-, fluoroquinolone-, amikacin-, and kanamycin-resistant tuberculosis in an automated, multiplexed 10-color assay suitable for point-of-care use. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 55(1): 183–98. DOI: 10.1128/JCM.01771-16.
39. Tomasicchio M., Theron G., Pietersen E., Streicher E., Stanley-Josephs D., van Helden P. et al. The diagnostic accuracy of the MTB-DRplus and MTBDRsl assays for drug-resistant TB detection when performed on sputum and culture isolates. *Sci. Rep.* 2016; 6: 17850. DOI: 10.1038/srep17850.
40. World Health Organization. WHO Consolidated Guidelines on Drug-resistant Tuberculosis Treatment. <https://www.who.int/tb/publications/2019/consolidated-guidelines-drug-resistant-TB-treatment/en/> Last updated: January 2021.
41. World Health Organization. High-priority Target Product Profiles for New Tuberculosis Diagnostics: Report of a Consensus Meeting. https://www.who.int/tb/publications/tpp_report/en/ Last updated: January 2021.
42. Chakravorty S., Simmons A.M., Rowneki M., Parmar H., Cao Y., Ryan J. et al. The new xpert MTB/RIF ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio.* 2017; 8(4): e00812–17. DOI: 10.1128/mBio.00812-17.
43. Jiang J., Yang J., Shi Y., Jin Y., Tang S., Zhang N. et al. Head-to-head comparison of the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for tuberculosis: a meta-analysis. *Infectious Diseases.* 2020; 52(11): 763-75. DOI: 10.1080/23744235.2020.1788222.
44. Bahr N.C., Tugume L., Rajasingham R., Kiggundu R., Williams D.A., Morawski B. et al. Improved diagnostic sensitivity for tuberculous meningitis with Xpert® MTB/RIF of centrifuged CSF. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2015; 19(10): 1209–15. DOI: 10.5588/ijtld.15.0253.
45. Pooran A., Theron G., Zijenah L., Chanda D., Clowes P., Mwenge L. et al. Point of care Xpert MTB/RIF versus smear microscopy for tuberculosis diagnosis in southern African primary care clinics: a multicentre economic evaluation. *Lancet Glob. Health.* 2019; 7(6): e798–e807. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30164-0.
46. Salina T.Yu., Morozova T.I. Prevalence of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genes coding resistance to isoniazid and rifampicin in tuberculosis patients from different age groups. *Tuberkulez I bolezni legkikh.* 2019; 97 (4): 12-8. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-4-12-18. (in Russian)
47. Alyapkina Yu.S., Alekseev Ya.I., Varlamov D.A., Domotenko L.V., Shipina L.K., Vladimirkii M.A. Development of real-time pcr technology for the rapid detection of mycobacterium tuberculosis resistance to reserve antituberculosis drugs: fluoroquinolones, amikacin, and capreomycin. *Tuberkulez I bolezni legkikh.* 2014; (12):69-75. (in Russian)

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Домотенко Л.В.¹, Миронов А.Ю.², Косилова И. С.¹, Шепелин А.П.¹

СТАНДАРТНОСТЬ ДИСКОВ С АНТИМИКРОБНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ В СВЕТЕ ИМПОРТОЗАМЕЩЕНИЯ

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Россия;

²Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

В связи с введением экономических санкций в отношении Российской Федерации со стороны США, стран Евросоюза, Японии, ряда других стран импортозамещение становится одной из стратегических задач Российской экономики. Приведена сравнительная оценка стандартности и эффективности коммерческих дисков с шестью антимикробными препаратами (АМП) различных фирм-производителей с использованием клинических и тест-штаммов микроорганизмов. Оценка проведена на основании анализа коэффициента вариации (Cv) диаметров зон подавления роста, средних значений и диапазонов значений диаметров, которые являются мерой воспроизводимости, точности и эффективности, соответственно. Исследованные диски производства BD BBL приводят к незначительным вариациям диаметров зон и позволяют получать точные и воспроизводимые результаты. Доступные на отечественном рынке импортные диски из дружественной страны, производства HiMedia отличаются большей вариативностью и уступают по качеству дискам производства BD BBL. Часть отечественных дисков показывает удовлетворительные результаты, но диски с имипенемом, меропенемом, ципрофлоксацином, гентамицином не отличаются стандартностью и не позволяют получать воспроизводимые результаты. Для получения достоверных результатов антибиотикочувствительности возбудителей инфекции проведение входного и повседневного контроля качества дисков с АМП должно стать обязательной процедурой в каждой бактериологической лаборатории.

Ключевые слова: чувствительность к антибиотикам; диски с антимикробными препаратами; диско-диффузионный метод; коэффициент вариации; импортозамещение.

Для цитирования: Домотенко Л. В., Миронов А. Ю., Косилова И. С., Шепелин А. П. Стандартность дисков с антимикробными препаратами различных производителей в свете импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 550-556. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-550-556>

Для корреспонденции: Домотенко Любовь Викторовна, канд. хим.наук, вед. науч. сотр. лаб. разработки питательных сред; e-mail: domotenko@list.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 18.06.2022

Принята к печати 24.06.2022

Опубликовано 12.09.2022

Domotenko L. V.¹, Mironov A. Yu.², Kosilova I. S.¹, Shepelin A. P.¹

STANDARDNESS OF ANTIMICROBIAL DISCS BY VARIOUS MANUFACTURERS IN THE LIGHT OF IMPORT SUBSTITUTION

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, 142279, Obolensk, Serpukhov c.d., Moscow region, Russia;

²G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia

In connection with the introduction of economic sanctions against the Russian Federation by the United States, the European Union, Japan, and a number of other countries, import substitution is becoming one of the strategic objectives of the Russian economy. The comparative assessment of standardness and effectiveness of six antimicrobial commercial producer-varying disks for clinical and test strains of microorganisms has been conducted. It is based on analyzing of the variation coefficient (Cv) of inhibition zone diameters, mean values, and diameter values ranges, which are indicators of reproducibility, accuracy and efficiency, respectively. Discs from BD BBL result in insignificant variations of inhibition zone diameters, providing accurate and reproducible data. Imported discs available on the national market from a friendly country produced by HiMedia Company are showed more variation and inferior in quality to BD BBL ones. There are satisfactory results for some domestic discs, but discs with imipenem, meropenem, ciprofloxacin and gentamicin are not standard enough to assure reproducible results. To have reliable data on antibiotic susceptibility of infectious agents, incoming and routine quality control of antimicrobial disks is needed as a compulsory procedure for every bacteriological laboratory.

Key words: antimicrobial susceptibility testing; antimicrobial discs; disc diffusion method; coefficient of variation; import substitution.

For citation: Domotenko L. V., Mironov A. Yu., Kosilova I. S., Shepelin A. P. Standardness of antimicrobial discs by various manufacturers in the light of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 550-556 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-550-556>

For correspondence: Domotenko Lubov` Viktorovna, PhD (Chem), principal investigator, Nutrient medium development laboratory; e-mail: domotenko@list.ru

Information about authors:

Domotenko L.V., <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Kosilova I.S., <https://orcid.org/0000-0003-4020-0894>;
Shepelin A.P., <https://orcid.org/0000-0002-8253-7527>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 18.06.2022

Accepted 24.06.2022

Published 12.09.2022

Введение. Ведущей составляющей санитарно-эпидемиологического надзора за возбудителями инфекционных болезней является система методов и средств их лабораторной диагностики¹ [1, 2]. Быстрая индикация и точная идентификация патогена – основа своевременного проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий с целью предупреждения распространения инфекции, назначения эффективного лечения, предупреждения экономического ущерба от временной потери трудоспособности и смертности заболевшими гражданами².

В связи с введением экономических санкций в отношении Российской Федерации со стороны США, стран Евросоюза, Японии, ряда других стран экспорт продукции для проведения микробиологических исследований ограничен. Это относится к лабораторному оборудованию для микробиологических лабораторий и к расходным материалам: тест-системы для идентификации, иммунореагенты, питательные среды, диски с антимикробными препаратами (АМП), ПЦР-тест-системы и т. д. В новых экономических условиях следует провести ревизию необходимого для микробиологических лабораторий Центров гигиены и эпидемиологии (ФБУЗ ЦГиЭ) Роспотребнадзора, лечебно-профилактических учреждений Минздрава и ФМБА, научно-исследовательских институтов РАН, Роспотребнадзора, Минздрава и др. ведомств лабораторного оборудования и расходных материалов.

Вопросы предупреждения и преодоления устойчивости микроорганизмов к АМП остаются в настоящее время общемировой проблемой³ [3]. Одной из основных причин возникновения устойчивых к АМП микроорганизмов являются необоснованное применение АМП и назначение схем лечения АМП без предварительного проведения тестирования чувствительности к ним [4-6].

Большинство бактериологических лабораторий проводят определение чувствительности микроорганизмов к АМП диско-диффузионным методом (ДДМ) [1]. ДДМ

подходит для исследования большинства бактерий и является универсальным для АМП различных групп, методология тестирования основывается на стандартах EUCAST и CLSI [7; 8].

Достоверность результатов определения чувствительности микроорганизмов к АМП, полученных ДДМ, зависит от способа и техники посева тестируемого микроорганизма, плотности посевного инокулята, качества питательных сред, качества дисков с АМП [1]. Качество дисков с АМП определяется соблюдением технологии их изготовления в промышленных условиях и соблюдением правил их хранения в бактериологических лабораториях.

Влиянию качества дисков с АМП на результаты определения чувствительности микроорганизмов к АМП ДДМ посвящён ряд публикаций [9-14]. Исследовано качество дисков с АМП 16 наименований трёх фирм-производителей Oxoid, HiMedia, Span Diagnostics при определении чувствительности тест-штаммов микроорганизмов [11], в результате которого сделан вывод о несоответствии значений диаметров зон подавления роста исследованных микроорганизмов критериям CLSI в 46,15% случаев при использовании дисков HiMedia, в 26% случаев – дисков Oxoid, в 24% случаев – дисков Span Diagnostics.

В международном исследовании, проведённом в два этапа экспертами EUCAST с 2014 по 2020 гг. [13], показано, что при оценке качества дисков с АМП шестнадцати наименований девяти производителей только диски производства BD, Mast Group, Oxoid продемонстрировали стабильные результаты и хорошее качество на обоих этапах. В ходе второго этапа отмечено значительное улучшение качества дисков, особенно производства BioRad, Liofilchem, Abtek, SirScan, Bioanalyse. Если на первом этапе результаты для 92% проведённых тестов соответствовали допустимому диапазону значений и для 58% тестов соответствовали целевым значениям, то на втором этапе – для 97% и 75% тестов, соответственно. Самые низкие показатели качества отмечены для дисков фирмы HiMedia: значения диаметров зон подавления роста не соответствовали допустимому диапазону во время первого испытания для 33% тестов, во время второго испытания этот показатель снизился до 17%. В данном исследовании отсутствовали диски отечественных производителей.

Хранение дисков при температуре, отличающейся от рекомендуемой производителями, ведёт к снижению активности АМП в диске и получению ложных результатов тестирования, что особенно характерно для дисков с цефалоспоридами и карбапенемами, которые быстрее других подвергаются деградации при хранении [14].

¹ План мероприятий («дорожная карта») по развитию и укреплению системы Федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора на 2021-2028 годы (распоряжение Правительства РФ от 30.12.2020 № 3680-р).

² План мероприятий по реализации Основ государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (распоряжение Правительства РФ от 28.08.2019 № 1906-р).

³ Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года и План её реализации (распоряжения Правительства РФ от 25.09.2017 г. № 2045-р и от 30.03.2019).

Цель исследования: оценка качества дисков с АМП различных производителей, включая отечественные и доступные импортные, при работе с клиническими и тест-штаммами микроорганизмов в соответствии с методологией EUCAST и CLSI.

Материал и методы. В исследовании использован агар Мюллера-Хинтон (BD BBL); диски с АМП трёх фирм-производителей: BD BBL (США), HiMedia (в картриджах) (Индия), НИЦФ (во флаконах) (Россия), – с одинаковой концентрацией АМП каждого наименования: имипенем 10 мкг, меропенем 10 мкг, гентамицин 10 мкг, тобрамицин 10 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, цефепим 30 мкг. Исследованы 4 тест-штамма микроорганизмов: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, и 6 клинических штаммов *P. aeruginosa*, полученных из Ярославской областной инфекционной больницы.

Определение чувствительности микроорганизмов к АМП и интерпретацию результатов проводили в соответствии с актуальными версиями стандартов EUCAST (Version 11.0, 2021) и CLSI (M100, 2020). Посевы инкубировали в соответствии с требованиями стандартов EUCAST и CLSI: при температуре $(35 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение (18 ± 2) ч и при температуре $(35 \pm 2)^\circ \text{C}$ в течение (17 ± 1) ч, соответственно. Для клинических штаммов определяли категорию чувствительности (S, R, I). В соответствии с требованиями обоих стандартов (EUCAST, CLSI) категория S означает, что исследуемый микроорганизм чувствителен к тестируемому АМП при стандартном режиме дозирования, категория R определяет микроорганизм как резистентный. Категория I по EUCAST означает, что исследуемый микроорганизм чувствителен при увеличенной экспозиции АМП; по CLSI – чувствителен при его локализации в тех органах и тканях, в которых возможно формирование высоких концентраций АМП, или при применении последнего в высоких дозах [15; 16].

Качество (стандартность) исследуемых дисков с АМП оценивали по: коэффициенту вариации значений диаметров зон подавления роста (Cv), который является мерой воспроизводимости, средним значениям и диапазонам значений диаметров (от минимального до максимального), являющихся мерой точности и эффективности, соответственно. На одну чашку Петри с питательной средой, засеянной микроорганизмом, наносили по 4 одинаковых диска из одного картриджа или флакона. Тестирование выполняли в 3 повторах. На каждый штамм тестируемо по 12 дисков, взятых из одного флакона или картриджа.

Коэффициент вариации значений диаметров зон подавления роста (Cv) вычисляли по формуле 1. Качество (стандартность) дисков считается неудовлетворительным при значении коэффициента вариации более 5% [11, 17].

$$Cv = \frac{\sigma}{M} \times 100\% \quad (1)$$

где: σ – стандартное отклонение значений диаметров (рассчитано по формуле 2); M – среднее значение диаметров зон подавления роста для каждой комбинации тестируемый микроорганизм-АМП.

Стандартное отклонение (σ) значений диаметров зон определяется насколько полученные значения диаметров зон отличаются от среднего: чем меньше величина стандартного отклонения, тем выше воспроизводимость по-

лучаемых значений диаметров зон [18]. Данный показатель рассчитан по формуле 2:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - M)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

где: x_i – значение диаметра зоны подавления роста каждого тестируемого микроорганизма вокруг диска с АМП; M – среднее значение диаметров зон подавления роста для каждой комбинации тестируемый микроорганизм-АМП; n – количество проведенных тестов для каждой комбинации тестируемый микроорганизм-АМП.

Результаты. Значения коэффициентов вариаций диаметров зон подавления роста для исследованных клинических и тест-штаммов микроорганизмов вокруг дисков с АМП фирм-производителей приведены в табл. 1.

Результаты анализа качества дисков с использованием тест-штаммов. Как следует из табл. 1, значения коэффициентов вариаций для дисков BD BBL, HiMedia находились ниже 5% для клинических и для тест-штаммов микроорганизмов. Если коэффициенты вариации для дисков BD BBL не превышали значение 3,0%, то для дисков HiMedia этот коэффициент варьировался от 3,1% до 3,9%.

Самые высокие значения коэффициента вариации отмечены при работе с дисками НИЦФ. Для трёх исследованных тест-штаммов *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 его значения не превышали 4,8%. Для тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 этот показатель составил 7,9%, что превышает критическое значение 5% [11, 17].

Для тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 в табл. 2 приведены подробные данные контроля качества дисков с имипенемом, меропенемом, ципрофлоксацином, гентамицином, тобрамицином, цефепимом всех производителей. Данные представлены в виде средних, минимальных/максимальных значений диаметров зон подавления роста и коэффициента вариации.

Как следует из табл. 2, в основном, средние значения диаметров зон подавления роста тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученные при использовании дисков с АМП трёх производителей, укладывались в допустимый интервал, кроме дисков с меропенемом (HiMedia). Его величина ниже минимально допустимого

Таблица 1

Коэффициенты вариации результатов тестирования качества дисков с АМП

Штаммы микроорганизмов	BD BBL	HiMedia	НИЦФ
Тест-штаммы микроорганизмов (n=4)			
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,1%	3,3%	4,6%
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	2,3%	3,2%	4,7%
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	2,0%	3,4%	7,9%
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	2,5%	3,6%	4,8%
Клинические штаммы микроорганизмов (n=6)			
<i>P. aeruginosa</i> 624	2,9%	3,6%	5,0%
<i>P. aeruginosa</i> 626	3,0%	3,5%	5,0%
<i>P. aeruginosa</i> 629	2,5%	3,6%	4,9%
<i>P. aeruginosa</i> 631	2,4%	3,1%	4,8%
<i>P. aeruginosa</i> 780	2,8%	3,9%	7,2%
<i>P. aeruginosa</i> 792	3,0%	3,3%	4,9%

значения на 1,5 мм. Средние значения диаметров, соответствующие целевому, получены только для дисков с имипенемом, меропенемом, ципрофлоксацином, гентамицином, цефепимом производства BD BBL.

Диапазоны значений (минимальное/максимальное значение) диаметров зон подавления роста для всех протестированных комбинаций тест-штамм-АМП практически укладывались в интервалы, установленные стандартами EUCAST и CLSI. Исключение составили диски с меропенемом производства HiMedia, для которых минимальное значение диаметра составило 25 мм, что не входит в допустимый интервал (27-33 мм).

Разница между минимальными и максимальными значениями, в основном, не превышала (1-2) мм, кроме комбинаций с дисками НИЦФ, содержащими имипенем, меропенем, ципрофлоксацин, гентамицин. Для них её значение достигало 8-11 мм. Для комбинации *P. aeruginosa* ATCC 27853-меропенем (НИЦФ) минимальное значение диаметра составило 24 мм, максимальное – 35 мм.

Коэффициент вариации значений диаметров зон подавления роста тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг всех исследованных дисков, в основном, был ниже 5%, за исключением дисков с имипенемом, меропенемом, гентамицином, для которых этот показатель значительно превышал критическое значение и составлял 13,45; 14,10; 11,97, соответственно.

Анализ качества дисков с использованием клинических штаммов *P. aeruginosa*. Поскольку при работе с тест-штаммами наибольшие различия в диаметрах зон подавления роста получены для *P. aeruginosa* ATCC

27853, более детально качество дисков проанализировано на клинических изолятах *P. aeruginosa*. Как следует из табл. 1, значения коэффициентов вариаций диаметров зон подавления роста всех клинических штаммов *P. aeruginosa* вокруг дисков BD BBL и HiMedia находились ниже 5% (в диапазоне от 2,4% до 3,9%). Вокруг дисков НИЦФ для пяти штаммов значение C_v близко или равно 5%, для одного штамма *P. aeruginosa* 780 составило 7,2%.

При тестировании чувствительности этого штамма к ряду АМП получены различающиеся между собой значения диаметров зон (максимальная разница достигала 21 мм), приводящие к неоднозначному определению категории чувствительности. Данные тестирования штамма *P. aeruginosa* 780 с использованием дисков с АМП всех трёх производителей приведены на рисунке и в табл. 3.

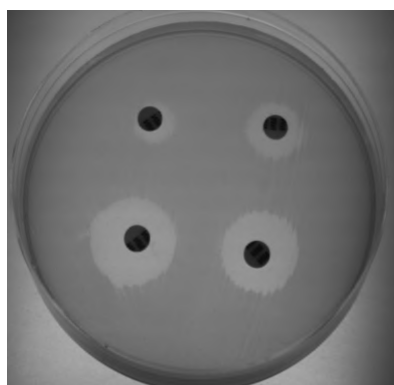
Как следует из табл. 3, незначительные отличия (± 2 мм) значений диаметров зон подавления роста отмечены для дисков BD BBL и HiMedia всех шести наименований, что не вызывает трудностей в определении клинической категории чувствительности к ним исследованного штамма. Значения диаметров зон вокруг 58% дисков с меропенемом производства HiMedia ниже, чем для дисков BD BBL, но эти различия не отразились на результатах определения клинической категории чувствительности. Не возникло затруднений в оценке клинической категории чувствительности штамма к тобрамицину и цефепиму при использовании дисков НИЦФ.

Проблема возникла при определении чувствительности к имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, гентамицину с дисками НИЦФ. Диаметр зон подавления

Таблица 2

Диаметр зон подавления роста *P. aeruginosa* ATCC 27853 для дисков с АМП при тестировании 12 дисков, взятых из одного флакона/картриджа

АМП	Результат тестирования	Производитель дисков			Целевые / допустимые значения диаметров зон по EUCAST и CLSI, мм
		BD BBL	HiMedia	НИЦФ	
Тобрамицин 10 мкг	Среднее значение, мм	22,5	21,4	22,5	
	Минимальное/максимальное значение, мм	22/23	21/23	22/23	23 /20-26
	Коэффициент вариации	2,57	3,48	2,57	
Цефепим 30 мкг	Среднее значение, мм	28,2	26,7	29,5	
	Минимальное/максимальное значение, мм	28/29	26/28	29/30	28 /25-31
	Коэффициент вариации	1,78	3,32	1,96	
Имипенем 10 мкг	Среднее значение, мм	23,7	21,6	27,0	
	Минимальное/максимальное значение, мм	23/24	21/23	21/30	24 /20-28
	Коэффициент вариации	2,18	3,45	13,45	
Меропенем 10 мкг	Среднее значение, мм	30,3	25,5	27,8	
	Минимальное/максимальное значение, мм	29/30	25/27	24/35	30 /27-33
	Коэффициент вариации	1,43	2,97	14,10	
Ципрофлоксацин 5 мкг	Среднее значение, мм	28,9	28,6	28,7	
	Минимальное/максимальное значение, мм	28/29	28/30	27/30	29 /25-33
	Коэффициент вариации	1,42	3,21	4,22	
Гентамицин 10 мкг	Среднее значение, мм	20,3	18,2	19,7	
	Минимальное/максимальное значение, мм	20/21	18/20	17/23	20 /17-23
	Коэффициент вариации	2,55	3,89	11,97	



Имипенем 10 мкг



Ципрофлоксацин 5 мкг



Гентамицин 10 мкг

Чашки Петри с посевами *P. aeruginosa* 780 и дисками с имипенемом, ципрофлоксацином и гентамицином (НИЦФ), взятыми из одного флакона, после инкубации в течение 17 ч при температуре $(35 \pm 1)^{\circ} \text{C}$.

Таблица 3

Чувствительность *P. aeruginosa* 780 к АМП шести наименований с помощью 12 дисков, взятых из одного флакона/картриджа

АМП	Пограничные значения диаметров зон подавления роста, приведённые в стандартах, мм					Дисков с АМП	Диаметры зон подавления роста, мм	Интерпретация результатов в терминах клинической чувствительности в соответствии с требованиями стандартов	
	CLSI			EUCAST				CLSI	EUCAST
	S	I	R	S≥	R<				
Тобрамицин 10 мкг	15	13-14	12	18	18	BD BBL	25; 25; 25; 24; 24; 25; 25; 25; 25; 25; 24	S (12)*	S (12)
						HiMedia	23; 23; 22; 23; 23; 23; 21; 23; 22; 23; 23; 23	S (12)	S (12)
						НИЦФ	23; 24; 24; 24; 23; 24; 23; 23; 24; 22; 23; 23	S (12)	S (12)
Цефепим 30 мкг	18	15-17	14	50	21	BD BBL	11; 11; 12; 11; 11; 11; 10; 11; 12; 11; 12; 12	R (12)	R (12)
						HiMedia	10; 9; 10; 10; 11; 10; 10; 10; 11; 10; 10; 11	R (12)	R (12)
						НИЦФ	10; 11; 12; 11; 12; 11; 12; 11; 11; 11; 12; 10	R (12)	R (12)
Имипенем 10 мкг	19	18-16	15	50	20	BD BBL	13; 13; 13; 13; 13; 14; 14; 14; 13; 14; 14; 14	R (12)	R (12)
						HiMedia	14; 14; 14; 14; 13; 14; 13; 14; 14; 14; 14; 13	R (12)	R (12)
						НИЦФ	12; 16; 13; 22; 8; 24; 19; 15; 17; 19; 20; 25	R (4) I (2) S (6)	R (8) I (4)
Меропенем 10 мкг	19	18-16	15	20	14	BD BBL	22; 22; 23; 22; 22; 22; 23; 21; 22; 23; 23; 23	S (12)	S (12)
						HiMedia	21; 21; 23; 21; 21; 21; 23; 21; 21; 22; 23; 23	S (12)	S (12)
						НИЦФ	27; 19; 25; 24; 16; 24; 23; 10; 19; 18; 12; 20	R (2) I (2) S (8)	R (2) I (4) S (6)
Ципрофлоксацин 5 мкг	25	24-19	18	26	26	BD BBL	16; 17; 17; 16; 18; 17; 17; 17; 16; 16; 17; 16	R (12)	R (12)
						HiMedia	16; 15; 15; 16; 14; 15; 16; 16; 16; 16; 15; 16	R (12)	R (12)
						НИЦФ	15; 29; 6; 16; 8; 16; 31; 17; 28; 24; 14; 29	R (7) I (1) S (4)	R (8) S (4)
Гентамицин 10 мкг	15	14-13	12	_**	_**	BD BBL	22; 22; 23; 21; 21; 21; 22; 22; 22; 22; 22; 22	S (12)	Не определяется
						HiMedia	19; 18; 19; 19; 19; 19; 18; 19; 18; 18; 18; 18	S (12)	Не определяется
						НИЦФ	25; 14; 21; 21; 19; 9; 24; 20; 16; 20; 14; 24	R (1) I (2) S (9)	Не определяется

Примечания. * – в скобках указано количество дисков, взятых из одного флакона, на основании которых определена клиническая категория чувствительности; ** – отсутствуют пограничные значения диаметров зон подавления роста для комбинации *Pseudomonas* spp. – гентамицин.

роста вокруг диска с имипенемом (10 мкг) для 12 измерений варьировал от 8 мм до 25 мм. Для диска с меропенемом их значения находились в пределах от 10 мм до 27 мм, с ципрофлоксацином – от 8 мм до 29 мм, с гентамицином – от 9 мм до 25 мм. Полученные варианты

значений не позволили однозначно определить клиническую категорию штамма по перечисленным АМП ни по требованиям стандарта CLSI, ни EUCAST. По 4 дискам с имипенемом, взятым из одного флакона, штамм определён по CLSI как R, по двум дискам – как I, по

шести – как S. Учитывая различия в пограничных значениях, требованиями EUCAST штамм определён как R к имипенему по 8 дискам и как I – по 4 дискам.

С подобной проблемой столкнулись при интерпретации клинической чувствительности данного штамма к меропенему, ципрофлоксацину, гентамицину (табл. 2).

Обсуждение. Проведённые исследования дисков с АМП шести наименований трёх фирм-производителей показали, что при работе с большинством из них можно получать хорошие воспроизводимые результаты. Ряд отечественных дисков можно использовать, что является особенно актуальным при реализации программы импортозамещения [19].

Несмотря на неудовлетворительные результаты средних значений и диапазонов (минимальное/максимальное) значений диаметров зон подавления роста тест-штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 вокруг диска с меропенемом (HiMedia), ошибок в определении чувствительности клинических штаммов не было. Диаметры зон подавления роста вокруг дисков HiMedia меньше диаметров вокруг аналогичных дисков BD BBL и практически соответствуют критическим значениям. При работе с такими дисками даже незначительные ошибки в технике проведения исследования (более низкая концентрация бактериальной суспензии и др.) могут привести к серьёзным ошибкам в определении категории чувствительности возбудителя.

Значительные различия в диаметрах зон подавления роста, полученные при использовании дисков с имепенем, меропенемом, ципрофлоксацином, гентамицином производства НИЦФ, не позволяют однозначно определить клиническую категорию чувствительности возбудителя, что может привести к необоснованной схеме лечения больного.

Большой разброс значений диаметров зон, получаемых при работе с дисками одного наименования, взятыми из одного флакона/картриджа, демонстрируют острую необходимость для лабораторий в проведении контроля качества, как при получении новой серии дисков, так и при проведении повседневного контроля качества процедуры определения антибиотикочувствительности. Контроль следует проводить не менее чем с 4 дисками, взятыми из одного флакона/картриджа и определять значения всех трёх показателей качества дисков, используемых в данной работе. При получении высоких значений коэффициентов вариации, больших различий в величинах диаметров зон, при отклонении полученных диапазонов от допустимых интервалов в процессе проведения контроля качества необходимо отказаться от использования таких дисков в работе.

Заключение. В связи с введением экономических санкций в отношении Российской Федерации со стороны США, стран Евросоюза, Японии, ряда других стран импортозамещение становится одной из стратегических задач Российской экономики.

Проведённая оценка качества дисков отечественных и иностранных производителей на основании анализа трёх параметров: коэффициента вариации (Cv) диаметров зон подавления роста тест-штаммов и клинических изолятов микроорганизмов, средних значений и диапазонов значений диаметров, – показала их вариабельность. Если исследованные диски производства BD BBL приводят к незначительным вариациям диаметров зон и позволяют получать точные и воспроизводимые результаты, то доступные импортные диски из друже-

ственной страны, производства HiMedia, отличаются большей вариативностью и уступают по качеству дискам производства BD BBL. Часть отечественных дисков показала удовлетворительные результаты, но диски с АМП четырёх наименований не отличались стандартностью, не удовлетворяли требованиям контроля качества на тест-штаммах, не позволяли правильно определить клиническую категорию чувствительности штаммов микроорганизмов. Для получения достоверных результатов антибиотикочувствительности возбудителей инфекции проведение входного и повседневного контроля качества дисков с АМП должно являться обязательной процедурой в каждой бактериологической лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 7-8, 10-13, 15-17 см. REFERENCES)

1. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник для студентов медицинских вузов. Воробьев А. А., ред. 3-е изд. М.: Медицинское информационное агентство; 2022.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х томах. Зверев В. В., Бойченко М. Н., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
4. Давыдов Д.С. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI века. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(1): 50-6. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-1-50-56.
5. Гренкова Т. А., Селькова Е. П., Гудова Н. В. Отечественная вирусомальная вакцина. Оценка эффективности и безопасности. *Медицинский совет*. 2015; 4: 96-100. DOI: 10.21518/2079-701X-2015-4-96-101.
6. Миронов А. Ю., Крапивина И. В., Мудрак Д. Е., Иванов Д. В. Молекулярные механизмы резистентности к β -лактамам патогенов внутрибольничных инфекций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 39-43.
9. Васильева Н. В., Выборнова И. В., Рауш Е. Р., Богомолова Т. С. Определение чувствительности возбудителей инвазивного кандидоза к флуконазолу с использованием дисков различных производителей. *Проблемы медицинской микологии*. 2016; 18(2): 8-11.
14. Стецюк О. У. Среды и диски для определения чувствительности к антибиотикам. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2004; 6(3): 290-2.
18. Харитонов Д.А. Стандартное отклонение как индикатор риска финансовых инструментов. *Ярославский педагогический вестник*. 2012; 1(3): 87-91.
19. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.

REFERENCES

1. Medical microbiology, virology and immunology. Textbook. [Meditinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Uchebnik dlya studentov meditsinskih vuzov]. Vorob'yov A. A., ed. 3rd ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2022. (in Russian)
2. Medical microbiology, virology and immunology [Meditinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. V 2-h tomakh]. Zverev V. V., Boychenko M. N., eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. (in Russian)
3. Dhingra S., Rahman N.A., Peile E., Rahman M., Sartelli M., Azmi H.M., Islam T., Islam S., Haque M. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. *Frontiers in Public Health*. 2020; 8: 1-22. DOI: 10.3389/fpubh.2020.535668.
4. Davydov D.S. National Strategy of the Russian Federation to Prevent the Spread of Antimicrobial Resistance of Pathogenic Microorganisms: Challenges and Prospects for Containing One of the Glob-

- al Biological Threats of the 21st Century. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(1): 50-6. DOI: 10.30895/2221-996H-2018-18-1-50-56. (in Russian)
5. Grenkova T.A., Sel'kova E.P., Gudova N.V. Domestic virosomal vaccine. Assessment of efficiency and safety. *Meditinskiy sovet*. 2015; 4: 96-100. DOI: 10.21518/2079-701X-2015-4-96-101. (in Russian)
 6. Mironov A.Yu., Krapivina I.V., Mudrak D.E., Ivanov D.V. Molecular mechanisms of the antibacterial resistance of nosocomial infection pathogens to β -lactams. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2012; 1: 39-43. (in Russian)
 7. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009; 49: 1749-55. DOI: 0.1086/647952.
 8. Christian G. EUCAST update [Electronic resource] / Karolinska Institutet and Karolinska University Hospital. – USA, Carolina, 2020. – URL: https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2020/EUCAST_update_Gen_Comm_all_presentations.pdf (Date of treatment 26/08/2020).
 9. Vasil'eva N.V., Vybornova I.V., Raush E.R., Bogomolova T.S. Determination of the sensitivity of pathogens of invasive candidiasis to fluconazole using discs from various manufacturers. *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2016; 18(2): 8-11. (in Russian)
 10. Brown D.F.J., Kothari D. Comparison of antibiotic discs from different sources. *Journal of clinical pathology*. 1975; 28: 779-83. DOI: 10.1136/jcp.28.10.779.
 11. Joshi A., Iyer V., Balasubramaniam U., Kagal A., Bharadwaj R. Comparison of efficacy of three commercially available antibiotic discs. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2008; 26(2): 160-2. DOI:10.4103/0255-0857.40533.
 12. Saffari N. A., Salmanzadeh-Ahrabi S., Abdi-Ali A., Rezaei-Hemami M. A comparison of antibiotic disks from different sources on Quicolor and Mueller-Hinton agar media in evaluation of antibacterial susceptibility testing. *Iran Journal of Microbiology*. 2016; 8(5): 307-11.
 13. Ahman J., Matuschek E., Kahlmeter G. The quality of antimicrobial discs from nine manufacturers – EUCAST evaluations in 2014 and 2017. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019; 25: 346-52. DOI:10.1016/j.cmi.2018.05.021.
 14. Stetsyuk O. U. Media and discs for antibiotic susceptibility testing. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2004; 6(3): 290-2. (in Russian)
 15. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing [Electronic resource]. EUCAST (Date of treatment 20/07/2021). <https://www.eucast.org>.
 16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirtieth Informational Supplement. CLSI document M100. USA; 2020.
 17. Saffari N., Salmanzadeh-Ahrabi S., Abdi-Ali A., Rezaei-Hemami M. A comparison of antibiotic disks from different sources on Quiccolor and Mueller-Hinton agar media in evaluation of antibacterial susceptibility testing. *Iranian Journal of Microbiology*. 2016; 8(5): 307-11.
 18. Haritonov D.A. Standard deviation as an indicator of the risk of financial instruments. *Yaroslavskiy pedagogicheskiy vestnik*. 2012; 1(3): 87-91. (in Russian)
 19. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Alyoshkin V.A. The state and trends of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)