

Журнал основан в январе 1955 г.

Учредитель:

ООО «Издательская группа «Медиа
Сфера»

127238, г. Москва, Дмитровское ш, д. 46 к.
2 стр. 2, этаж 4 ком. 12.

Издатель:

Акционерное общество "ЭКОлаб"

142530, Московская область,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1.

Телефон редакции:

8-916-201-80-47,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А.Шанкина

Технический редактор

Ч.А.Сафаров

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

Сдано в набор 20.11.2023.

Подписано в печать 10.12. 2023.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 8,95.

WWW страница: <https://clinlabdia.ru/>

E-mail: cingiz.62@mail.ru

ПИ № ФС77-37760 от 07.10.2009 г.

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

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Micrology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (Print), Chemical Titles, EBSCOhost Biologi-
cal Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier
BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals,
Index Medicus, Index to Dental Literature, OCLC
Article First, Reactions Weekly (Print), Thomson Re-
uters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters
BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal,
Ulrich's International Periodicals Directory.

Индекс Ф81645 — для подписчиков

Подписка через Интернет:

[https://www.akc.ru/itm/clinic_heskay_a-](https://www.akc.ru/itm/clinic_heskay_a-laboratornay_adiagnostika/)

[laboratornay_adiagnostika/](https://www.akc.ru/itm/clinic_heskay_a-laboratornay_adiagnostika/)

Подписка на электронную версию:

https://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849

ISSN 0869-2084.

Клин. лаб. диагностика. 2023. № 12. 724-
779

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

А.Ю. МИРОНОВ, д. м. н., профессор (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА:

Харсеева Г.Г., д.м.н., профессор, (Ростов-на-Дону, Россия);

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР:

Чеботарь И.В., д.м.н. (Москва, Россия);

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ:

Андреева И.И., д.м.н., доцент (Ростов-на-Дону, Россия);

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

Гильманов А.Ж., д.м.н., профессор (Уфа, Россия);

Добровольский А.Б., д.б.н., профессор (Москва, Россия);

Земсков В.М., д.м.н., профессор (Москва, Россия)

Иванов А.А., д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Ипполитов Е.В., д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Марданлы С.Г., д.м.н., профессор (Электрогорск, Россия);

Тотолян А.А., академик РАН, д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Арипов А.Н., д.м.н., профессор (Ташкент, Узбекистан);

Вавилова Т.В., д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия);

Горбунов В.А., к.м.н., доцент (Минск, Беларусь);

Долгих Т.И., д.м.н., профессор (Омск, Россия);

Ельчанинова С.А., д.м.н., профессор (Барнаул, Россия);

Индутный А.В., д.м.н., доцент (Омск, Россия);

Керимов С.Г., д.м.н., профессор (Баку, Азербайджан);

Козлов А.В., д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия);

Кочетов А.Г., д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Кушлинский Н.Е., академик РАН, д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Маматкулов И.Х., д.м.н., профессор (Ташкент, Узбекистан);

Первушин Ю.В., к.м.н., профессор (Ставрополь, Россия);

Пикалов И.В., д.м.н., профессор (Новосибирск, Россия);

Сергеев А.Ю., д.м.н., профессор (Томск, Россия);

Талыбов Т.Г., академик НАН, д.б.н., профессор (Нахчыван, Азербайджан);

Тарасенко О.А., д.м.н., профессор (Москва, Россия);

Тартаковский И.С., д.б.н., профессор (Москва, Россия);

Цвиренко С.В., д.м.н., профессор (Екатеринбург, Россия);

Шибанов А.Н., к.ф.м.н. (Москва, Россия);

Эмануэль В.Л., д.м.н., профессор (Санкт-Петербург, Россия);

Яровая Г.А., д.б.н., профессор (Москва, Россия)

The Journal is founded in 1955.

Founder:

LLC "Publishing Group "Media Sphera"
127238, Moscow, Dmitrovskoe
sh., 46 k. 2 building 2, floor 4
rooms. 12

Publisher:

Joint Stock Company "EKOlub"
142530, Moscow region,
Elektrogorsk, st. Budyonny, 1.

Editorial office phone:

8-916-201-80-47,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

Technical editor Ch.A. Safarov

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

WWW страница: <https://clinlabdia.ru/>

E-mail: cingiz.62@mail.ru

ПИ № ФС77-37760 от 07.10.2009

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 Rus-
sian index of scientific quotation (RINZ) and in fol-
lowing I&R editions: Abstracts of Micology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Bio-
logical Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE,
Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract
Journals, Index Medicus, Index to Dental Litera-
ture, OCLC Article First, Reactions Weekly (Print),
Thomson Reuters Biological Abstracts (Online),
Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN
Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodi-
cals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR-IN-CHIEF:

A.Yu. MIRONOV, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*)

DEPUTIE EDITOR-IN-CHIEF:

Galina G. Kharseeva, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Rostov-on-Don, Russia*);

SCIENTIFIC EDITOR:

Igor V. Chebotar, Dr. Sci. (Med.) (*Moscow, Russia*);

EXECUTIVE SECRETARY:

Irina I. Andreeva, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor (*Rostov-on-Don, Russia*);

EDITORIAL BOARD MEMBERS:

Aleksandr Zh. Gilmanov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Ufa, Russia*);

Anatoliy B. Dobrovolsky, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*);

Vladimir M. Zemskov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Evgeny V. Ippolitov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Aleksey A. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Seifaddin G. Mardanly, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Elektrogorsk, Russia*);

Areg A. Totolyan, the RAS Academician, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*)

EDITORIAL COUNCIL MEMBERS:

Abdumalik N. Aripov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tashkent, Uzbekistan*);

Tatiana V. Vavilova, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Vladimir A. Gorbunov, Cand. Sci. (Med.), Associate Professor (*Minsk, Belarus*);

Tatiana I. Dolgikh, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Omsk, Russia*);

Svetlana A. Elchaninova, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Barnaul, Russia*);

Anton V. Indutny, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor (*Omsk, Russia*);

Sanan G. Kerimov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Baku, Azerbaijan*);

Anton V. Kozlov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Anatoliy G. Kochetov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Nikolay E. Kushlinskii, the RAS Academician, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Ibrokhim Kh. Mamatkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tashkent, Uzbekistan*);

Iuriy V. Pervushin, Cand. Sci. (Med.), Professor (*Stavropol, Russia*);

Iliia V. Pikalov, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Novosibirsk, Russia*);

Aleksey Yu. Sergeev, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Tomsk, Russia*);

Tariel G. Talybov, the NAN Academician, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Nakhchivan, Azerbaijan*);

Olga A. Tarasenko, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Moscow, Russia*);

Igor S. Tartakovskiy, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*);

Sergey V. Tsvirenko, Dr. Sci. (Med.), Professor (*Ekaterinburg, Russia*);

Aleksandr N. Shibanov, Cand. Sci. (Ph-m.) (*Moscow, Russia*);

Vladimir L. Emanuel, Dr. Sci. (Med.), Professor (*St. Petersburg, Russia*);

Galina A. Yarovaya, Dr. Sci. (Biol.), Professor (*Moscow, Russia*)

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Верлов Н.А., Бурдаков В.С., Кулаков И.А., Ланда С.Б., Ронжина Н.Л., Богданов А.А., Эмануэль В.Л.*
Новый подход к оценке уровня уромодулина в моче728

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Саркисян Н.С., Куличенко А.Н., Ковалевич Н.И., Санникова И.В., Голубь О.Г.*
Агрегационная активность тромбоцитов у больных острым бруцеллёзом735
- Йовдий А.В., Смольникова М.В., Шерстнев Ф.С.*
Особенности иммуногематологической диагностики аллоиммунизированного пациента (случай из практики)741

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Чеснокова М. Г., Чесноков В. А., Миронов А. Ю., Турчанинов Д. В.*
Байесовские подходы к определению грибов *Candida albicans* слизистой оболочки полости рта пациентов на этапах проведения ортопедической реабилитации.744
- Бочарова Ю.А.*
Особенности диагностики основных легочных патогенов при муковисцидозе (обзор литературы)751
- Кропотов В.С., Заславская М.И., Александрова Н.А., Кряжев Д.В.*
Айзенштадт А.А., Ермолина Г.Б.
Исследование стадий биопленкообразования у бактерий - возбудителей ЛОР инфекций при помощи фотометрии и люминесцентной микроскопии с 3D-моделированием.761

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Дмитрюкова М.Ю., Малтызова М.И., Голод А.А., Комиссарова К.С., Сенина М.Е., Гуцин А.Е.*
Валидация набора реагентов для одновременного выявления 13-ти возбудителей острых респираторно-вирусных инфекций769
- Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И.*
Разработка набора реагентов с применением метода ПЦР для качественной идентификации ДНК вируса гепатита В.775

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ И ЧИТАТЕЛЕЙ!

Подписку на печатное издание журнала
«Клиническая лабораторная диагностика»
можно оформить через агентство «Книга-Сервис».
Подписной индекс 81645 или через
сайт журнала **clinlabdia.ru**.
На электронную версию журнала через **elibrary.ru**

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Verlov N.A., Burdakov V.S., Kulakov I.A., Landa S.B., Ronzhina N.L., Bogdanov A.A., Emanuel V.L.*
A new approach to assessing the level of uromodulin in urine.728

HEMATOLOGY

- Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N., Kovalevich N.I., Sannikova I.V., Golub O.G.*
Platelet aggregation activity in patients with acute brucellosis.735
- Yovdiy A.V., Smolnikova M.V., Sherstnev F.S.*
Features of immunohematological diagnostics of an alloimmunized patient
(case from practice).741

MICROBIOLOGY

- Chesnokova M. G., Chesnokov V. A., Mironov A. Yu., Turchaninov D.V.*
Bayesian approaches to the identification of fungi *Candida albicans* in the oral
mucosa at the stages of orthopedic rehabilitation.744
- Bocharova Yu.A.*
Diagnostic features of major respiratory pathogens in cystic fibrosis (review of literature)751
- Kropotov V.S., Zaslavskaya M.I., Alexandrova N.A., Kryazev D.V., Ayzenshtadt A.A., Ermolina G. B.*
Investigation of biofilm formation stages in bacterial pathogens of ENT infections by
photometry and luminescent microscopy with 3D modeling.761

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Dmitryukova M.Yu., Maltysova M.I., Golod A.A., Komissarova K.S., Senina M.E., Guschin A.E.*
Validation of the reagent kit for simultaneous detection of 13 main
viral respiratory pathogens769
- Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I.*
Development of a PCR reagent kit for qualitative identification of hepatitis B virus DNA.775

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Верлов Н.А.¹, Бурдаков В.С.¹, Кулаков И.А.¹, Ланда С.Б.¹, Ронжина Н.Л.¹, Богданов А.А.², Эмануэль В.Л.³

НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ УРОВНЯ УРОМОДУЛИНА В МОЧЕ

¹ ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Россия;

² ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический) имени Н.П. Напалкова», 197758, г. Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Уромодулин является белком, играющим важную роль в регулировании водного и ионного баланса в организме. В норме он присутствует в моче в высокой концентрации и может служить индикатором ряда патологических состояний. Стандартным подходом к оценке концентрации уромодулина является иммуноферментный анализ, однако склонность уромодулина к полимеризации приводит к тому, что результаты анализа в существенной степени зависят от конкретной процедуры пробоподготовки. В связи с этим нами предложен новый подход к измерению концентрации уромодулина в моче, основанный на измерении концентрации общего белка в образцах мочи до и после фильтрации с использованием фильтра 300 кДа. Данный метод основан на биофизических свойствах уромодулина, в частности, на его способности образовывать высокомолекулярные олигомеры. Концентрация полимеризованного уромодулина рассчитывается как разность концентраций белка до и после фильтрации. Преимущество данного подхода заключается в его простоте и доступности, результаты сравнительных исследований показали эквивалентность предложенного метода и иммуноферментного анализа. Таким образом, новый подход к измерению концентрации уромодулина с использованием фильтрации может стать важным инструментом для медицинских исследований и диагностики заболеваний.

Ключевые слова: уромодулин; концентрация белка; фильтрация; электрофорез; капиллярный электрофорез.

Для цитирования: Верлов Н.А., Бурдаков В.С., Кулаков И.А., Ланда С.Б., Ронжина Н.Л., Богданов А.А., Эмануэль В.Л. Новый подход к оценке уровня уромодулина в моче. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12): 728-734. DOI: <https://doi.org/10.51620.0869-2084-2023-68-12-728-734>

Для корреспонденции: Верлов Николай Александрович, канд. биол. наук, зав. Ресурсным Центром Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ; e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121060200125-2).

Поступила 16.10.2023

Принята к печати 14.11.2023

Опубликовано 10.12.2023

Verlov N.A.^{1,3}, Burdakov V.S.¹, Kulakov I.A.¹, Landa S.B.^{1,3}, Ronzhina, N.L.¹, Bogdanov A.A.², Emanuel V.L.³

A NEW APPROACH TO ASSESSING THE LEVEL OF UROMODULIN IN URINE

¹ Federal State Budgetary Institution "Petersburg Institute of Nuclear Physics named after V.I. B.P. Konstantinov National Research Center Kurchatov Institute;

² State Budgetary Institution of Health Care "St. Petersburg Clinical Scientific and Practical Center for Specialized Types of Medical Care (Oncological)";

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Uromodulin is the protein that plays an important role in a regulation of water and ion balance in a body. Normally, it is present in a urine in high concentration and can be an indicator of a number of pathological conditions. The standard approach to assess the concentration of uromodulin is the enzyme immunoassay. However, the tendency of uromodulin to polymerize leads to the fact that the results of the analysis significantly depend on the specific sample preparation procedure. In this regard, we have proposed the new approach to measure the concentration of the uromodulin in the urine. It is based on measuring the concentration of total protein in urine samples before and after filtration with a 300 kDa filter. This method is based on the biophysical properties of uromodulin, in particular, on its ability to form high-molecular oligomers. The concentration of polymerized uromodulin is calculated as the difference in protein concentrations before and after filtration. The advantage of this approach is in its simplicity and accessibility. The results of comparative studies have shown the equivalence of the proposed method and the enzyme immunoassay. Thus, a new approach to measure the concentration of uromodulin using filtration can become an important tool for medical researches and diagnosis of diseases.

Key words: uromodulin; protein concentration; filtration; electrophoresis; capillary electrophoresis.

For citation: Verlov N.A., Burdakov V.S., Kulakov I.A., Landa S.B., Ronzhina N.L., Bogdanov A.A., Emanuel V.L. A new approach to assessing the level of uromodulin in urine. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 728-734. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620.0869-2084-2023-68-12-728-734>

For correspondence: Verlov Nikolay Alexandrovich, Cand. Sc. Biol., head. The Resource Center of the Molecular and Radiation Biophysics Division of NRC "Kurchatov Institute" – PNPI; e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Information about authors:

Verlov N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>;

Burdakov V.S., <https://orcid.org/0000-0001-6025-7367>;

Kulakov I.A., <https://orcid.org/0009-0003-5952-4773>;

Landa S.B., <https://orcid.org/0000-0001-5546-250X>;

Ronzhina N.L., <https://orcid.org/0000-0001-6269-8502>;

Bogdanov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-7887-4635>;

Emanuel V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>.

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

Acknowledgment. *The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme № 121060200125-2).*

Received 16.10.2023

Accepted 14.11.2023

Published 10.12.2023

Введение. Биомаркеры мочи представляют собой важный инструмент для диагностики, классификации и прогнозирования заболеваний почек [1]. Проведенные исследования показали, что уромодулин является биомаркером мочи, его уровень отражает функциональное состояние почек, выраженность патологии при хронической болезни почек (ХБП) и гипертонии [2]. К функциям уромодулина можно отнести защиту от инфекций мочевыводящих путей, предотвращение образования почечных камней за счёт ингибирования процессов первичного кристаллогенеза и агрегации кристаллов кальция, регуляцию транспорта ионов посредством регулирования активности совместного транспортера натрия-калия-хлорида (NKCC2) и/или калиевого канала ROMK [3, 4]. Мутации в гене UMOD, кодирующем уромодулин, ответственны за ряд моногенных расстройств (семейная ювенильная гиперурикемическая нефропатия, медулярно-кистозная болезнь почек 2-го типа или гломеруло-кистозная болезнь почек), известных как уромодулин-ассоциированные заболевания почек (UAKD) и гипертонии [2]. Эти расстройства характеризуются тяжелым тубулоинтерстициальным повреждением, гиперурикемией и подагрой, а также прогрессирующей почечной недостаточностью [5]. Ряд общегеномных ассоциативных исследований показал, что варианты модификаций в гене UMOD связаны с маркерами функции почек и риском развития артериальной гипертензии и ХБП в человеческой популяции [6 - 8]. Связь уромодулина, как с моногенными заболеваниями, так и со сложными нарушениями, такими как ХБП и артериальная гипертензия, обуславливает высокий интерес к белку и методам определения его концентрации в моче для оценки функции почек.

Уромодулин представляет собой гликопротеин, который экспрессируется исключительно клетками почечного эпителия, выстилающего полость толстого восходящего сегмента петли Генле и начало дистального сегмента извитого канальца. В норме уромодулин составляет более половины массы от общего белка в моче [9 - 11]. Уромодулин является уникальным белком, который вследствие высокой степени гликозилирования, характеризуется изоэлектрической точкой

pI = 3,2 [10], склонный в широком диапазоне ионного окружения, характерного для мочи, образовывать высокоорганизованные фибриллы, состоящие из сотен и тысяч мономеров [12]. Белок в процессе посттрансляционного созревания в эндоплазматическом ретикулуме подвергается N-гликозилированию. Гликозилированию подвергаются 7 сайтов из 8, что во многом определяет структуру белка и его электроотрицательные свойства. Перед выходом в просвет канальца к C-концу присоединяется гликозилфосфатидилинитол (GPI-якорь), который удерживает молекулу на поверхности мембраны. Образование свободно циркулирующего мономера уромодулина происходит при взаимодействии белка с сериновой протеазой – хепсином, активность которой растет при увеличении концентрации одновалентных катионов в моче [13]. Хепсин отрезает от C-конца уромодулина 26 аминокислотных остатков вместе с GPI-якорем, вследствие чего у него активизируется ZP-домен, ответственный за полимеризацию [14]. В результате мономеры массой 95 кДа образуют олигомеры массой до 10 МДа [15, 16].

Олигомеры уромодулина обуславливают множество его важных функций, начиная от стабилизации коллоида мочи в широком диапазоне концентрации солей, растворенных в моче, заканчивая выраженными антимикробными свойствами. Тем не менее, помимо полимеризованного уромодулина в моче может быть обнаружен прекурсор уромодулина с ZP-доменом, закрытым для полимеризации GPI-якорем. Концентрация неполимеризованного прекурсора в моче и в крови примерно в тысячу раз ниже, чем концентрация полимеризованного уромодулина в моче. Так, молекула уромодулина, способного к полимеризации, состоит из 614 остатков аминокислот и её масса составляет 105 кДа, тогда как молекула прекурсора уромодулина, иммобилизованного на мембране с помощью GPI-якоря, состоит из 640 аминокислот и её масса составляет около 110 кДа [17].

Стандартным методом определения уромодулина является иммуоферментный анализ [18], однако склонность белка к образованию олигомеров служит существенным препятствием для количественного определения его концентрации в моче [19]. Несмо-

тря на довольно быстрое получение и характеристику антител, специфичных к уромодулину человека [20], сообщения об определении концентрации уромодулина давали противоречивые результаты с точки зрения стабильности, в различных условиях хранения и протоколах преаналитической обработки исходного образца [19, 21 - 23].

Целью настоящего исследования была разработка и апробация подхода для оценки концентрации полимеризованного уромодулина в моче, не основанного на иммуноферментном анализе.

Материал и методы. Исследование проводили на образцах мочи, полученных от 20 здоровых добровольцев (12 мужчин, 8 женщин, средний возраст 38 ± 10 лет). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИЦ “Курчатовский институт” - ПИ-ЯФ. Для анализа использовали образцы утренней мочи. Для всех образцов проводили разделение объемов, часть образца использовали для последующего анализа в нативном виде, часть подвергали фильтрации на фильтре 300 кДа (Biomax 300 KDa Ultrafiltration disks, Millipore) с использованием системы вакуумной фильтрации (MilliSolve™ Filtration System, Millipore).

Общеклинический анализ мочи проводили с использованием тест-полосок Labstrip U11 Plus GL на анализаторе мочи DocUReader 2 Pro (77 Elektronika Kft, Венгрия). Определяли следующие параметры: билирубин, уробилиноген, кетоны (ацетоуксусная кислота), аскорбиновая кислота, глюкоза, протеин (альбумин), эритроциты (гемоглобин), уровень pH, нитриты, лейкоциты, удельный вес мочи.

Измерение фракционного состава коллоида нативной мочи и образца после фильтрации проводили на анализаторе треков наночастиц NanoSight LM10 (Malvern). Анализ треков наночастиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) представляет собой метод, позволяющий определить коэффициент диффузии частиц в растворе. Для этого исследуемый образец помещается в кювету, которая освещается лазерным лучом, развернутым в плоскость. Рассеяние света на каждой из частиц в плоском пучке света создает дифракционные пятна. По изменению положения геометрического центра пятна во времени можно определить скорость перемещения частицы в жидкости и рассчитать коэффициент диффузии. Зная коэффициент диффузии частицы и свойства жидкости, можно рассчитать гидродинамический размер частиц в исследуемом образце и получить гистограмму распределения частиц по размерам, при этом метод позволяет определить их концентрацию в абсолютных величинах (частиц в мл). Перед измерением образцы мочи разводили в 40 раз дистиллированной водой. В качестве источника излучения использовали лазер с длиной волны 488 нм, для каждого образца проводили 3 последовательных измерения длительностью по 60 секунд.

Определение массовой концентрации ионов аммония, калия, натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция проводили методом капиллярного электрофореза с использованием системы КАПЕЛЬ-105М (Льюмэкс, Россия). Свежесобранные образцы мочи для анализа центрифугировали при 1800g 5 минут, отбирали супернатант, для анализа разбавляли его деионизированной водой (удельное электрическое сопротивление

>16 МОм·см) в 250 раз.

Одномерный электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) с концентрацией полиакриламида 10 % в разделяющем геле и 5 % в концентрирующем геле. Анализируемые образцы помещали в стандартный буфер для нанесения (0,065 М Трис; pH = 6,8; 2 % SDS, 1% дитиотреитол (ДТТ), 10 % глицерин; 0,01 % бромфеноловый голубой) и прогревали на кипящей водяной бане в течение 2 минут. Образцы наносили в количестве 10 мкг на дорожку. Разделение проводили в камере для вертикального гель-электрофореза MidiPage (Clever Scientific, Великобритания) при постоянной мощности 3 Вт на гель.

Концентрацию общего белка образцов определяли колориметрическим методом по Бредфорду (Bradford protein assay, BioRad, США) [24] и флуориметрическим методом с использованием флуоресцентного красителя ProteOrange (Lumiprobe, Россия). Для определения концентрации белка по методу Бредфорда в одноразовых оптических кюветках смешивали 800 мкл реактива Бредфорда и 200 мкл исследуемого образца и через 5 минут проводили измерение светопоглощения при длине волны 595 нм с использованием спектрофлуориметра F-7000 (Hitachi, Япония). Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой для известных концентраций человеческого сывороточного альбумина. Для флуориметрического определения концентрации белка в лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл раствора ProteOrange в фосфатно-солевом буфере и по 90 мкл образца в трехкратных повторениях, а также человеческий сывороточный альбумин в серии разведений для построения калибровочной кривой. Измерения проводили на многофункциональном планшетном анализаторе EnSpire Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, США) в режиме детекции флуоресценции при длинах волн возбуждения и испускания 470 и 570 нм соответственно. Построение калибровочной кривой и расчет концентрации белка производили с использованием встроенного программного обеспечения анализатора. Также в образцах нативной и фильтрованной мочи определяли концентрацию белка методом с пирогаллоловым красным с использованием набора реагентов Белок-ППК (Вектор-Бест, Россия) на автоматическом биохимическом анализаторе А-15 (BioSystems, Испания).

Имуноферментный анализ для определения концентрации уромодулина в исследуемых образцах проводили с использованием набора Human Uromodulin ELISA kit (BioVendor, Чехия). Для анализа применяли как стандартную процедуру подготовки образца перед измерением, так и процедуру с применением буфера ТЕА (сокращение: Triton, EDTA, Alkaline). Для приготовления буфера ТЕА использовали 0,5 % Triton X-100 и 20 мМ/л EDTA, полученную смесь титровали 40 % NaOH до pH 7,5 [19].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета R language (R version 4.2.1) в среде RStudio (2023.06.2 Build 561, Posit Software, PBC). Для групповых сравнений количественных показателей использовали параметрические критерии Фишера и Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки согласия количественных методов измерений применяли график

Бланда-Альтмана [25].

Результаты. Измеренные значения плотности, pH, проводимости и катионного состава исследованных образцов приведены в табл. 1. Сравнение параметров об-

разцов мочи до и после фильтрации не выявило достоверных отличий. В целом можно сделать заключение, что фильтрация с использованием фильтра 300 кДа не оказывает влияния на оцениваемые параметры мочи.

Таблица 1

Данные измерения физических свойств нативной и фильтрованной мочи

Показатель	Нативная моча, n = 20 (95% CI)	Фильтр 300 кДа, n = 20 (95% CI)	p-value
Плотность, г/см ³	1,02 (1,01; 1,02)	1,01 (1,00; 1,02)	0,8
pH	5,7 (5,44; 5,98)	5,7 (5,42; 5,94)	0,8
Проводимость, мкСм/см	9,34 (8,46; 10,21)	9,38 (8,60; 10,15)	>0,9
Конц. Na ⁺ , мг/мл	2,56 (2,26; 2,85)	2,39 (2,13; 2,65)	0,2
Конц. K ⁺ , мг/мл	1,67 (1,30; 2,05)	1,58 (1,30; 1,86)	0,8
Конц. Ca ⁺ , мг/мл	0,13 (0,10; 0,17)	0,13 (0,10; 0,17)	>0,9
Конц. NH ₄ ⁺ , мг/мл	0,61 (0,47; 0,76)	0,61 (0,50; 0,72)	0,6

Таблица 2

Концентрация белка в образцах нативной и фильтрованной мочи

Метод определения	Нативная моча, мг/л n = 20 (95% CI)	Фильтр 300 кДа, мг/л n = 20 (95% CI)	p-value
Пирогаллоловый красный	40,9 (33,2; 48,7)	30,8 (23,3; 38,3)	0,093
Флуориметрический метод	35,44 (27,60; 43,28)	24,43 (17,95; 30,91)	0,007
Метод Бредфорда	34,64 (26,81; 42,46)	23,67 (17,27; 30,06)	0,010

Таблица 3

Изменение концентрации белка (ΔK) в моче после фильтрации

Метод определения	ΔK, мг/л, n = 20 (95% CI)
Пирогаллоловый красный	11,10 (7,86; 12,49)
Флуориметрический метод	10,73 (9,34; 12,68)
Метод Бредфорда	11,05 (9,05; 12,89)

Таблица 4

Концентрация уромодулина, определенная иммуноферментным методом по стандартному протоколу (ELISA) и с применением буфера TEA (ELISA + TEA)

Протокол измерений	Концентрация белка, мкг/мл, n = 20 (95% CI)
ELISA, нативная моча	6,12 (5,37; 7,40)
ELISA, фильтрат мочи (до 300 кДа)	0,65 (0,64; 0,76)
ELISA + TEA, нативная моча	10,92 (9,43; 14,35)
ELISA + TEA, фильтрат мочи (до 300 кДа)	0,63 (0,62; 0,81)
ΔK, ELISA	5,48 (4,68; 6,70)
ΔK, ELISA + TEA	10,29 (8,79; 13,58)

Концентрации белка, измеренные методом с пирогаллоловым красным, методом Бредфорда и флуориметрическим методом, в образцах нативной мочи и в образцах мочи после фильтрации приведены в табл. 2. Оценка уровня белка в образцах нативной и фильтрованной мочи методом Бредфорда и флуориметрическим методом дала очень близкие значения, что совпадает с опубликованными данными о сравнении этих методов.

Для каждой пары «нативная моча - фильтрованная моча» производили расчёт потери белка по формуле $\Delta K = K_{\text{нативная}} - K_{300\text{kDa}}$, где ΔK - изменение концентрации белка после фильтрации образца, $K_{\text{нативная}}$ - концентрация общего белка в образце нативной мочи и $K_{300\text{kDa}}$ - концентрация белка в образце после пропускания через фильтр 300 кДа. Расчёт падения концентрации белка проводился во всех образцах для метода с пирогаллоловым красным, метода Бредфорда и флуориметрического метода. Расчетные данные об изменении концентрации белка в образце мочи приведены в табл. 3.

Данные о концентрации уромодулина полученные методом ИФА в образцах до и после фильтрации приведены в табл. 4. Применение буфера TEA при пробоподготовке нативной мочи приводит к увеличению детектируемой концентрации уромодулина примерно в 2 раза. Концентрация уромодулина, определяемая в образце фильтрованной мочи (фильтр пропускал белки с м.м. до 300 кДа), не изменяется в зависимости от применения буфера TEA при пробоподготовке к иммуноферментному анализу.

На электрофореграмме образца нативной мочи (рис. 1) детектируется две основные полосы в области 67 и 105 кДа, соответствующие альбумину и уромодулину [27].

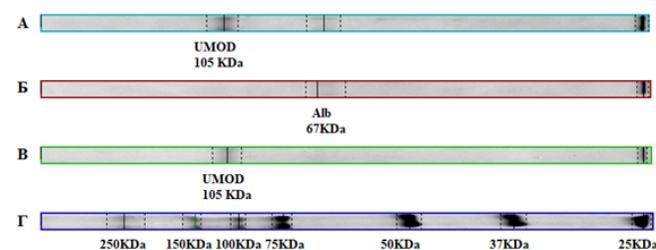


Рис. 1. Электрофореграмма образца нативной мочи (А); образца мочи после фильтрации (фильтр 300 кДа) (Б); смыва с фильтра после фильтрации нативной мочи (В); маркер молекулярных масс (Bio-Rad) (Г).

Для оценки фракционного состава коллоида нативной мочи и образца после фильтрации для каждого из образцов проводили серию измерений на анализаторе треков наночастиц. Гистограмма измерений и данные о концентрации частиц в образцах нативной мочи приведены на рис. 2. Концентрация частиц в образцах нативной мочи составляла $(3,4 \pm 0,28) \cdot 10^{10}$ частиц/мл, в образце после фильтрации падала в 50 раз до уровня фонового значения, предварительно

измеренного для буфера разбавления $(6,8 \pm 0,8) \cdot 10^8$ частиц/мл (фон $3,4 \cdot 10^8$ частиц/мл). Распределение частиц по размерам для образцов до фильтрации характеризовалось гладкой кривой с нарастанием концентрации частиц и достижением максимума в области 130 нм (мода распределения $130 \pm 3,2$ нм) и гладким спадом до 400 нм. Распределение частиц в образцах после фильтрации отличалось низким соотношением сигнал-шум.

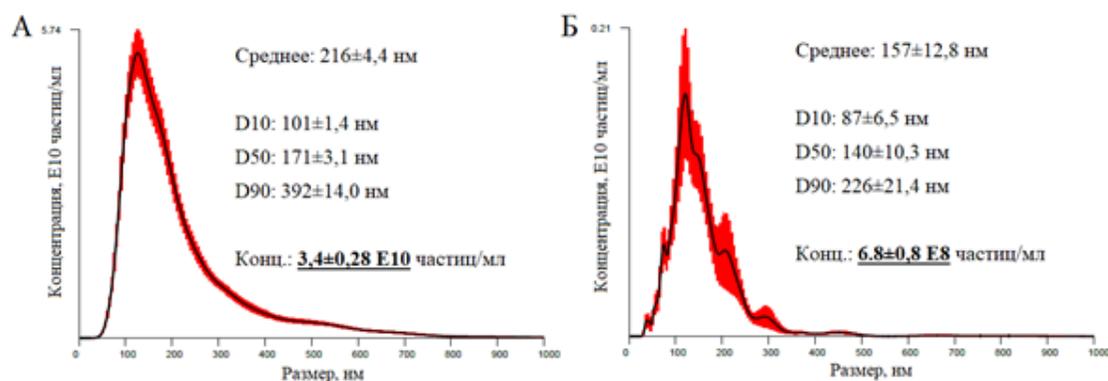


Рис. 2. Данные о фракционном составе коллоида мочи до (А) и после фильтрации (Б), полученные методом анализа треков наночастиц.

Обсуждение. Целью настоящего исследования была разработка подхода для оценки концентрации уромодулина в моче, не основанного на иммуноферментном анализе. С учетом основных биофизических свойств уромодулина нами разработан подход к оценке количества полимеризованного уромодулина в моче, основанный на измерении концентрации белка в образце мочи до и после фильтрации на мембране 300 кДа. Данные, представленные в табл. 2 и табл. 3, показывают, что определение концентрации белка с использованием пирогаллолового красного, методом Бредфорда и флуориметрическим методами дает сопоставимые величины как в нативной, так и в фильтрованной моче. Зная композицию главных белков мочи, мы сделали предположение, что основные белковые компоненты мочи, такие как альбумин (объемная доля до 40%, масса мономера 67 кДа) и IgG (объемная доля до 5%, масса 150 - 170 кДа), должны свободно проходить через мембрану фильтра 300 кДа. Вторичная моча формируется из первичной мочи, которая является ультрафильтратом, прошедшим через фильтрационные щели, образованными ножками подоцитов, покрывающими клубочковые капилляры в капсуле Боумана [28]. Таким образом можно ожидать, что среди белков, попавших в мочу из плазмы крови, отсутствуют компоненты с молекулярной массой больше 200-300 кДа. Тем не менее, при фильтрации на фильтре 300 кДа (Biotech 300 KDa Ultrafiltration disks, Millipore) наблюдается снижение концентрации белка в образце. На электрофореграмме также видно, что полоса, соответствующая массе уромодулина, практически исчезает в образце прошедшем через фильтр. Вместе с тем, зная порог молекулярной массы белка, попадающего в первичную мочу в капсуле Боумана, можно предположить, что фракция, не прошедшая через фильтр, относится к белку, синтезированному в нефроне. На основании вышеизложенного мы предполагаем, что изменение концентрации белка в

образце после фильтрации равно концентрации полимеризованного уромодулина в нативной моче.

Для того, чтобы оценить эквивалентность методов определения концентрации полимеризованного уромодулина в моче, мы провели сравнение величин снижения концентрации белка после фильтрации через фильтр 300 кДа с результатами определения концентрации уромодулина в образце мочи до и после фильтрации. На рис. 3 приведены данные относительно изменения количества белка (Δ ОБ) при фильтрации и данные прямого измерения концентрации белка иммуноферментным методом. Изменение количества белка при фильтрации показывает лучшее совпадение с данными иммуноферментного анализа с применением буфера ТЕА. Концентрация уромодулина, определенная иммуноферментным методом без применения буфера ТЕА, дает недооценку концентрации, которая обусловлена тем, что олигомеры уромодулина не в полном объеме переведены в форму мономеров.

Для регрессионного анализа мы взяли данные иммуноферментного анализа с использованием буфера ТЕА и данные падения концентрации белка с использованием различных методов определения. Данные линейной регрессии приведены на рис. 4, коэффициент корреляции по Пирсону для флуориметрического определения белка и определения методом Бредфорда $R = 0,93$ ($p < 0,05$), для определения с пирогаллоловым красным $R = 0,62$ ($p < 0,05$).

Графики Бланда-Альтмана для сравнения методов приведены на рис. 5. На представленных графиках показаны результаты определения концентрации полимеризованного уромодулина по количеству общего белка мочи до и после фильтрации на мембране 300 кДа и данными иммуноферментного анализа. Видно, что смещение каждого из трёх методов определения белка в моче не превосходит 1 мг/л. Наибольшая ширина доверительного интервала оказалась у метода определения белка с ис-

пользованием пирогаллолового красного (CI95%: -7,92; 7,81), тогда как диапазон согласия для флуориметриче-

ского метода и метода Бредфорда в два раза уже (CI95%: -4,28; 2,95 и CI95%: -4,96; 3,14, соответственно).

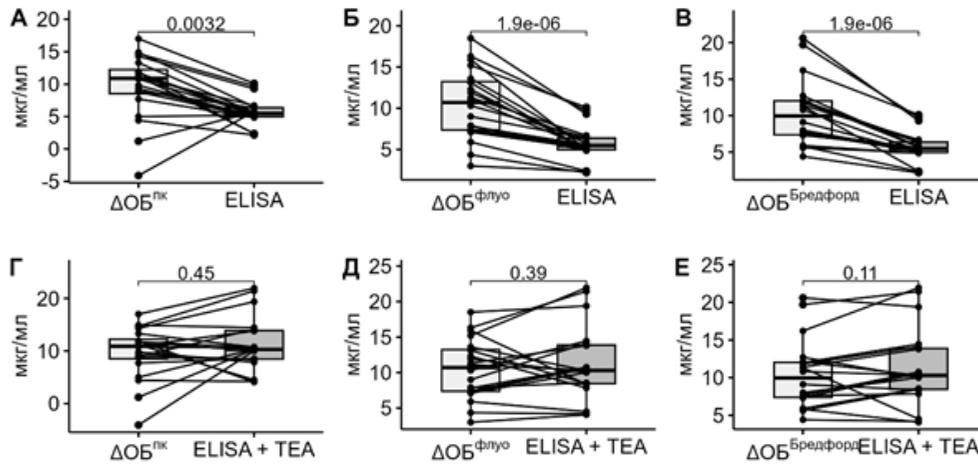


Рис. 3. Данные падения концентрации белка, измеренной различными методами (А, Г – пирогаллоловым красным, Б, Д - флуориметрическим методом, В, Е – по Бредфорду), с данными иммуноферментного анализа (А, Б, В) и иммуноферментного анализа с использованием буфера TEA (Г, Д, Е).

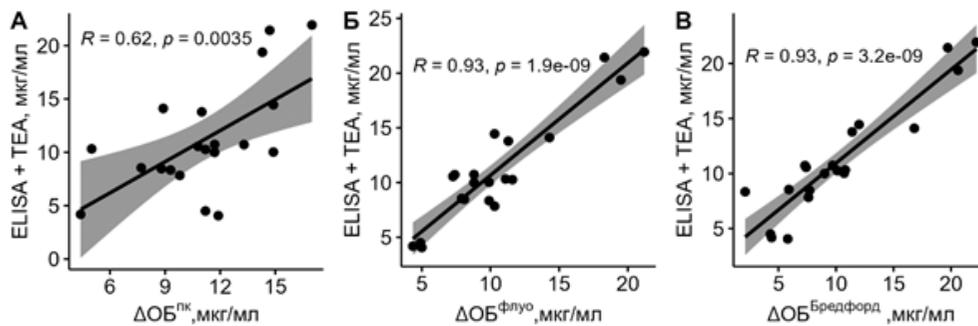


Рис. 4. Данные регрессионного анализа и коэффициенты корреляции по Пирсону для данных падения концентрации белка при фильтрации (ΔOB) различными методами (А – пирогаллоловым красным, Б - флуориметрическим методом, В – по Бредфорду) в сравнении с данными иммуноферментного анализа с использованием буфера TEA.

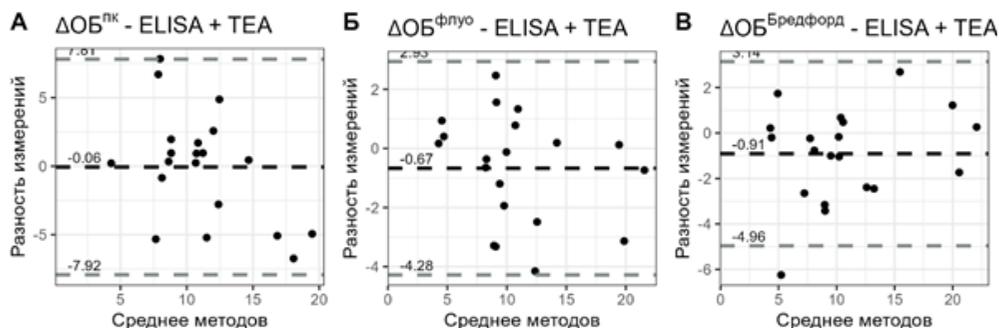


Рис. 5. Графики Бланда-Альтмана для данных падения концентрации белка при фильтрации (ΔOB) различными методами (А – пирогаллоловым красным, Б - флуориметрическим методом, В – по Бредфорду) в сравнении с данными иммуноферментного анализа с использованием буфера TEA.

Заключение. Нами продемонстрирована применимость метода определения концентрации полимеризованного уромодулина в моче, основанного на использовании фильтра 300 кДа и определении концентрации белка в образцах мочи до и после фильтрации. Смещение среднего в сравнении с иммуноферментным определением концентрации уромодулина, независимо

от метода определения концентрации общего белка, не превышало 1 мг/л, наименьший диапазон различий был у флуориметрического метода и метода определения концентрации белка по Бредфорду. Предлагаемый нами подход к определению концентрации уромодулина обладает рядом преимуществ по сравнению с иммуноферментным анализом, так как он менее чув-

ствителен к процедуре пробоподготовки образцов для исследования, может быть проведен с использованием стандартных лабораторных методов. Сочетание двух методов определения концентрации уромодулина с использованием фильтрации и иммуноферментного анализа позволяет получить информацию о соотношении полимеризованного уромодулина и его мономеров, не склонных к полимеризации из-за закрытого ZP-домена. Соотношение концентрации полимеризованного уромодулина, концентрация которого в моче зависит от ряда факторов, но во многом определяется активностью протеазы хепсина, чувствительного к концентрации одновалентных катионов, и содержания мономеров уромодулина, чей выход в просвет петли Генле не зависит от ионного состава мочи, потенциально является важным показателем, характеризующим как функцию нефрона, так и выраженность адаптивных механизмов стабилизации коллоида мочи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Koynier J.L., Vaidya V.S., Bennett M.R., Ma Q., Worcester E., Akhter S.A. et al. Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 5 (12): 2154-65.
- Rampoldi L., Scolari F., Amoroso A., Ghiggeri G., Devuyst O. The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011; 80 (4): 338-47.
- Renigunta A., Renigunta V., Saritas T., Decher N., Mutig K., Waldegger S. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (3): 2224-35.
- Mutig K., Kahl T., Saritas T., Godes M., Persson P., Bates J. et al. Activation of the bumetanide-sensitive Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (34): 30200-10.
- Bollée G., Dahan K., Flamant M., Morinière V., Pawtowski A., Heidet, L., et al. Phenotype and outcome in hereditary tubulointerstitial nephritis secondary to UMOD mutations. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 6 (10): 2429-38.
- Padmanabhan S., Melander O., Johnson T., Di Blasio A.M., Lee W.K., Gentilini D. et al. Genome-wide association study of blood pressure extremes identifies variant near UMOD associated with hypertension. *PLoS Genet.* 2010; 6 (10): e1001177.
- Köttgen A., Glazer N.L., Dehghan A., Hwang S.J., Katz R., Li M. et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 2009; 41 (6): 712-7.
- Chambers J.C., Zhang W., Lord G.M., van der Harst P., Lawlor D.A., Sehmi J.S. et al. Genetic loci influencing kidney function and chronic kidney disease. *Nat. Genet.* 2010; 42 (5): 373-5.
- Devuyst O., Olinger E., Rampoldi L. Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat Rev Nephrol.* 2017; 13 (9): 525-44.
- Schaeffer C., Devuyst O., Rampoldi L. Uromodulin: Roles in Health and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 2021; 83: 477-501.
- Micanovic R., LaFavers K., Garimella P.S., Wu X.R., El-Achkar T.M. Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): guardian of urinary and systemic homeostasis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2020; 35 (1): 33-43.
- LaFavers K.A., Micanovic R., Sabo A.R., Maghak L.A., El-Achkar T.M. Evolving Concepts in Uromodulin Biology, Physiology, and Its Role in Disease: a Tale of Two Forms. *Hypertension.* 2022; 79 (11): 2409-18.
- Brunati M., Perucca S., Han L., Cattaneo A., Consolato F., Andolfo A. et al. The serine protease hepsin mediates urinary secretion and polymerisation of Zona Pellucida domain protein uromodulin. *Elife.* 2015; 4: e08887.
- Jovine L., Qi H., Williams Z., Litscher E., Wassarman P.M. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat. Cell. Biol.* 2002; 4 (6): 457-61.
- Wiggins R.C. Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions. *Clin. Chim. Acta.* 1987; 162 (3): 329-40.
- Stanisich J., Zyla D., Afanasyev P., Xu J., Kipp A., Olinger E. et al. The cryo-EM structure of the human uromodulin filament core reveals a unique assembly mechanism. *ELife.* 2020; 9: e60265.
- Schaeffer C., Santambrogio S., Perucca S., Casari G., Rampoldi L. Analysis of uromodulin polymerization provides new insights into the mechanisms regulating ZP domain-mediated protein assembly. *Mol. Biol. Cell.* 2009; 20 (2): 589-99.
- Youhanna S., Weber J., Beaujean V., Glaudemans B., Sobek J., Devuyst O. Determination of uromodulin in human urine: influence of storage and processing. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2014; 29 (1): 136-45.
- Kobayashi K., Fukuoka S. Conditions for solubilization of Tamm-Horsfall protein/uromodulin in human urine and establishment of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 388 (1): 113-20.
- Brunisholz M., Geniteau-Legendre M., Ronco P.M., Moullier P., Pontillon F., Richet G. et al. Characterization of monoclonal antibodies specific for human Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int.* 1986; 29 (5): 971-6.
- Akesson I., Haugen H., Enger E. Quantification of uromucoid: a simplified method. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1978; 38 (1): 93-5.
- Uto I., Ishimatsu T., Hirayama H., Ueda S., Tsuruta J., Kambara T. Determination of urinary Tamm-Horsfall protein by ELISA using a maleimide method for enzyme-antibody conjugation. *J. Immunol. Methods.* 1991; 138 (1): 87-94.
- Torffvit O., Agardh C.D., Kjellsson B., Wieslander J. Tubular secretion of Tamm-Horsfall protein in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus using a simplified enzyme linked immunoassay. *Clin. Chim. Acta.* 1992; 205 (1-2): 31-41.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- Bland J.M., Altman D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986; 1 (8476): 307-10.
- KarunK.M.,Puranika.BA.plot:AnRfunctionforBland-Altmananalysis. *Clin. Epidemiol. Glob. Health.* 2021; 12: 100831.
- Li H., Kostel S., DiMartino S., Gheinani A.H., Froehlich J., Lee R. Uromodulin Isolation and Its N-Glycosylation Analysis by NanoLC-MS/MS. *J. Proteome Res.* 2021; 20 (5): 2662-72.
- Scott R.P., Quaggin S.E. Review series: The cell biology of renal filtration. *J. Cell Biol.* 2015; 209(2):199-210.

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Саркисян Н.С.¹, Куличенко А.Н.¹, Ковалевич Н.И.¹, Санникова И.В.², Голубь О.Г.³

АГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ БРУЦЕЛЛЁЗОМ

¹ ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035, г. Ставрополь, Россия;

² ЧУ Центр образовательной и клинической гастроэнтерологии, гепатологии и панкреатологии, 355012, г. Ставрополь, Россия;

³ ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя, 355018, г. Ставрополь, Россия

Введение. Состояние агрегационной активности тромбоцитов является одним из важных направлений изучения нарушений функций сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, в том числе при реакциях воспаления. Многие аспекты процесса агрегации и его регуляции при бруцеллезной инфекции остаются неизученными, что требует соответствующих исследований.

Цель работы - изучение агрегационной активности тромбоцитов у больных острым бруцеллезом и выявление патофизиологической связи с возможным развитием дисфункции эндотелия сосудов.

Материал и методы. Проведено исследование клинического материала (плазма/сыворотка крови) от 57 человек с лабораторно подтвержденным диагнозом острый бруцеллез, 34 донора составили группу контроля (не переболевшие бруцеллезом и не вакцинированные против этой инфекции). Всем обследуемым турбидиметрическим методом по Борну и О'Брайену определяли агрегацию тромбоцитов с учетом степени и скорости агрегации богатой тромбоцитами плазмы по кривым светопропускания под влиянием индукторов (АДФ, коллагена, ристоцетина).

Результаты. В группе больных бруцеллезом установлено статистически значимое снижение степени агрегации, индуцированной АДФ, коллагеном и ристоцетином, относительно контрольной группы. При анализе концентрации маркеров эндотелиальной дисфункции в группе больных было выявлено повышение уровня эндотелина-1, окиси азота и её метаболитов в сравнении с группой контроля.

Заключение. Угнетение агрегационной активности тромбоцитов с индукторами (АДФ, коллаген, ристоцетин), имеющими разные механизмы действия, у больных острым бруцеллезом может быть связано с защитной реакцией, препятствующей тромбообразованию, но ведущей к развитию тромбоцитопатии с нарушением реакции высвобождения компонентов из гранул тромбоцитов и функциональной способности тромбоцитов (в частности, агрегации), на фоне нормального количества тромбоцитов, приводящей к нарушению функций эндотелия. В ходе проведенного исследования показана патофизиологическая связь снижения агрегации тромбоцитов с развитием дисфункции эндотелия при бруцеллезе.

Ключевые слова: бруцеллез; эндотелий; агрегация тромбоцитов; индукторы агрегации.

Для цитирования: Саркисян Н.С., Куличенко А.Н., Ковалевич Н.И., Санникова И.В., Голубь О.Г. Агрегационная активность тромбоцитов у больных острым бруцеллезом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12): 735-740.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-735-740>

Для корреспонденции: Саркисян Нушик Сааковна, канд. мед. наук, зав. отделом консультационно-профилактической работы, врач клинической лабораторной диагностики; e-mail: nyshik25@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.

Поступила 20.06.2023

Принята к печати 25.09.2023

Опубликовано 10.12.2023

Sarkisyan N. S.¹, Kulichenko A. N.¹, Kovalevich N.I.¹, Sannikova I.V.², Golub O.G.³

PLATELET AGGREGATION ACTIVITY IN PATIENTS WITH ACUTE BRUCELLOSIS

¹Stavropol Plague Control Research Institute, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 355035, Stavropol, Russian Federation;

²CHU Center for Educational and Clinical Gastroenterology, Hepatology and Pancreatology, 355012, Stavropol, Russian Federation;

³GBUZ SK «City Clinical Hospital № 2» of Stavropol, 355018, Stavropol, Russian Federation

Introduction. The state of platelet aggregation activity is one of the important areas of study of dysfunctions of the vascular-platelet hemostasis, including during inflammatory reactions. Many aspects of the aggregation process and its regulation during brucellosis infection remain unexplored, which requires appropriate research.

The purpose of the work is to study the aggregation activity of platelets in patients with acute brucellosis and to identify the pathophysiological connection with the possible development of vascular endothelial dysfunction.

Material and methods. A study of clinical material (plasma/serum) from 57 people with a laboratory-confirmed diagnosis of "Acute brucellosis" was carried out; 34 donors formed a control group (who had not had brucellosis and were not vaccinated against this infection). For all subjects, platelet aggregation was determined using the turbidimetric method according to Born and O'Brien, taking into account the degree and rate of aggregation of platelet-rich plasma according to light transmission curves under the influence of inducers (ADP, collagen, ristocetin).

Results. In the group of patients with brucellosis, a statistically significant decrease in the degree of aggregation induced by ADP, collagen and ristocetin was established relative to the control group. When analyzing the concentration of markers of endothelial dysfunction in the group of patients, an increase in the level of endothelin-1, nitric oxide and its metabolites was revealed in comparison with the control group.

Conclusion. Inhibition of platelet aggregation activity with inducers (ADP, collagen, ristocetin), which have different mechanisms of action, in patients with acute brucellosis may be associated with a protective reaction that prevents thrombus formation, but leads to the development of thrombocytopenia with a violation of the reaction of release of components from platelet granules and the functional ability of platelets (in particular, aggregation), against the background of a normal platelet count, leading to dysfunction of the endothelium. The study demonstrated a pathophysiological connection between a decrease in platelet aggregation and the development of endothelial dysfunction in brucellosis.

Key words: brucellosis, endothelium; platelet aggregation; aggregation inducers.

For citation: Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N., Kovalevich N.I., Sannikova I.V., Golub O.G. Platelet aggregation activity in patients with acute brucellosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 735-740 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-735-740>

For correspondence: Sarkisyan Nushik Saakovna, PhD, head of the Department of consulting and preventive work, doctor of clinical laboratory diagnostics; e-mail: nyshik25@yandex.ru

Information about authors:

Sarkisyan N.S., <https://orcid.org/0000-0003-3512-5738>;

Kulichenko A.N., <http://orcid.org/0000-0002-9362-3949>;

Kovalevich N.I., <http://orcid.org/0000-0002-3695-125X>;

Sannikova I.V., <http://orcid.org/0000-0002-2840-1848>.

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

Financing. The study had no sponsor support.

Received 20.06.2023

Accepted 25.09.2023

Published 10.12.2023

Введение. Актуальность проблемы бруцеллезной инфекции на современном этапе обуславливает необходимость изучения особенностей патогенеза болезни, в том числе изменений в системе тромбоциты - эндотелий сосудов, что может сыграть свою роль в совершенствовании схем терапии, прогнозировании течения заболевания. Тромбоциты, выполняющие как гемостатическую, так и иммунорегуляторную роль, активно участвуют в воспалительных и иммунных реакциях [1, 2], в частности за счет наличия Toll-подобных рецепторов (TLR) и гликопротеинов, взаимодействующих с бактериальными клетками [3]. В нормальных условиях циркулирующие в крови тромбоциты практически не взаимодействуют с сосудистой стенкой, которая изнутри покрыта монослоем эндотелиальных клеток. Однако при повреждении стенки сосуда (действие экзо- и эндотоксинов) тромбоциты вступают в контакт с эндотелием и прикрепляются (адгезируют) к компонентам субэндотелиального матрикса сосуда под влиянием определенных биологически активных веществ (индукторов), что ведет к слипанию (агрегации) кровяных пластинок. Главные субстраты адгезии - присутствующие в субэндотелии коллаген и фактор Виллебранда [4].

Тромбоциты при активации секретируют из гранул разнообразные вещества и вступают во взаимодействие с белками плазмы и клеток крови, их активация связана с многочисленными рецепторами и сложными сигнальными каскадами. Обилие мембранных рецепторов тромбоцитов, содержание значительного количества гранул и их роль в процессе гемостаза определяют широкий круг патологии тромбоцитарного звена гемостаза и его клиническую значимость. Иммуногемостаз рассматривается как первая линия неспецифической защиты макроорганизма при повреждении эндотелия [5, 6]. Генерализованная реакция, индуцированная провоспалительными цитокинами, форменными элементами крови, в частности, тромбоцитами, плазменными

системами гуморальной регуляции и сосудистым эндотелием, формирует системный воспалительный ответ [8, 9]. Системные инфекции связаны с активацией и агрегацией тромбоцитов, приводящие к тромбоцитопении и активации системы свертывания крови [7].

Исследование агрегационной активности тромбоцитов является одним из наиболее востребованных скрининговых методов оценки тромбоцитарного звена гемостаза [12 - 14, 16].

В качестве индукторов агрегации тромбоцитов используют адреналин, аденозиндифосфат (АДФ), коллаген, ристоцетин. Аденозиндифосфат (АДФ) стимулирует пуриновые рецепторы тромбоцитов, которые повышают проницаемость клеточных мембран для ионов кальция, что, в свою очередь, ведёт к активации гликопротеинов IIb/IIIa и повышению их способности связывания с фибриногеном. В результате запускается процесс агрегации. Действие коллагена на тромбоциты ведет к их рецепторной активации, адгезии и агрегации. Ристоцетин - антибиотик, который стимулирует взаимодействие фактора фон Виллебранда с тромбоцитарным гликопротеином GP-Ib (обеспечение адгезии тромбоцитов к эндотелию). Фактор Виллебранда может также выступать в качестве лиганда для тромбоцитарного интегрина (GPIIb/IIIa), тем самым способствуя агрегации тромбоцитов [15].

Патофизиологический механизм сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза при бруцеллезной инфекции изучен недостаточно. Тромбоцитопении, тромбоцитопатии могут протекать у больных бруцеллезом как бессимптомно, так и с разной степенью выраженности геморрагического синдрома. Обычно эти изменения нестойки и купируются на фоне лечения, тяжелая тромбоцитопения при бруцеллезе встречается редко. Липополисахаридные комплексы бруцелл инициируют развитие воспаления, в результате происходит запуск и активация клеточных реакций, связанных

с синтезом провоспалительных цитокинов, повышающих проницаемость сосудов, ведущих к дисфункции эндотелия и, как следствие, к нарушениям в системе микроциркуляции [10, 11]. Проблема эндотелиальной дисфункции привлекает в настоящее время внимание многих исследователей, поскольку дисфункция эндотелия является одним из предикторов нарушения микроциркуляции.

Целью настоящего исследования было изучение агрегационной активности тромбоцитов у больных острым бруцеллёзом и выявление патофизиологической связи с возможным развитием дисфункции эндотелия сосудов.

Материал и методы. Исследовали клинический материал (плазма/сыворотка крови) от 57 человек с лабораторно подтвержденным диагнозом острый бруцеллёз, поступивших в инфекционное отделение, специализированное по диагностике, лечению и профпатологии бруцеллёза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя; РГБ ЛПУ «Карачаево-Черкесская Республиканская клиническая больница». В контрольную группу были включены 34 человека, не переболевшие бруцеллёзом и не вакцинированные против этой инфекции.

Критерии исключения из исследования: острые инфекционные заболевания (кроме бруцеллёза), обострение тяжелых соматических заболеваний, опухоли любой локализации, диффузные заболевания соединительной ткани.

Отбор и рандомизацию больных бруцеллёзом производили в соответствии с индивидуальными регистрационными картами больных (истории болезни) с учетом классификации клинических форм бруцеллёза по Г.П. Рудневу (1955). Все больные острым бруцеллёзом имели среднюю степень тяжести течения болезни, в фазе компенсации.

Среди обследованных преобладали мужчины (70%), при этом различие показателей в зависимости от пола в обследуемых группах не имело статистической значимости, в связи с чем, мы сочли возможным объединить их в группу без учета половой принадлежности. Возраст обследованных - от 18 до 69 лет.

Все обследуемые дали информированное добровольное согласие на участие в настоящих исследованиях (согласно Федеральному закону «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» от 21.11.2011 № 323-ФЗ, ред. от 30.12.2021 г.). Клинические исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России (заключение локального этического комитета № 109 от 19 мая 2022 г.).

Преаналитический этап лабораторных исследований проводили в соответствии с существующими приказами и рекомендациями Министерства здравоохранения РФ по контролю качества лабораторных исследований. Обеззараживание исследуемого материала (крови) осуществляли в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Турбидиметрическим методом по Борну и О'Брайену, основанном на регистрации изменений оптической плотности, с использованием лазерного анализатора агрегации тромбоцитов АЛАТ2-«БИОЛА» (Россия) и

набора реагентов АГРЕНАМ («НПО РЕНАМ», Россия), исследовали индуцированную агрегацию тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), которую получали при центрифугировании крови при 150-200 g в течение 10 минут на лабораторной центрифуге Hettich Eba 20 (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Франция) [17]. Калибровку осуществляли по бедной тромбоцитами плазме ($<10 \times 10^9/\text{л}$), получаемой при центрифугировании крови при 2500 g в течение 15 минут.

Приготовленные рабочих растворов индукторов агрегации (аденозиндифосфата (АДФ), коллагена и ристоцетина) осуществляли с использованием тест-реагентов НПО «РЕНАМ» (Россия). Запись кривых агрегации осуществляли в соответствии с параметрами программного обеспечения AGGR, версия 4.0 (НПФ «Биола», Россия). Оценивали степень агрегации клеток (в %) по кривой светопропускания и скорость агрегации по кривой среднего размера агрегатов (в отн. ед./мин.).

Определение концентрации эндотелина-1, окиси азота и её метаболитов (нитритов и нитратов $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) выполняли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов Endothelin 1 - ELISA (R&D systems, США), Total NO Nitrate/Nitrite (R&D systems, США). Оптическую плотность реакционной смеси регистрировали с применением фотометра для микропланшет ELx808 производства BioTek Instruments (США).

Для статистического анализа использовали t-критерий Стьюдента, уровень достоверности принимали равным при $p \leq 0,05$. Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для доказательства нормальности распределения данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова.

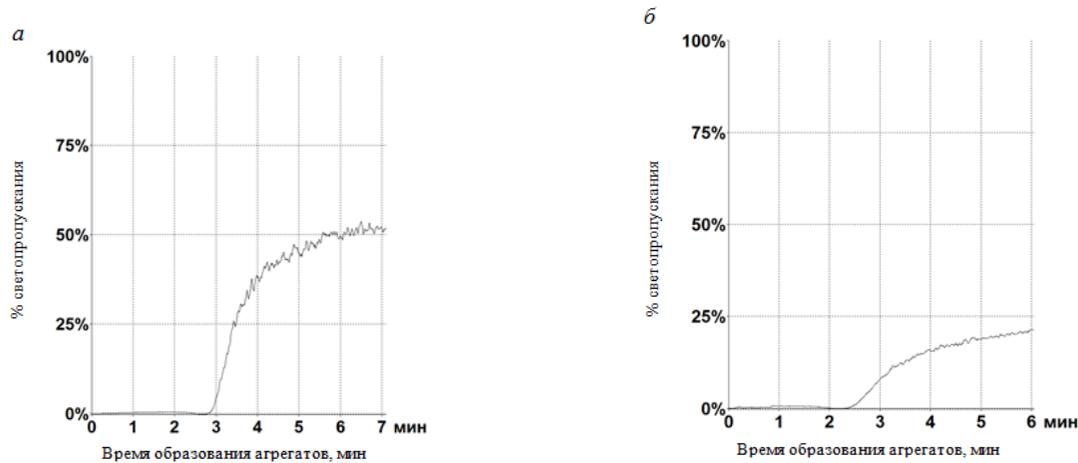
Результаты и обсуждение. При исследовании спонтанной агрегации тромбоцитов не было выявлено различий между контрольной группой и группой больных бруцеллёзом. На агрегатограмме регистрировали двойную волну агрегации при внесении в обследуемую плазму индуктора АДФ. Первая фаза (первичная волна) обусловлена эффектом добавленного экзогенного АДФ, вторая фаза (вторичная волна агрегации) - реакцией высвобождения собственных агонистов, содержащихся в гранулах тромбоцитов. Степень агрегации тромбоцитов и реакции высвобождения (выброса содержимого гранул) зависит от природы агрегирующего агента и его дозы. Небольшие количества индуктора (0,1 мг/мл) вызывают обратимую агрегацию, переходящую в дезагрегацию. При более высоких его концентрациях (1 мг/мл) первая фаза агрегации сменяется второй, которая необратима и связана с реакцией высвобождения.

При исследовании АДФ-индуцированной агрегации в группе больных бруцеллёзом было установлено статистически значимое снижение степени агрегации по кривой светопропускания ($43,1 \pm 2,26$ %) относительно группы контроля ($66,7 \pm 1,16$ %, $p < 0,05$) и повышение скорости агрегации тромбоцитов по кривой среднего размера агрегатов ($8,58 \pm 0,60$ отн. ед./мин) по сравнению с контрольными значениями ($3,37 \pm 0,11$ отн. ед./мин). У больных бруцеллёзом высвобождение АДФ из плотных гранул тромбоцитов (вторичная волна) свидетельствует о низкой активации специфических рецепторов тромбоцитов вследствие воздействия антиген-

ных детерминант бруцелл.

Коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов имеет достаточно выраженную латентную фазу, во время которой происходит активация фосфолипазы С. Добавление данного реагента (коллагена) способствует активации, адгезии и агрегации тромбоцитов за счёт стимуляции их мембранных рецепторов, что приводит к высвобождению внутриклеточных сигнальных молекул (G-белки, внутриклеточный кальций, циклические нуклеотиды, фосфолипаза С); продолжительность этой

фазы составила 2-3 минуты. У больных бруцеллёзом отмечалось статистически значимое снижение степени агрегации по кривой светопропускания ($23,0 \pm 3,05$ %) относительно контрольной группы ($64,7 \pm 0,95$ %; $p < 0,05$). Выявлено повышение скорости агрегации тромбоцитов по кривой среднего размера агрегатов ($2,65 \pm 0,24$ отн. ед./мин) относительно данных контроля ($1,89 \pm 0,07$ отн. ед./мин, $p < 0,05$), что отражает выраженность эндотелиальной дисфункции. Данные отражены на рисунке, а, б.



Коллаген-индуцированная агрегация. Степень агрегации по кривой светопропускания,%. а – донор группы контроля, б – больной бруцеллёзом.

Определение агрегации тромбоцитов с ристоцетином применяется для количественной оценки фактора Виллебранда - гликопротеина, который синтезируется мегакариоцитами и эндотелиальными клетками. Синтезируемый мегакариоцитами фактор Виллебранда попадает в тромбоциты, где содержится в α -гранулах и секретируется из них при активации тромбоцитов. В ходе проведенного исследования у больных острым бруцеллёзом выявлено статистически значимое снижение степени агрегации тромбоцитов по кривой

светопропускания ($31,5 \pm 3,0$ %) относительно контрольной группы ($66,3 \pm 1,6$ %, $p < 0,05$). В то же время отмечалось повышение скорости агрегации тромбоцитов по кривой среднего размера агрегатов ($6,70 \pm 0,45$ отн. ед./мин) относительно данных контроля ($2,19 \pm 0,09$ отн. ед./мин, $p < 0,05$). Фактор Виллебранда способствует адгезии тромбоцитов к коллагену сосудистой стенки. Ристоцетин-индуцированная агрегация тромбоцитов свидетельствует о выраженности ряда тромбоцитопатий. Полученные результаты представлены в таблице.

Показатели агрегации тромбоцитов с АДФ, ристоцетином и коллагеном в обследуемых группах

Показатель	Группы обследуемых					
	Контрольная группа (n=34)			Больные бруцеллёзом (n=57)		
	АДФ, 1 мг/мл	Коллаген, 2 мг/мл	Ристоцетин, 15 мг/мл	АДФ, 1 мг/мл	Коллаген, 2 мг/мл	Ристоцетин, 15 мг/мл
Степень агрегации по кривой светопропускания, %	$66,7 \pm 1,16$	$64,7 \pm 0,95$	$66,3 \pm 1,60$	$43,1 \pm 2,26$ ($p \leq 0,05$)	$23,0 \pm 3,05$ ($p \leq 0,05$)	$31,5 \pm 3,0$ ($p \leq 0,05$)
Скорость агрегации по кривой среднего размера агрегатов, отн. ед./мин	$3,37 \pm 0,11$	$1,89 \pm 0,07$	$2,19 \pm 0,09$	$8,58 \pm 0,60$ ($p \leq 0,05$)	$2,65 \pm 0,24$ ($p \leq 0,05$)	$6,70 \pm 0,45$ ($p \leq 0,05$)

Примечание. *p* - достигнутый уровень значимости критерия различий по сравнению с контрольной группой.

При анализе концентрации маркеров эндотелиальной дисфункции в исследуемых группах было выявлено повышение уровня эндотелина-1, который составил $3,89 \pm 0,24$ пг/мл по сравнению со значением в контрольной группе $2,03 \pm 0,66$ пг/мл. Уровень стабильных метаболитов окиси азота (нитриты) в сыворот-

ке больных острым бруцеллёзом составил $207,4 \pm 11,0$ мкмоль/л, уровень нитратов - $170,9 \pm 10,2$ мкмоль/л, что значительно выше по сравнению с группой контроля ($92,6 \pm 12,3$ и $59,8 \pm 10,1$ мкмоль/л соответственно; $p \leq 0,05$). Результаты проведенных исследований указывают на повышение синтеза эндотелиального оксида

азота и эндотелина-1. Выявленные изменения способствуют ослаблению барьерных свойств эндотелия, что сопряжено с системной воспалительной реакцией, возможно, приводящей к микрососудистым осложнениям при бруцеллезной инфекции. Важная роль в регуляции сосудистого тонуса и адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов отводится оксиду азота (NO) - нестабильной молекуле, которая синтезируется в эндотелии, обладает свойствами сильного оксиданта и вызывает повреждение клеток и тканей. Оксидантный стресс, синтез мощных вазоконстрикторов (эндотелин-1) являются главными факторами воспаления, повреждающими эндотелий. Вследствие незавершенного фагоцитоза бруцелл макрофагами развиваются бактериемия и эндотоксинемия, оказывающие токсическое действие сначала на клетки крови, которые являются первичной мишенью эндотоксина, затем на эндотелий (вторичную мишень), что приводит к его дисфункции. Эндотелиальная дисфункция ведет к сдвигам регуляции гомеостаза и проницаемости сосудистой стенки, и, как следствие, к нарушению микроциркуляции.

Заключение. Угнетение агрегационной активности тромбоцитов у больных острым бруцеллезом, возможно, связано с развитием защитной реакции, препятствующей тромбообразованию, но ведущей к развитию тромбоцитопатии с нарушением реакции высвобождения компонентов из гранул тромбоцитов.

Тромбоциты, наряду с нейтрофилами и моноцитами, являются одними из клеток, с которыми сталкиваются бактерии во время внеклеточной фазы. При этом происходит их активация, адгезия, агрегация с другими тромбоцитами за счёт высвобождения из гранул низкомолекулярных веществ (АДФ, фактор Виллебранда и др.). Угнетение агрегационной активности тромбоцитов приводит к направленной стабилизации процессов плазменно-коагуляционного звена гемостаза, препятствующих снижению свертывания крови. При этом отмечается повышение концентрации эндотелина-1, окиси азота и её метаболитов, ведущих к развитию эндотелиальной дисфункции и нарушению микроциркуляции.

АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов позволяет оценить основные этапы агрегации тромбоцитов (фазу индуцированной агрегации - увеличение числа и размера агрегатов; фазу высвобождения и фазу дезагрегации с последующей стабилизацией - уменьшение числа и размера агрегатов). Показатели коллаген- и ристоцетин-индуцированной агрегации свидетельствуют о нарушенном функциональном состоянии эндотелия.

Дефект высвобождения компонентов из гранул (тромбоксан А2, АДФ, фактор Виллебранда и др.) сопровождается нарушением агрегации тромбоцитов *in vitro* в присутствии АДФ, ристоцетина, коллагена. Механизм развития дефекта высвобождения не полностью ясен, но причиной может служить нарушение рецепторной передачи сигнала от мембранных рецепторных структур тромбоцита, что приводит к невозможности в достаточном объеме высвободить содержимое гранул при активации клеток.

Длительно протекающая инфекция вследствие персистенции возбудителя бруцеллеза способствует нарушению гемостаза, гемодинамики, развитию продуктивного воспаления, что приводит к полиорганным поражениям. Эндотелий играет существенную роль

в поддержании общего гомеостаза, он синтезирует биологически активные вещества, контролирующие сосудистый тонус, свертывающую и противосвертывающую системы. Липополисахаридный эндотоксин (ЛПС) грамотрицательных микроорганизмов при бактериемии повреждает эндотелий, что приводит к синтезу прокоагулянтных веществ (тканевого фактора, фактора фон Виллебранда, фактора 5, эндотелина) [15], цитокинов, веществ, повышающих проницаемость сосудов, ведущих к нарушениям в системе микроциркуляции, и трофического обеспечения тканей и органов. Активация тромбоцитов и их взаимодействие с эндотелиальными клетками являются ключевым патогенетическим фактором системного воспалительного ответа, сопровождающегося микрореологическими нарушениями. Выявлена патофизиологическая связь снижения агрегационной активности тромбоцитов с развитием эндотелиальной дисфункции. Но, несмотря на нормальное содержание тромбоцитов ($265,0 \pm 9,5 \cdot 10^9/\text{л}$), у больных бруцеллезом развивается тромбоцитопатия с нарушением функциональной активности тромбоцитов (в частности, агрегации), что клинически проявляется склонностью к образованию микроангиопатий - петехий, эритем.

Комплексная диагностика тромбоцитопатий основывается на данных клинического анализа крови (определение количества тромбоцитов и тромбоцитарных индексов), изучение агрегационной способности тромбоцитов с АДФ, ристоцетином, коллагеном, показателей коагулограммы. Таким образом, анализ индуцированной агрегации тромбоцитов при бруцеллезной инфекции позволяет количественно оценить нарушения сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза, коррелирующие с интенсивностью системного воспалительного ответа и, возможно, разработать в перспективе методы прогнозирования течения заболевания. Безусловно, необходимо дальнейшее изучение последствий изменения уровня окиси азота и её метаболитов, а также эндотелина-1 для более глубокого понимания участия этих показателей в патогенезе бруцеллеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abdulkadir Küçükbayrak, Tekin Taş, Mehmet Tosun, Gülali Aktaş, Aytakin Alçelik, İsmail Necati et al. Could thrombocyte parameters be an inflammatory marker in the brucellosis? *Med. Glas (Zenica)*. 2013; 10(1): 35-9.
2. Herter J. M., Rossaint J., Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J. Thromb. Haemost.* 2014;12(11):1764-75. DOI: 10.1111/jth.12730.
3. Свиридова С.П., Соменова О.В., Кашия Ш.Р., Обухова О.А., Сотников А.В. Роль тромбоцитов в воспалении и иммунитете. *Исследования и практика в медицине*. 2018; 5(3): 40-52. DOI: 10.17709/240922312018534.
4. Савченко А.П., Медведев И.Н. Механизмы функционирования тромбоцитарного гемостаза. *Фундаментальные исследования*. 2009; 10: 28-30.
5. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(1): 34-45. DOI: 10.1038/nri3345.
6. Marshall J.C. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol. Med.* 2014; 20(4):195-203. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.01.007.
7. Kristin Jahn, Thomas P Kohler, Lena-Sophie Swiatek, Sergej Wiebe, Sven Hammerschmidt. Platelets, Bacterial Adhesins and the Pneumococcus. *J. Cells*. 2022; 11(7): 1121. DOI: 10.3390/cells11071121.
8. Абдуллаев Р.Ю., Каминская Г.О., Комиссарова О.Г. Сдвиги в системе гемостаза - компонент синдрома системного воспалительного

- ного ответа при туберкулезе. *Врач*. 2012; 2: 24-8.
9. Каминская Г.О., Абдуллаев Р.Ю., Комиссарова О.Г. Особенности синдрома системного воспалительного ответа и нутритивного статуса у больных туберкулезом легких с сопутствующим сахарным диабетом 1-го и 2-го типов. *Журнал Туберкулез и болезни легких*. 2017; 95(3): 32-9. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-3-32-40.
 10. Paul de Figueiredo, Thomas A Ficht, Allison Rice-Ficht, Carlos A Rossetti, L Garry Adams. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions. *Am. J. Pathol.* 2015; 185(6): 1505-17. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.
 11. Baldi P.C. Giambartolomei G.H. Immunopathology of *Brucella* infection. *Recent Pat. Antiinfect. Drug. Discov.* 2013; 8(1): 18-26. DOI: 10.2174/1574891X11308010005.
 12. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Издание 3-е. М.: Ньюдиамед-АО; 2008.
 13. Долгов В.В., Свиринов П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М.-Тверь: Триада; 2005.
 14. Кочетов А.Г., Лянг О.В., Политидис Р.Р., Огурцов П.П., Джаппуев А.Д. Стандартизация оценки турбидиметрического метода исследования агрегационной активности тромбоцитов. *Вестник РУДН, серия Медицина*. 2012; 2: 122-8.
 15. Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. СПб: Издательство Санкт-Петербургского государственного медицинского университета; 2003.
 16. Савченко А.П., Зайцев В.В., Макурина О.Н. Физиологические основы диагностики агрегации тромбоцитов у биологических объектов. *Вестник Здоровье и образование в XXI веке*. 2017; 19(1): 14-8.
 17. Козловский В.И., Ковтун О.М., Сероухова О.П., Детковская, И.Н., Козловский И.В. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2013; 12 (4): 79- 91.
 4. Savchenko A.P., Medvedev I.N. Functioning mechanisms of platelet hemostasis. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2009; 10: 28-30. (in Russian)
 5. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(1): 34-45. DOI: 10.1038/nri3345.
 6. Marshall J.C. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol. Med.* 2014; 20(4):195-203. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.01.007.
 7. Kristin Jahn, Thomas P Kohler, Lena-Sophie Swiatek, Sergej Wiebe, Sven Hammerschmidt. Platelets, Bacterial Adhesins and the Pneumococcus. *J. Cells.* 2022; 11(7): 1121. DOI: 10.3390/cells11071121.
 8. Abdullaev R.Yu., Kaminskaya G.O., Komissarova O.G. Shifts in the hemostasis system are a component of the systemic inflammatory response syndrome in tuberculosis. *Vrach*. 2012; 2: 24-8. (in Russian)
 9. Kaminskaya G.O., Abdullaev R. Yu., Komissarova O.G. Features of the systemic inflammatory response syndrome and nutritional status in patients with pulmonary tuberculosis with concomitant diabetes mellitus of the 1st and 2nd types. *Zhurnal Tuberkulez I bolezni legkikh*. 2017; 95(3): 32-9. DOI: 10.21292/2075-1230-2017-95-3-32-40. (in Russian)
 10. Paul de Figueiredo, Thomas A Ficht, Allison Rice-Ficht, Carlos A Rossetti, L Garry Adams. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: Review of Brucella-host interactions. *Am. J. Pathol.* 2015; 185(6): 1505-17. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.
 11. Baldi P.C. Giambartolomei G.H. Immunopathology of *Brucella* infection. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug. Discov.* 2013; 8(1): 18-26. DOI: 10.2174/1574891X11308010005.
 12. Barkagan Z.S., Momot A.P. Diagnosis and controlled therapy of hemostasis disorders. 3rd ed. Moscow: N'yumed-AO; 2008. (in Russian)
 13. Dolgov V.V., Svirin P.V. Laboratory diagnosis of hemostasis disorders [Laboratornaya diagnostika narusheniy gemostaza]. Moscow-Tver': Triada; 2005. (in Russian)
 14. Kochetov A.G., Lyang O.V., Politidis R.R., Ogurtsov P.P., Dzhappuev A.D. Standardization of the assessment of the turbidimetric method for studying the aggregation activity of platelets. *Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzhby narodov (seriya Meditsina)*. 2012; 2: 122-8. (in Russian)
 15. Petrishchev N.N., Vlasov T.D. Endothelial dysfunction. Causes, mechanisms, pharmacological correction [Disfunktsiya endoteliya. Prichiny, mekhanizmy, farmakologicheskaya korrektsiya]. St.Petersburg: Pervyi Sankt-Peterburgskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet imeni akad. I.P. Pavlova; 2003. (in Russian)
 16. Savchenko A.P., Zaitsev V.V., Makurina O.N. Physiological bases for the diagnosis of platelet aggregation in biological objects. *Zdorov'e I obrazovanie v XXI veke*. 2017; 19(1): 14-8. (in Russian)
 17. Kozlovsky V.I., Kovtun O.M., Seroukhova O.P., Etkovskaya I.N., Kozlovsky I.V. Research methods and clinical significance of platelet aggregation, focus on spontaneous aggregation. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2013; 12 (4): 79-91. (in Russian)

REFERENCES

1. Abdulkadir Küçükbayrak, Tekin Taş, Mehmet Tosun, Gülali Aktaş, AYTEKİN ALÇELİK, İsmail Necati et al. Could thrombocyte parameters be an inflammatory marker in the brucellosis? *Med. Glas (Zenica)*. 2013; 10(1): 35-9.
2. Herter J. M., Rossaint J., Zarbock A. Platelets in inflammation and immunity. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12(11):1764-75. DOI: 10.1111/jth.12730.
3. Sviridova S.P., Somonova O.V., Kashiya Sh.R., Obukhova O.A., Sotnikov A.V. The role of platelets in inflammation and immunity. *Issledovaniya i praktika v meditsine*. 2018; 5(3): 40-52. DOI: 10.17709/240922312018534. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Йовдий А.В., Смольникова М.В., Шерстнев Ф.С.

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ АЛЛОИММУНИЗИРОВАННОГО ПАЦИЕНТА (СЛУЧАЙ ИЗ ПРАКТИКИ)

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», 610027, Киров, Россия

При проведении обязательного предтрансфузионного скрининга антител и идентификации группы крови системы ABO можно столкнуться с трудностями, обусловленными свойствами некоторых аллоантител. Представлен случай из практики - пример взаимодействия анти-M аллоантител с тест-эритроцитами. Описаны особенности результатов иммуногематологического тестирования пациентов с аллоантителами класса IgM.

Ключевые слова: эритроциты; антигены; аллоантитела; MNS; идентификация антител.

Для цитирования: Йовдий А.В., Смольникова М.В., Шерстнев Ф.С. Особенности иммуногематологической диагностики аллоиммунизированного пациента (случай из практики). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12):741-743. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-741-743>

Для корреспонденции: Йовдий Анна Васильевна, канд. мед. наук, зав. лаб. иммуногематологии; e-mail: annaovdii@bk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 13.09.2023

Принята к печати 08.11.2023

Опубликовано 10.12.2023

Yovdiy A.V., Smolnikova M.V., Sherstnev F.S.

FEATURES OF IMMUNOHMATOLOGICAL DIAGNOSIS OF AN ALLOIMMUNIZED PATIENT (CASE FROM PRACTICE)

Federal State Budget Institution of Science «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical-Biological Agency», 610027, Kirov, Russia

When carrying out mandatory pre-transfusion antibody screening and identification of the ABO blood group, difficulties may be encountered due to the properties of some alloantibodies. The paper presents a clinical example of the interaction of anti-M alloantibodies with test red blood cells. The features of the results of immunohematological testing of patients with alloantibodies of the IgM class are described.

Key words: red blood cells; antigens; alloantibodies; MNS; antibody identification.

For citation: Yovdiy A.V., Smolnikova M.V., Sherstnev F.S. Features of immunohematological diagnostics of an alloimmunized patient (case from practice). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 741-743. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-741-743>

For correspondence: Yovdiy A.V., researcher of the Laboratory of Immunohematology; e-mail: annaovdii@bk.ru

Information about authors:

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

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

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.09.2023

Accepted 08.11.2023

Published 10.12.2023

Введение. Частота гемолитических осложнений после гемотрансфузионной терапии, по данным системы гемонадзора Великобритании (SHOT 2022), составляет 49 случаев в год [1]. Большинство эпизодов гемолиза эритроцитов обусловлены аллоантителами к антигенам систем Kidd, Duffy, Rh, MNS. Анти-M антитела являются причиной как отсроченного, так и острого гемолиза [1,2].

В Российской Федерации скрининг и идентифика-

ция антиэритроцитарных антител - обязательные этапы профилактики гемолитических посттрансфузионных осложнений [3 - 5]. При проведении предтрансфузионных иммуногематологических исследований необходимо учитывать особенности некоторых аллоантител, затрудняющие их идентификацию, установление групповой принадлежности крови пациента [6, 7].

Описание случая из практики. Пациентка М., 24.12.2018 года рождения (4 года 7 месяцев) посту-

пила в клинику ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России 28.03.2022 г. с геморрагической сыпью на спине, экхимозами на коже верхних и нижних конечностей, эрозиями на слизистой оболочке щёк в течение двух недель. В общем анализе крови выявлены: тромбоцитопения $PLT-6 \cdot 10^9/л$, лейкоцитоз $WBC-13,8 \cdot 10^9/л$. Показатели эритроцитарного ростка кроветворения в пределах возрастной нормы (Hb 126 г/л, RBC $3,34 \cdot 10^{12}/л$). В анамнезе заболевания трансфузий компонентов крови не зафиксировано. Установлен диагноз: впервые выявленная идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, острое течение. Информированное согласие законных представителей пациента на обследование и лечение получено. Проведены иммуногематологические исследования с использованием реактивов и анализатора фирмы BioRad (США). Определен фенотип эритроцитов больной: А (анти-В ++++, анти-А++) Rh-положительный C+c+E+e+ K-k+ (рис. 1). При типировании подгруппы антигена А обнаружена экспрессия A_1 . На этом основании сделано заключение, что анти-А антитела не являются экстраагглютинидами.

В непрямом антиглобулиновом тесте выявлены аллоиммунные антиэритроцитарные антитела, отме-

чена разная сила агглютинации с тест-эритроцитами. Прямой антиглобулиновый тест отрицательный. Установлены анти-М (системы MNS) антитела в титре 1:8 со сниженной агглютинацией тест-эритроцитов, экспрессирующих антиген М в одинарной дозе (рис. 2).

Определён фенотип эритроцитов пациентки M-N+S-s+Jk(a-b+)Fy(a-b+). Подтверждено отсутствие экспрессии антигена М.

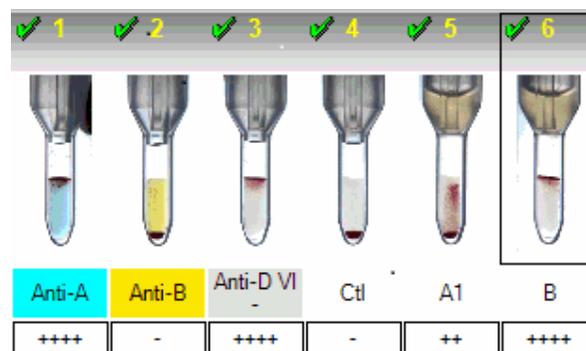


Рис. 1. Группа крови АВО пациента от 29.03.2022 г.

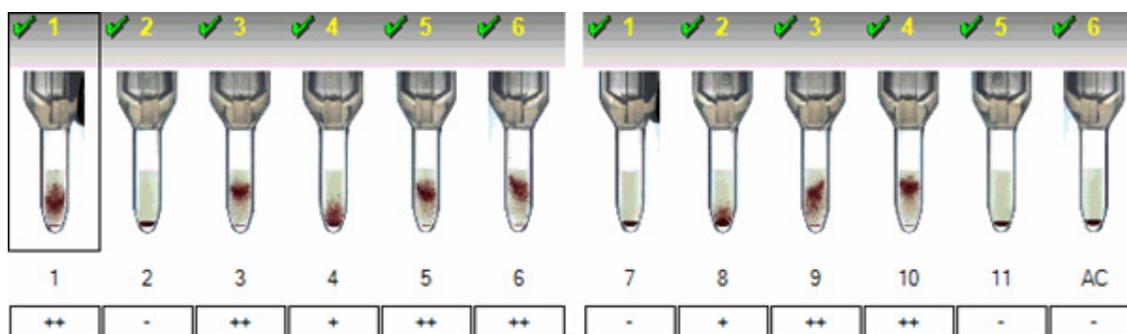


Рис. 2. Идентификация антител пациента от 29.03.2022 г.

Для установления класса антиэритроцитарных иммуноглобулинов выполнена инкубация плазмы больной с унитиолом в течение 1 часа. Повторный не прямой антиглобулиновый тест с трёхклеточной панелью эритроцитов отрицательный. Сделан вывод о принадлежности анти-М антител к классу IgM, что привело к выявлению данных молекул при определении группы крови АВО обратным методом.

Пациентке назначена терапия преднизолоном 2 мг/

кг (27,5 мг) и двукратное внутривенное введение иммуноглобулина 2 г/кг/сут. № 2 (11.04.2022 г., 12.04.2022 г.). Через две недели проведено повторное иммуногематологическое исследование. Установлена группа крови А (анти-В+++, анти-А-). Аллоиммунные анти-М антитела в непрямом антиглобулиновом тесте агглютинировали только эритроциты с фенотипом M+N- и не взаимодействовали с клетками M+N+ (рис. 3). Титр антител составил 1:4.

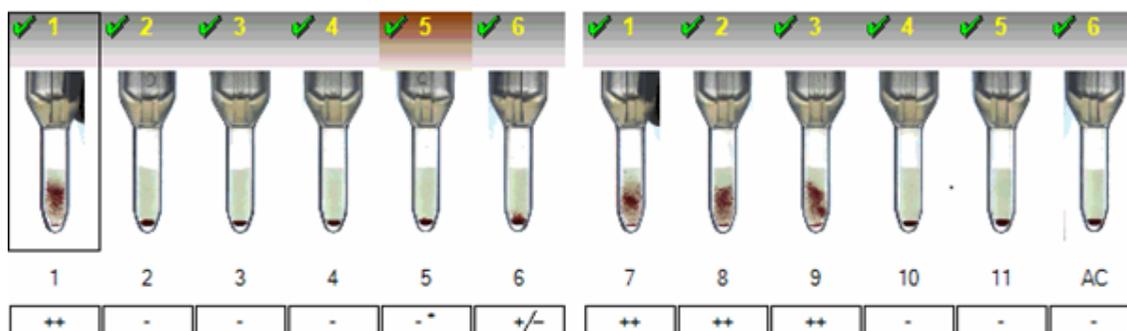


Рис. 3. Идентификация антител пациента от 14.04.2022 г.

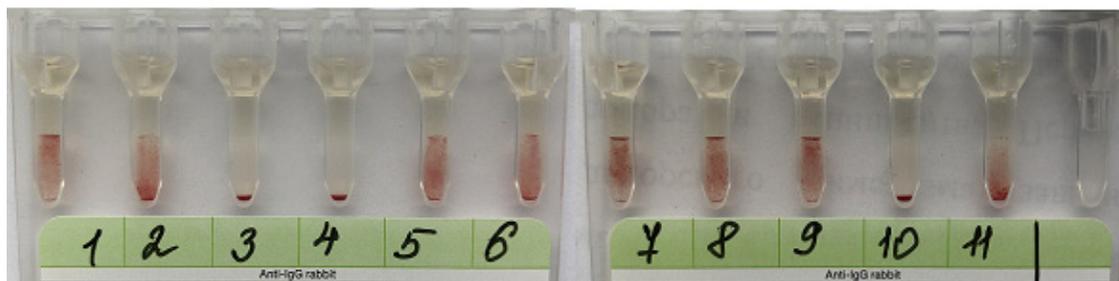


Рис. 4. Идентификация антител пациента после инкубации при 10 °С.

Поскольку антитела принадлежали к классу IgM, для получения полного соответствия результатов идентификационного тестирования, заявленным в инструкции, проведено усиление активности антител с помощью инкубации при 10 °С в течение 15 минут. Результаты представлены на рис. 4. Специфичность аллоантител анти-М подтверждена.

На фоне проводимого лечения у пациентки отмечалось уменьшение признаков геморрагического синдрома. Уровень тромбоцитов в анализе от 15.02.2022 г. составил $221 \cdot 10^9/\text{л}$. Проведение заместительной гемоконпонентной терапии не потребовалось. Больная выписана в удовлетворительном состоянии. Рекомендовано наблюдение участковым педиатром и гематологом в поликлинике по месту жительства.

Обсуждение. В представленном клиническом наблюдении выявлены особенности взаимодействия анти-М антител класса IgM со специфическими антигенами тест-эритроцитов.

Антитела могут взаимодействовать с М антигеном, экспрессированном на тест-эритроцитах A₁, B при определении группы крови ABO, что приводит к ложноположительному выявлению экстраагглютининов.

В непрямом антиглобулиновом тесте наблюдается снижение агглютинации эритроцитов, экспрессирующих антиген М в одинарной дозе.

Непрямой антиглобулиновый тест, проведенный при 10 °С, усиливает активность антител.

Терапия глюкокортикостероидами способствует снижению титра аллоантител и устранению несоответствия прямого и обратного методов определения группы крови ABO.

Заключение. При проведении обязательного предтрансфузионного скрининга антител и идентификации группы крови системы ABO можно столкнуться с трудностями, обусловленными свойствами некоторых аллоантител. Выявлены особенности взаимодействия анти-М антител класса IgM со специфическими антигенами тест-эритроцитов, которые могут взаимодействовать с М антигеном, экспрессированном на тест-эритроцитах A₁, B при определении группы крови ABO, что ведёт к ложноположительному выявлению экстраагглютининов. В непрямом антиглобулиновом тесте наблюдается снижение агглютинации эритроцитов, экспрессирующих антиген М в одинарной дозе. Непрямой антиглобулиновый тест, проведенный при

10 °С, усиливает активность антител. Терапия глюкокортикостероидами способствует снижению титра аллоантител и устранению несоответствия прямого и обратного методов определения группы крови ABO.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2 см. REFERENCES)

3. Бутина Е.В., Минеева Н.В., Зайцева Г.А., Попонина Е.А., Йовдий А.В. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов у пациентов с гематологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Трансфузиология*. 2019; 20 (2): 107-14.
4. Минеева Н.В., Пашкова И.И., Кробинец И.И., Сысоева Е.А. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов (обзор литературы). *Онкогематология*. 2015; 10 (4): 60-6.
5. Приказ Минздрава Российской Федерации от 20 октября 2020 г. № 1134 «Об утверждении порядка медицинского обследования реципиента, проведении проб на индивидуальную совместимость, включая биологическую пробу, при трансфузии донорской крови и (или) её компонентов».
6. 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): 221-4.
7. Пашкова И.А. Алгоритмы решения проблем предтрансфузионного иммуногематологического тестирования. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64 (2): 222-3.

REFERENCES

1. <https://www.shotuk.org/wp-content/uploads/myimages/SHOT-REPORT-2022-FINAL-Bookmarked.pdf>.
2. <https://www.shotuk.org/wp-content/uploads/myimages/SHOT-REPORT-2021-FINAL-bookmarked-V3-November.pdf>.
3. Butina E.V., Mineeva N.V., Zaytseva G.A., Poponina E.A., Yovdiy A.V. Red blood cell alloimmunization in patients with hematology/oncology disorders. *Transfuziologiya*. 2019; 20(2): 107-14. (in Russian)
4. Mineeva N.V., Pashkova I.A., Krobinecs I.I., Sysoeva E.A. Allosensibilisation to erythrocyte antigens (literature review). *Onkogematologiya*. 2015; 10 (4): 60-5. (in Russian)
5. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated October 20, 2020 No. 1134 On approval of the procedure for a medical examination of a recipient, testing for individual compatibility, including a biological sample, during transfusion of donor blood and (or) its components. (in Russian)
6. Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A., Zaytseva G.A., Minaeva N.V. Interpretation of the results of immunohematological studies in patients of the hematology clinic. *Clinical laboratory diagnostics*. 2019; 64 (4): 221-4. (in Russian)
7. Pashkova I.A. Algorithms for solving problems of pre-transfusion immunohematological testing. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2019; 64 (2): 222-33. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Чеснокова М. Г.^{1,2}, Чесноков В. А.³, Миронов А. Ю.^{4,5}, Турчанинов Д. В.¹

БАЙЕСОВСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГРИБОВ *CANDIDA ALBICANS* СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА НА ЭТАПАХ ПРОВЕДЕНИЯ ОРТОПЕДИЧЕСКОЙ РЕАБИЛИТАЦИИ

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия;

²ФГБОУ «Омский государственный технический университет» Министерства науки и высшего образования, 644050, Омск, Россия;

³БУЗОО ГСП № 4, 644030, Омск, Россия;

⁴ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁵Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 125371, Москва, Россия

Актуальную проблему ортопедической стоматологии представляет высокая степень риска возникновения кандидозного стоматита у пациентов, находящихся на ортопедической реабилитации, что обусловлено комплексом существующих неблагоприятных факторов, присутствующих в полости рта и обеспечивающих мощный негативный потенциал, способствующий развитию выраженного нарушения микробиоценоза в полости рта. Использование математических методов позволяет получить более полную информацию о пациенте, возможных диагнозах, об эффективности различных планов лечения.

Цель: оценить с помощью теоремы Байеса риск развития кандидозного стоматита у пациентов, пользующихся съёмными зубными протезами на этапах ортопедической реабилитации при оценке вероятности наличия *Candida albicans* в полости рта. **Материал и методы.** Проведена оценка вероятности наличия грибов при конкретном симптомокомплексе, определены информативные признаки.

Результаты. Полученные результаты представляют важное значение в стоматологической практике и клинической лабораторной диагностике.

Ключевые слова: теорема Байеса; информативные показатели; ортопедическая реабилитация; съёмные протезы; грибы; полость рта.

Для цитирования: Чеснокова М. Г., Чесноков В. А., Миронов А. Ю., Турчанинов Д. В. Байесовские подходы к определению грибов *Candida albicans* слизистой оболочки полости рта пациентов на этапах проведения ортопедической реабилитации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12): 744-750.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-744-750>

Для корреспонденции: Чеснокова Марина Геннадьевна, д-р мед. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.10.2023

Принята к печати 27.10.2023

Опубликовано 10.12.2023

Chesnokova M. G.^{1,2}, Chesnokov V. A.³, Mironov A. Yu.^{4,5}, Turchaninov D. V.¹

BAYESIAN APPROACHES TO THE IDENTIFICATION OF FUNGI *C. ALBICANS* IN THE ORAL MUCOSA AT THE STAGES OF ORTHOPEDIC REHABILITATION

¹FGBOU VO «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 644099, Omsk, Russia;

²FGBOU VO «Omsk State Technical University», of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 644050, Omsk, Russia;

³BUZOO GSP № 4, 644030, Omsk, Russia;

⁴FBUN G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology. Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

⁵Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies FMBA, 125371, Moscow, Russia

An urgent problem of orthopedic dentistry is the high risk of candidal stomatitis in patients undergoing orthopedic rehabilitation, which is due to a complex of existing unfavorable factors present in the oral cavity and providing a powerful negative potential that contributes to the development of a pronounced violation of microbiocenosis in the oral cavity.

The use of mathematical methods allows you to get more complete information about the patient, about possible diagnoses and about the effectiveness of various treatment plans.

*The purpose of the study was to assess, using the Bayes theorem, the risk of developing candidal stomatitis in patients using removable dentures at the stages of orthopedic rehabilitation when assessing the likelihood of having *Candida albicans* in the oral cavity.*

An assessment of the probability of the presence of yeast-like fungi in a specific symptom complex was carried out, informative signs were determined. The results obtained are of great importance in dental practice and clinical laboratory diagnostics

Key words: Bayes' theorem; informative indicators; orthopedic rehabilitation; removable dentures; fungi; oral cavity.

For citation: Chesnokova M. G., Chesnokov V. A., Mironov A. Yu., Turchaninov D.V. Bayesian approaches to the identification of fungi *Candida albicans* in the oral mucosa at the stages of orthopedic rehabilitation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 744-750. (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-744-750>

For correspondence: Chesnokova Marina Gennad'evna, doctor of medicine; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Information about authors:

Chesnokova M. G., <https://orcid.org/0000-0001-9055-977X>;

Chesnokov V. A., <https://orcid.org/0000-0003-4100-9354>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

Turchaninov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-6298-4872>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 25. 10. 2023

Accepted 27.10.2023

Published 10.12.2023

На протяжении последних десятилетий происходит более глубокое проникновение математических методов и компьютерных технологий в медицинскую практику. Многие медицинские задачи, при решении которых математические методы раньше не применялись вследствие огромных вычислительных трудностей, являются доступными для статистического анализа и точного решения [1-3].

Использование математических методов позволяет получить более полную информацию о пациенте, возможных диагнозах и об эффективности различных планов лечения [4,5]. Неопределённость в медицинской диагностике может быть измерена некоторым способом, зависящим от человеческого суждения, что делает возможным дальнейшую разработку технологии диагностики. Подход, лежащий в основе этой технологии и базирующийся на персоналистическом взгляде на вероятность, называют байесовским подходом. Байесовские статистические методы представляют собой отличный от общепринятого подход к теории статистического вывода.

В наших предыдущих исследованиях теорема Байеса применялась для оценки вероятности наличия *S. mutans* или *S. sanguis* микробиома полости рта у пациентов с несъёмными ортодонтическими аппаратами при конкретном симптомокомплексе [5]. Высокая степень риска возникновения кариеса у детей, находящихся на ортодонтическом лечении, часто обусловлена комплексом существующих неблагоприятных факторов [6-9], присутствующих в полости рта и обеспечивающих мощный негативный потенциал, создающий выраженную кариесогенную ситуацию в полости рта [10,11].

Представляет несомненный интерес развитие микотической колонизации поверхности съёмных зубных протезов, что часто ведёт к их дальнейшей биодеструкции и представляет актуальную проблему ортопедической

стоматологии [12,13]. Вероятность развития протезного стоматита на слизистой оболочке протезного ложа при применении полных съёмных пластинчатых протезов пациентами может составлять от 15 до 70% [14-17].

Неудовлетворительное гигиеническое состояние полости рта обусловлено плохим уходом за ортопедическими конструкциями, остатками частиц пищи, являющихся субстратом жизнедеятельности микроорганизмов, особенно, в межпроксимальных зонах, в придесневой области, на спинке языка, на элементах протеза, неудовлетворительной фиксацией и стабилизацией съёмных ортопедических конструкций, недостаточной фиксацией протеза при ношении. Рассмотренные факторы обуславливают возникновение дисбиотического сдвига полости рта, сопровождающегося увеличением роста условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), развитием микотической колонизации слизистой оболочки и базисной поверхности протеза и возникновением протезных стоматитов [18].

Высокая степень риска возникновения кандидозного стоматита у пациентов, находящихся на ортопедической реабилитации, связана с комплексом существующих неблагоприятных факторов, присутствующих в полости рта и обеспечивающих негативный потенциал, способствующий развитию выраженного нарушения микробиоценоза в полости рта [19,20].

Цель исследования: оценить с помощью теоремы Байеса риск развития кандидозного стоматита у пациентов, пользующихся съёмными зубными протезами на этапах ортопедической реабилитации при оценке вероятности наличия *Candida albicans* в полости рта.

Материал и методы. Основные идеи байесовского статистического подхода соответствуют следующему: 1) вероятности являются упорядоченными мнениями; 2) статистика связана с пересмотром мнений в свете новой информации; 3) теорема Байеса из теории ве-

роятностей является оптимальным формальным правилом, которое указывает, как именно должен быть сделан такой пересмотр. Вероятности служат для количественного выражения неопределённости, а субъективные меры вероятности позволяют выразить степень уверенности относительно данного признака, симптома или диагноза. Субъективная мера вероятности даёт возможность клиницисту выразить, насколько он уверен в клиническом заключении, в терминах относительных шансов или отношений правдоподобия. Субъективная мера вероятности - число, заключенное между 0 и 1 и выражающее степень уверенности некоего идеализированного субъекта в истинности данного утверждения.

Относительные шансы и отношения правдоподобия выражаются числами. Математическое определение условной вероятности симптома S при данном заболевании D таково: $P(S|D)=P(SD)/P(D)$, причём исключается случай $P(D)=0$ (1). Символ S обозначает любые сведения о пациенте в терминах симптомов, признаков и диагностических тестов. Все то, что мы обозначаем через S , будем называть одним термином – «симптомы», понимая под этим комплекс симптомов, признаки, лабораторные данные и т. д. Символ D обозначает заболевание (или определённое состояние, например наличие определённого вида микроорганизмов в некоторой концентрации). Обозначение вида $P(S|D)$ читается следующим образом: «вероятность S при данном D ».

Простые алгебраические преобразования уравнения (1) приводят к основной формуле Байеса: $P(D|S)=P(S|D)P(D)/P(S)$. (2) - при условии, что величины $P(D)$ и $P(S)$ не равны нулю. $P(D|S)$ - конечная, или апостериорная, вероятность наличия *Candida albicans* у пациентов, пользующихся съёмными зубными протезами представляет собой вероятность его наличия, «условную» по отношению ко всем предыдущим сведениям. $P(S|D)$ формально есть вероятность того, что данные симптомы будут обнаружены, если выделение грибов действительно имеет место. Эта величина выражает существенность данных симптомов для обнаружения этого представителя микробиома полости рта. Получение значений $P(S|D)$ для каждого симптома и диагноза является важным шагом при использовании теоремы Байеса в медицинской диагностике. В статистических приложениях величину $P(S|D)$ получают при помощи вычислений, основанных на так называемой статистической модели (например, на предположении о том, что наблюдаемые данные подчиняются нормальному распределению); в других приложениях величину $P(S|D)$ или какое-либо другое число, выполняющее ту же функцию, можно определить непосредственно из субъективного суждения.

С помощью теоремы Байеса проанализированы медицинские данные с точки зрения их диагностической ценности. Установлены характерные 40 симптомов, признаков, факторов риска, фоновые заболевания при ортопедической реабилитации пациентов, определена вероятность их обнаружения и отношение правдоподобия при концентрации грибов вида *Candida albicans* в полости рта пациентов, использующих съёмные зубные протезы. Микологическое исследование биоматериала от пациентов проводили при посеве на среду Сабуро с выделением чистой культуры грибов и дальнейшей

видовой идентификацией. Пациенты, находящиеся на ортопедическом лечении разделены на 4 группы. В 1-ю группу вошли пациенты с полным отсутствием зубов, пользующиеся съёмными зубными акриловыми протезами, продолжительностью ношения до 3-х лет (59 человек) с кандидозным стоматитом, во 2-ю контрольную группу - пациенты, пользующиеся протезами с продолжительностью ношения до 3-х лет

(65 человек) без кандидозного стоматита. 3-я группа представлена пациентами со сроком пользования съёмными зубными протезами более 3-х лет (73 человека) с кандидозным стоматитом, 4-я группа - пациентами с аналогичным сроком пользования протезами более 3-х лет (71 человек) без кандидозного стоматита.

Результаты. Результаты анализа симптомов и признаков по отношению правдоподобия $L(D1;S)$ у пациентов с кандидозным стоматитом представлены в табл. 1. Наиболее специфичными и информативными симптомами (признаками), позволяющими с высокой вероятностью определить наличие грибов в биотопе слизистой оболочки полости рта с продолжительностью ношения съёмных протезов до 3-х лет являлись гиперемия слизистой оболочки (6,794); сухость слизистой оболочки рта (5,823); наличие налёта на слизистой оболочке под протезом (3,777); наличие «заед» (2,571); налёт на поверхности протеза (2,479); наличие налёта на языке (1,983); частое применение антимикробных препаратов (АМП) (1,864); состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 2-го типа (1,731); пигментация поверхности протеза (1,629); кандидоз полости рта (1,515); отсутствие достаточной фиксации протеза (1,347); клинические признаки стоматита (1,441); кандидоз ЖКТ (1,259); жалобы при использовании протеза (1,231); состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 3 типа (1,202); балансирование протеза (1,140); длительное курение (1,102); приём кондитерских изделий более 5 раз (1,180); жжение слизистой оболочки рта в связи с предыдущим лечением (1,102); индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева с очень плохим уровнем (1,157); индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву с хорошим уровнем фиксации (1,102); состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 4-го типа (1,102); количество коррекций протеза за последний год 3-4 раза (1,054); пол мужской (1,035); устойчивость съёмных протезов неудовлетворительная (1,023); возраст пациента от 65 до 70 лет (1,026); устойчивость съёмных протезов удовлетворительная (1,047); индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву с неудовлетворительным уровнем (1,017).

Клинические индексы, симптомы, характеризующие пол женский (0,964); сахарный диабет (0,964); возраст пациента от 60 до 65 лет (0,979); индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева - плохой уровень (0,979); устойчивость полных съёмных пластиночных протезов хорошая (0,960); индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву - удовлетворительная фиксация (0,957); приём кондитерских изделий менее 5 раз (0,950); изготовление нового протеза (0,932)%; индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева - удовлетворительный уровень (0,898); количество коррекций протеза за последний год 0 (0,892); поломка протеза с последующей починкой (0,881);

состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 1-го типа (0,806) отнесены к пограничным значениям и у данной группы пациентов учитывались как неинформативные $L(D1;S) < 1$.

Симптомы и признаки по отношению правдоподобия при выявлении представителя микобиоты полости рта у пациентов 3-й и 4-й обследуемых групп представлены в табл. 2.

Таблица 1

Субъективные меры вероятности и отношение правдоподобия для симптомов у пациентов при ортопедическом лечении до 3-х лет (прогнозирование содержания *C. albicans*)

Код	Симптом, признак	P(S D1) 1-я группа	P(S D2) 2-я группа	Шанс для пациентов с КС	Отношение правдоподобия для пациентов с КС L(D1;S)
S1	Кандидоз ЖКТ	0,1356	0,1077	0,157	1,259
S2	Частое применение АМП	0,3729	0,2000	0,595	1,864
S3	Кандидоз полости рта	0,1864	0,1231	0,229	1,515
S4	Сахарный диабет	0,1186	0,1231	0,135	0,964
S5	Пол женский	0,4746	0,4923	0,903	0,964
S6	Пол мужской	0,5254	0,5077	1,107	1,035
S7	Возраст пациента от 60 до 65 лет	0,5424	0,5538	1,185	0,979
S8	Возраст пациента от 65 до 70 лет	0,4576	0,4462	0,844	1,026
S9	Устойчивость полных съёмных пластиночных протезов (неудовлетворительный уровень)	0,2203	0,2154	0,283	1,023
S10	Устойчивость полных съёмных пластиночных протезов (удовлетворительный уровень)	0,3220	0,3077	0,475	1,047
S11	Устойчивость полных съёмных пластиночных протезов (хороший уровень)	0,4576	0,4769	0,844	0,960
S12	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 1 типа	0,5085	0,6308	1,034	0,806
S13	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 2 типа	0,1864	0,1077	0,229	1,731
S14	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 3 типа	0,2034	0,1692	0,255	1,202
S15	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 4 типа	0,1017	0,0923	0,113	1,102
S16	Клинические признаки стоматита	0,2881	0,2000	0,405	1,441
S17	Приём кондитерских изделий более 5 раз	0,2542	0,2154	0,341	1,180
S18	Приём кондитерских изделий менее 5 раз	0,7458	0,7846	2,933	0,950
S19	Наличие налёта на слизистой оболочке под протезом	0,4068	0,1077	0,686	3,777
S20	Наличие налёта на языке	0,3051	0,1538	0,439	1,983
S21	Сухость слизистой оболочки рта	0,6271	0,1077	1,682	5,823
S22	Отсутствие достаточной фиксации протеза	0,3729	0,2769	0,595	1,347
S23	Длительное курение	0,2881	0,2615	0,405	1,102
S24	Изготовление нового протеза	0,1864	0,2000	0,229	0,932
S25	Поломка протеза (починка)	0,2034	0,2308	0,255	0,881
S26	Жалобы при использовании протеза	0,3220	0,2615	0,475	1,231
S27	Количество коррекций протеза за последний год 0	0,2881	0,3231	0,405	0,892
S28	Количество коррекций протеза за последний год 3-4 раза	0,3729	0,3538	0,595	1,054
S29	Наличие «заед»	0,2373	0,0923	0,311	2,571
S30	Гиперемия слизистой оболочки	0,6271	0,0923	1,682	6,794
S31	Пигментация поверхности протеза	0,5763	0,3538	1,360	1,629
S32	Наличие налёта на поверхности протеза	0,6102	0,2462	1,565	2,479
S33	Балансирование протеза	0,5085	0,4462	1,034	1,140
S34	Индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву - неудовлетворительная фиксация	0,2034	0,2000	0,255	1,017
S35	Индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву - удовлетворительная фиксация	0,5593	0,5846	1,269	0,957
S36	Индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву - хорошая фиксация	0,2373	0,2154	0,311	1,102
S37	Индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева - очень плохой уровень	0,3559	0,3077	0,553	1,157
S38	Индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева - плохой уровень	0,3729	0,4154	0,595	0,979
S39	Индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева - удовлетворительный уровень	0,2712	0,2769	0,372	0,898
S40	Жжение слизистой оболочки рта в связи с предыдущим лечением	0,6441	0,5846	1,810	1,102

Таблица 2

Субъективные меры вероятности и отношение правдоподобия для симптомов у пациентов при ортопедической реабилитации продолжительностью более 3 лет (прогнозирование содержания *C. albicans*)

Код	Симптом, признак	P(S D1) 3-я группа	P(S D1) 4-я группа	Шанс для пациентов с КС	Отношение правдоподобия для пациентов с КС L(D1;S)
S1	Кандидоз ЖКТ	0,1507	0,0845	0,177	1,783
S2	Частое применение АМП	0,3425	0,2535	0,521	1,351
S3	Кандидоз полости рта	0,2055	0,0845	0,259	2,432
S4	Сахарный диабет	0,1370	0,0986	0,159	1,389
S5	Пол женский	0,4658	0,5775	0,872	0,807
S6	Пол мужской	0,5342	0,4225	1,147	1,264
S7	Возраст пациента от 60 до 65 лет	0,5205	0,4648	1,086	1,120
S8	Возраст пациента от 65 до 70 лет	0,4795	0,5352	0,921	0,896
S9	Устойчивость полных съёмных пластиночных протезов неудовлетворительный уровень	0,3973	0,3521	0,659	1,128
S10	Устойчивость полных съёмных пластиночных протезов удовлетворительный уровень	0,3699	0,2676	0,587	1,382
S11	Устойчивость полных съёмных пластиночных протезов хороший уровень	0,2329	0,3803	0,304	0,612
S12	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 1 типа	0,3014	0,2958	0,431	1,019
S13	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 2 типа	0,2055	0,3521	0,259	0,584
S14	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 3 типа	0,3836	0,2817	0,622	1,362
S15	Состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 4 типа	0,1096	0,0845	0,123	1,297
S16	Клинические признаки стоматита	0,3288	0,2254	0,490	1,459
S17	Приём кондитерских изделий более 5 раз	0,3699	0,2676	0,587	1,382
S18	Приём кондитерских изделий менее 5 раз	0,6301	0,7324	1,704	0,860
S19	Наличие налёта на слизистой оболочке под протезом	0,6438	0,3099	1,808	2,078
S20	Наличие налёта на языке	0,6027	0,2254	1,517	2,675
S21	Сухость слизистой оболочки рта	0,6301	0,1972	1,704	3,196
S22	Отсутствие достаточной фиксации протеза	0,5342	0,3803	1,147	1,405
S23	Длительное курение	0,3151	0,1972	0,460	1,598
S24	Изготовление нового протеза	0,3014	0,2676	0,431	1,126
S25	Поломка протеза (починка)	0,2740	0,1831	0,377	1,496
S26	Жалобы при использовании протеза	0,2055	0,1831	0,259	1,122
S27	Количество коррекций протеза за последний год 0	0,1781	0,1972	0,217	0,903
S28	Количество коррекций протеза за последний год 3-4 раза	0,1918	0,0845	0,237	2,269
S29	Наличие «заед»	0,4521	0,1690	0,825	2,675
S30	Гиперемия слизистой оболочки	0,8493	0,2113	5,636	4,020
S31	Пигментация поверхности протеза	0,8356	0,4648	5,083	1,798
S32	Наличие налёта на поверхности протеза	0,8630	0,3380	6,300	2,553
S33	Балансирование протеза	0,6164	0,6056	1,607	1,018
S34	Индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву неудовлетворительный уровень	0,3562	0,2535	0,553	1,405
S35	Индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву удовлетворительный уровень	0,4658	0,3662	0,872	1,272
S36	Индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву хороший уровень	0,1781	0,3803	0,217	0,468
S37	Индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева очень плохой уровень чистоты	0,3288	0,2394	0,490	1,373
S38	Индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева плохой уровень чистоты	0,3151	0,1972	0,460	1,598
S39	Индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева удовлетворительный уровень чистоты	0,3562	0,5634	0,553	0,632
S40	Жжение слизистой оболочки рта в связи с предыдущим лечением	0,5342	0,2394	1,147	2,231

Изучение симптомов и признаков по отношению правдоподобия L(D1;S) у пациентов при ортопедической реабилитации продолжительностью более 3-х лет установило наибольшую специфичность и инфор-

мативность показателей, по которым с высокой вероятностью можно определить наличие в полости рта грибы, принадлежащие к виду *C. albicans*. К данным признакам следует отнести гиперемию слизистой обо-

лочки полости рта (4,020); сухость слизистой оболочки рта (3,196); наличие «заед» (2,675); наличие налёта на языке (2,675); наличие налёта на поверхности протеза (2,553); кандидоз полости рта (2,432); количество коррекций протеза за последний год 3-4 раза (2,269); жжение слизистой оболочки рта в связи с предыдущим лечением (2,231); наличие налёта на слизистой оболочке под протезом (2,078); пигментация поверхности протеза (1,798); кандидоз ЖКТ (1,783); длительное курение (1,598); индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева - плохого уровня (1,598); поломка протеза с последующей починкой (1,496); клинические признаки стоматита (1,459); индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву - неудовлетворительного уровня фиксации (1,405); отсутствие достаточной фиксации протеза (1,405); сахарный диабет (1,389); приём кондитерских изделий более 5 раз (1,382); устойчивость полных съёмных пластиночных протезов удовлетворительного уровня (1,382); индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева - очень плохого уровня (1,373); состояние слизистой оболочки ротовой полости по Суппле 3-го типа (1,362); состояние слизистой оболочки ротовой полости по Суппле 4-го типа (1,297); индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву - удовлетворительного уровня фиксации (1,272); пол мужской (1,264); устойчивость полных съёмных пластиночных протезов неудовлетворительная (1,128); изготовление нового протеза (1,126); жалобы при использовании протеза (1,122); возраст пациента от 60 до 65 лет (1,120); состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 1-го типа (1,019); балансирование протеза (1,018).

Интересно отметить, что у пациентов данных групп обследования анализ признаков по отношению правдоподобия показал данные, которые свидетельствуют об отсутствии информативности $L(D_1;S) < 1$. Вместе с тем, наиболее высокие показатели выявлены у симптомов и признаков - количество коррекций протеза за последний год 0 (0,903); возраст пациента от 65 до 70 лет (0,896); приём кондитерских изделий менее 5 раз (0,860); принадлежность к женскому полу (0,807); индекс чистоты протезов Улитовского-Леонтьева 3,0-3,9 с удовлетворительным уровнем (0,632); устойчивость полных съёмных пластиночных протезов с хорошим уровнем (0,612); состояние слизистой оболочки полости рта по Суппле 2-го типа (0,584); индекс фиксации съёмного протеза по С.Б. Улитовскому - А.А. Леонтьеву с хорошим уровнем фиксации при 21-40% (0,468).

С помощью теоремы Байеса проведён анализ медицинских данных пациентов в период ортопедической реабилитации с точки зрения их диагностической ценности. Установление характера отношения правдоподобия для содержания *C. albicans* при выделении из биотопа слизистой оболочки полости рта пациентов позволило определить информативные признаки. Определены характерные 40 симптомов, признаков, факторов риска, фоновые заболевания, вероятность их обнаружения и отношение правдоподобия при концентрации грибов *C. albicans* в полости рта пациентов.

Заключение. Теорема Байеса применена для оценки вероятности наличия определённого представителя микобиоты в определённой концентрации при конкретном симптомокомплексе. Используя частоты, вычисле-

на вероятность наличия *C. albicans* у предполагаемого пациента (частоты рассчитаны для пациентов с полным отсутствием зубов, пользующихся съёмными зубными акриловыми протезами).

Получение значений конечной или апостериорной вероятности наличия грибов *C. albicans* у пациентов, находящихся на ортопедической реабилитации, для каждого симптома и диагноза является важным шагом при использовании теоремы Байеса в клинической лабораторной диагностике и, безусловно, в стоматологической практике с целью установления риска развития кандидозной инфекции и оценки интенсивности развития кандидозного стоматита, что позволяет своевременно не только диагностировать, но и начать лечебные мероприятия, направленные на улучшение микроэкологии полости рта пациента.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4,7,13,16,19 с.м. REFERENCES)

1. Божченко А.П. Априорная вероятность в системе вычислительной диагностики. *Судебная экспертиза*. 2019; 60(4): 51-65.
2. Камилова У.К., Расулова З.Д., Нурутдинов Н.А., Тагаева Д.Р. Прогнозирование развития дисфункции почек у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. *Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски*. 2020; 4(1):839-45.
3. Ширлина Н.Г., Стасенко В.Л., Турчанинов Д.В. Персонализированный подход к оценке индивидуального риска формирования актуальных злокачественных новообразований. *Медицинский алфавит*. 2018; 2(29): 55-9.
5. Чесноков В.А., Чеснокова М.Г., Миронов А.Ю., Турчанинов Д.В., Крига А.С. Байесовские подходы к определению кариеогенных стрептококков в зубной бляшке у детей с дистальной окклюзией при ортодонтическом лечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 8: 54-9.
6. Чуракина В.В., Хайдукова А.О. Влияние брекет-системы на состояние микрофлоры полости рта. *Бюллетень Северного государственного медицинского университета*. 2020; 44 (1): 71-2.
8. Чесноков В.А., Чеснокова М.Г., Леонтьев В.К., Миронов А.Ю., Ломашвили Л.М., Крига А.С. Микробиологические аспекты ортодонтического лечения детей с зубочелюстными аномалиями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(3): 55-8.
9. Чеснокова М.Г., Чесноков С.А., Миронов А.Ю. Микобиота зубной бляшки у детей с зубочелюстными аномалиями при ортодонтическом лечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68(4): 237-42.
10. Амхадова М.А., Зорина О.А., Борискина О.А., Петрухина Н.Б., Нечаев А.А. Особенности пространственной локализации зубного налёта при проведении ортодонтического лечения на брекет-системе. *Российский стоматологический журнал*. 2020; 24(3): 141-5.
11. Гаврилова М.В. Субъективная оценка пациентов с дистальной окклюзией зубных рядов на эффективность ортодонтического лечения. *Ортодонтия*. 2022; 3(99): 39.
12. Чесноков В.А., Чеснокова М.Г. Микобиота слизистой оболочки полости рта и поверхности съёмных акриловых пластиночных протезов при ортопедической реабилитации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 126-8.
14. Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю. Биоплёнка грибов *Candida albicans* поверхности базисных пластмасс при изучении методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии. *Успехи медицинской микологии*. 2023; 24: 201-5.
15. Гризодуб Д.В. Влияние материала базиса съёмных протезов на структуру эпителия слизистой оболочки полости рта. *Стоматологический журнал*. 2016; 17(4): 290-3.
17. Шевелёва Н.А., Рубанов М.С. Состояние слизистой оболочки полости рта у пациентов со съёмными ортопедическими конструкциями. *Colloquium-Journal*. 2019; 16-5(40): 45-7.
18. Гуськов А.В., Олейников А.А., Калиновский С.И., Магомадова А.У., Журавлев А.Н. Оценка эффективности усовершенствованного метода выявления воспаления слизистой полости рта при коррекциях съёмных протезов. *Актуальные проблемы медицины*.

2023; 46 (1): 49-60.

20. Вечеркина Ж.В., Шалимова Н.А., Смолина А.А., Калинин Т.П., Морозов Н.В. Результаты оценки дисбиоза полости рта после ортопедического лечения съёмными зубными протезами. *Системный анализ и управление в биомедицинских системах*. 2021; 20(1): 24-9.

REFERENCES

- Bozhchenko A.P. A priori probability in the system of computational diagnostics. *Sudebnaya ekspertiza*. 2019; 4(60): 51-65. (in Russian)
- Kamilova U.K., Rasulova Z.D., Nuritdinov N.A., Tagaeva D.R. Predicting the development of kidney dysfunction in patients with chronic heart failure. *Neotlozhnaya kardiologiya i kardiovaskulyarnye riski*. 2020; 4(1):839-45. (in Russian)
- Shirlina N.G., Stasenko V.L., Turchaninov D.V. Personalized approach to assessing the individual risk of developing actual malignant neoplasms. *Meditsinskij alfavit*. 2018; 2(29): 55-9. (in Russian)
- Taktak A.F.G., Fisher A.C., Damato B.E. Modelling survival after treatment of intraocular melanoma using artificial neural networks and bayes theorem. *Physics in Medicine and Biology*. 2004; 49 (1): 87-98.
- Chesnokov V. A., Chesnokova M. G., Mironov A. Yu., Turchaninov D. V., and Kriga A. S. Bayesian approaches to the determination of cariogenic streptococci in dental plaque in children with distal occlusion during orthodontic treatment. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2013; 8: 54-9. (in Russian)
- Churakina V.V., Khaidukova A.O. Influence of the bracket system on the state of the microflora of the oral cavity. *Byulleten' Severnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2020; 44 (1): 71-2. (in Russian)
- Naito M., Yuasa H., Nomura Y., Nakayama T., Hamajima N., Hanada N. Oral health status and health-related quality of life: a systematic review. *Journal of Oral Science*. 2006; 48 (1): 1-7.
- Chesnokov V.A., Chesnokova M.G., Leontiev V.K., Mironov A.Yu., Lomiasvili L.M., Kriga A.S. Microbiological aspects of orthodontic treatment of children with dental anomalies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60 (3): 55-8. (in Russian)
- Chesnokova M.G., Chesnokov S.A., Mironov A.Yu. Mycobiota of dental plaque in children with dentoalveolar anomalies in orthodontic treatment. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2023;68 (4): 237-42. (in Russian)
- Amkhadova M.A., Zorina O.A., Boriskina O.A., Petrukina N.B., Nechaev A.A. Features of the spatial localization of plaque during orthodontic treatment on a bracket system. *Rossiyskiy stomatologicheskij zhurnal*. 2020; 24 (3): 141-5. (in Russian)
- Gavrilova M.V. Subjective assessment of patients with distal occlusion of the dentition on the effectiveness of orthodontic treatment. *Ortodontiya*. 2022; 3(99): 39. (in Russian)
- Chesnokov V.A., Chesnokova M.G. Mycobiota of the oral mucosa and the surface of removable acrylic plate prostheses in orthopedic rehabilitation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61 (2): 126-8. (in Russian)
- Bamford C.V., d'Mello A., Nobbs A.H., Dutton L.C., Vickerman M.M., Jenkinson H.F. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infection and Immunity*. 2009; 77(9): 3696-704.
- Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Biofilm of fungi *Candida albicans* on the surface of basic plastics when studied by laser modulation interference microscopy. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2023; 24: 201-5. (in Russian)
- Grizodub D.V. Influence of the base material of removable dentures on the structure of the epithelium of the oral mucosa. *Stomatologicheskij zhurnal*. 2016; 17(4): 290-3. (in Russian)
- Moldovan O., Rudolph H., Luthardt R.G. Biological complications of removable dental prostheses in the moderately reduced dentition: a systematic literature review. *Clin. Oral Investig*. 2018; 22 (7): 2439-61.
- Sheveleva N.A., Rubanov M.S. The state of the oral mucosa in patients with removable orthopedic structures. *Colloquium-Journal*. 2019; 16-5(40):45-7. (in Russian)
- Gus'kov A.V., Oleinikov A.A., Kalinovsky S.I., Magomadova A.U., Zhuravlev A.N. Evaluation of the effectiveness of an improved method for detecting inflammation of the oral mucosa during corrections of removable dentures. *Aktual'nye problemy meditsiny*. 2023; 46 (1): 49-60. (in Russian)
- Milica J., Obradovi R., Ana Peji , Stani D., Stoi N., Popovi A, Milica J. The role of *Candida albicans* on the development of stomatitis in patients wearing dentures. *SANAMED*. 2018; 13(2): 175-81.
- Vecherkina Zh.V., Shalimova N.A., Smolina A.A., Kalinichenko T.P., Morozov N.V. The results of the assessment of oral dysbiosis after orthopedic treatment with removable dentures. *Sistemnyj analiz i upravlenie v biomeditsinskikh sistemakh*. 2021; 20(1): 24-9. (in Russian)

© БОЧАРОВА Ю.А., 2023

Бочарова Ю.А.

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ ОСНОВНЫХ ЛЕГОЧНЫХ ПАТОГЕНОВ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГАОУ ВО Российский Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Муковисцидоз (кистозный фиброз) - наследственное заболевание, характеризующееся множественным поражением органов и систем, включая респираторный тракт, репродуктивную и пищеварительную системы. Наиболее частым проявлением муковисцидоза является нарушение бронхиальной секреции, сопровождающееся развитием бронхообструкции и хроническим инфекционным процессом в дыхательных путях (лёгочная болезнь). К патогенам, имеющим приоритетное клиническое значение в патогенезе лёгочной болезни, относят Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Burkholderia cepacia complex (BCC), Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter spp., нетуберкулезные виды рода Mycobacterium (НТМ). Обзор посвящён микробиологической диагностике при лёгочной болезни у пациентов с муковисцидозом, описаны задачи и особенности методов выделения, идентификации, генетического типирования и оценки антимикробной резистентности (АМР) приоритетных лёгочных патогенов. Поиск литературы проведён с использованием базы данных PubMed, Российской научной электронной библиотеки eLIBRARY, поисковых систем Европейского общества микробиологии и инфекционных болезней (ESCMID), Европейского общества муковисцидоза (ECFS). Особенностью диагностики S. aureus является необходимость поиска морфотипа «малых колоний» (SCV-морфотип), метициллин-резистентных изолятов, штаммов с необычным резистентным фенотипом. При диагностике P. aeruginosa, помимо фенотипической оценки АМР, следует анализировать наличие генов β-лактамаз. При выделении H. influenzae, SCV-морфотипа S. maltophilia и BCC важно учитывать особые требования к составу питательных сред и условиям культивирования. Достоверную идентификацию большинства видов BCC и Achromobacter можно провести только на основе технологий секвенирования. Особенности выделения и идентификации НТМ является длительное время культивирования и необходимость применения технологий секвенирования для верификации видовой принадлежности. При диагностике S. aureus, P. aeruginosa, Achromobacter spp. следует детектировать штаммы, относящиеся к эпидемическим клонам.

Ключевые слова: муковисцидоз/кистозный фиброз; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; Haemophilus influenzae; Burkholderia cepacia complex; Stenotrophomonas maltophilia; Achromobacter spp.; нетуберкулезные виды рода Mycobacterium.

Для цитирования: Бочарова Ю.А. Особенности диагностики основных легочных патогенов при муковисцидозе (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2023; 68 (12): 751-760.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-751-760>

Для корреспонденции: Бочарова Юлия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории молекулярной микробиологии; e-mail: ivrin7@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.09.2023

Принята к печати 19.09.2023

Опубликовано 10.12.2023

Bocharova Yu.A.

DIAGNOSTIC FEATURES OF MAJOR RESPIRATORY PATHOGENS IN CYSTIC FIBROSIS (REVIEW OF LITERATURE)

Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease affecting multiple organs including respiratory tract, reproductive and digestive systems. The most common manifestation of CF is altered fluid transport across airway epithelium leading to bronchial obstruction and chronic respiratory infections (lung disease). The list of major respiratory pathogens in CF includes Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Burkholderia cepacia complex (BCC), Stenotrophomonas maltophilia, Achromobacter spp., nontuberculous mycobacteria (NTM). This review aims to describe microbiological diagnostics features (including isolation, identification, typing, antibiotic susceptibility testing features) of lung disease in CF patients. A literature search was performed in PubMed database, Russian scientific electronic library eLIBRARY, search systems of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), European Cystic Fibrosis Society (ECFS). The main diagnostic feature of S. aureus is the need for searching the small colony variant (SCV) morphotype and methicillin-resistant isolates. In P. aeruginosa diagnostics, not only phenotypic antibiotic susceptibility testing, but also beta-lactamases genes detection should be performed. For H. influenzae, S. maltophilia SCV-morphotype and BCC isolation special requirements for the culture medium composition and cultivation conditions need to be considered. The most BCC and Achromobacter species can be identified only based on gene sequencing. Isolation and identification features of NTM are long cultivation time and the need for species affiliation verifying using sequence technologies. Moreover, in S. aureus, P. aeruginosa, Achromobacter spp. diagnostics, the isolates belonging to the epidemic clones should be detected, since such isolates can impact patient outcomes and pose the threat to other CF patients.

Key words: cystic fibrosis; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; Haemophilus influenzae; Burkholderia cepacia complex; Stenotrophomonas maltophilia; Achromobacter spp.; nontuberculous mycobacteria.

For citation: Bocharova Yu.A. Diagnostic features of major respiratory pathogens in cystic fibrosis (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2023; 68 (12): 751-760 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-751-760>

For correspondence: Bocharova Yu.A., MD, PhD, Leading researcher of the Laboratory of Molecular Microbiology; e-mail: ivrin7@gmail.com

Information about author:

Bocharova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0003-0197-0255>.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (Project ID 20-15-00235).

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

Received 04.09.2023

Accepted 19.09.2023

Published 10.12.2023

Введение. Муковисцидоз (МВ) или, согласно новой версии международной классификации болезней, кистозный фиброз, - врождённое заболевание, обусловленное мутациями в гене белка CFTR (муковисцидозного трансмембранного регулятора проводимости) [1]. Поломки CFTR ведут к нарушению транспорта ионов хлора через мембрану и значительным патологическим изменениям на уровне слизистых оболочек лёгких, поджелудочной железы, кишечника, почек [2]. Это сопровождается угнетением местного иммунитета, экспансией условно-патогенной микрофлоры и глобальными метаболическими расстройствами, что в итоге приводит к катастрофическому сокращению жизни пациентов. Медиана возраста смерти пациентов с МВ в 2020 году в Европейском Союзе составила 33,0 года, в России - 15,5 лет [3, 4]. Главной причиной смертности при МВ является нарушение лёгочной функции вследствие инфекционного поражения бронхолёгочного аппарата [4]. Несмотря на успешные результаты от внедрения новых корректоров CFTR-протеина (элексакафтор/тезакафтор/ивакафтор) [5], МВ ещё долгое время будет оставаться актуальной проблемой здравоохранения. Это связано с возрастными ограничениями применения корректоров, а также с тем, что корректоры CFTR-протеина способны восстанавливать функцию трансмембранного регулятора проводимости не при всех типах мутаций гена CFTR.

Считается, что в рамках мультидисциплинарного подхода к лечению МВ, мероприятия, направленные на эрадикацию респираторных патогенов, играют важнейшую роль. Основой эрадикации является грамотная микробиологическая диагностика. Хотя основные диагностические процедуры описаны в национальных руководствах, ряд вопросов, касающихся масс-спектрометрической диагностики, применения генетических методов оценки, выявления внутривидовых клонов высокого эпидемического риска, требуют детализации.

В целом, актуальные практически значимые цели микробиологической диагностики при работе с муковисцидозными патогенами направлены на: 1) таксономическую идентификацию патогена, 2) оценку антимикробной резистентности (АМР), 3) предсказание опасности изолированного патогена - индивидуальный прогноз для пациента и прогнозирование эпидемиологической опасности для окружающих. При идентификации бактерий в ряде случаев важно обращать внимание не только на видовую принадлежность, но и на их отношение к клонам с особым эпидемическим риском, которые могут иметь негативное прогностическое значение при МВ. Это особенно актуально для *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Иногда достаточно определения принадлежности патогена лишь к внутриродовой

группе, что логично делать при определении представителей *Burkholderia cepacia* complex (см. ниже). Оценка чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) вызывает спорные вопросы в случаях, когда фенотипические методы пытаются заменить молекулярно-генетическим тестированием. Такие ситуации требуют тщательного анализа. Что касается предсказания опасности изолированного агента, то нужно помнить не только о его угрозе для конкретного пациента, но и о прогнозировании эпидемиологической опасности этого патогена для окружающих (пациентов, иммунокомпromетированных родственников и т. д.).

Цель: на основе анализа данных из современных научных источников определить конкретные задачи и методические подходы рациональной микробиологической диагностики при лёгочной болезни у пациентов с муковисцидозом. Идея обзора акцентирована на современных представлениях об идентификации, оценке АМР и задачах молекулярно-генетического тестирования приоритетных лёгочных патогенов при МВ для клинической и эпидемиологической практики.

Бактерии, имеющие наибольшее клиническое значение в патогенезе лёгочной болезни при муковисцидозе. Согласно данным мировой статистики, перечень наиболее опасных для МВ-пациентов бактерий включает: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* complex (BCC), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp., нетуберкулёзные виды рода *Mycobacterium* [3].

Staphylococcus aureus. *S. aureus* часто выявляется в респираторных образцах, их обнаружение может наблюдаться более, чем у 50% пациентов с МВ [7]. Установлено, что у 40% МВ-пациентов изоляты *S. aureus* имели нормальный фенотип, примерно у 6% пациентов присутствовали одновременно *S. aureus* нормального фенотипа и популяции, рост которых описан как феномен «малых колоний» (SCV, от англ. «small colony variants»), у 2% пациентов выделены исключительно *S. aureus* SCV-фенотипа [8]. Изоляция *S. aureus* нормального фенотипа обычно не представляет труда и рутинно выполняется в течение 24-48 часов при 35 °С. Обнаружение SCV-популяции является более сложным. Для их выявления рекомендуется увеличить время инкубации до 72 часов [9]. Особые требования для выявления стафилококков SCV-фенотипа касаются питательных сред. Для выделения стафилококков нормального фенотипа успешно используются селективные среды с повышенной концентрацией натрия хлорида (6,5-10,0%), содержащие маннит, а для выявления лецитиназной активности - фосфатидилхолин (лецитин), либо хромогенные агары, эффективность которых в настоящее время достигает 100% [10]. Стафилококки

SCV-фенотипа часто являются ауксотрофами по гемину, жирным кислотам, аминокислотам (тимидину), поэтому могут не расти на маннитол-солевых, желточно-солевых и хромогенных агарах. Для их роста рекомендуется использовать 5% кровяной (колумбийский) агар или сердечно-мозговой агар с добавлением 10 мкг/мл налидиксовой кислоты, 10 мкг/мл полимиксина В и 2 мкг/мл гентамицина [9, 11].

Идентификация *S. aureus* SCV-фенотипа имеет свои особенности. В отличие от «нормальных» вариантов *S. aureus*, SCV-стафилококки могут не образовывать пигмент, не обладать лецитиназной и коагулазной активностью, не восстанавливать нитраты, могут быть каталазоотрицательными. Перечисленные дефекты не позволяют идентифицировать их при помощи селективных и хромогенных сред, при помощи стандартных биохимических панелей. Поэтому методом выбора для видовой идентификации бактерий в условиях клинической микробиологической лаборатории является MALDI ToF масс-спектрометрия, обеспечивающая достоверные результаты, независимо от культурального фенотипа *S. aureus* [12]. Несмотря на сложности культивирования и идентификации SCV-стафилококков, их поиск должен тщательно выполняться при каждом исследовании респираторных образцов при МВ. Главная причина этого - негативные свойства SCV-бактерий, основными из которых являются широкий спектр резистентности к различным группам АМП и фенотип персистера [8, 13]. Присутствие штаммов SCV-фенотипа *S. aureus* в респираторных образцах коррелирует с негативным прогнозом течения МВ [14].

Традиционно при оценке чувствительности к АМП повышенное внимание акцентируется на выявлении метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA), элиминация которых представляет более сложную задачу, чем борьба с чувствительными стафилококками. Определение MRSA может осуществляться не только при помощи теста с цефокситином, но и при помощи (1) MALDI ToF масс-спектрометрии на основе обнаружения характерного масс-пика $mz=2413$, соответствующего специфическому для MRSA пептиду PSM-mec, (2) хромогенных сред (например, CHROMagar™ MRSA (CHROMagar, Франция)), (3) ПЦР-тестирования (см. ниже). При оценке АМП пристальное внимание должно уделяться штаммам *S. aureus* с «необычным резистентным фенотипом», который подразумевает устойчивость как минимум к одному из следующих АМП: ванкомицину, тейкопланину, телаванцину, далбаванцину, оритаванцину, даптомицину, линезолиду, тедизолиду, хинупристин-дальфопристину, тигециклину, эравакиклину, омадациклину [15]. Резистентность к перечисленным АМП часто сочетается с фенотипами множественной, экстремальной устойчивости и даже панрезистентности, что несёт повышенную угрозу для жизни пациентов.

Значение молекулярно-генетической детекции и оценки *S. aureus* при помощи коммерческих наборов для ПЦР зависит от функциональной значимости конкретного набора. Применение наборов, позволяющих выявить лишь присутствие *S. aureus* в респираторных образцах (например, «БакСкрин УПМ» (ДНК-Технология)), «Staphylococcus aureus TaqMan PCR Detection Kits» (Norgen Biotek Corp., Канада), «Staphylococcus PCR detection Kit» (Atila BioSystems, США)) не

несёт дополнительной полезной информации по сравнению с культуральной изоляцией стафилококка. Более информативными являются результаты, полученные при помощи ПЦР-наборов, позволяющих детектировать MRSA на основе обнаружения генов *nuc*, *mecA/mecC* и региона SCCmec/orfX (например, GeneProof MRSA PCR Kit 9 (GeneProof, Czech Republic)). Принадлежность изолята к MRSA-типу является не только критерием выбора антибиотикотерапии для конкретного пациента, но служит негативным прогностическим фактором развития устойчивости этого изолята к ванкомицину, линезолиду, даптомицину [16] и индикатором эпидемиологической опасности [17].

MRSA-варианты тесно связаны с клональными характеристиками *S. aureus*. Большинство нозокомиальных изолятов MRSA принадлежит к 6-ти клональным комплексам (CC): CC₁, CC₅, CC_{8/239}, CC₂, CC₃₆, CC₄₅ [18]. Перечисленные клональные комплексы отличаются повышенной опасностью, широким распространением по всему миру, расцениваются в качестве клонов повышенного эпидемиологического риска. Для госпитальной эпидемиологии было бы полезным включать в план мероприятий исследования, направленные на поиск штаммов из клонов повышенного эпидемиологического риска, которые определяются с помощью мультилокусной сиквенс-типирования (MLST). Технологической основой таких исследований является полногеномное секвенирование либо Сенгер-секвенирование семи генов генерального метаболизма (house-keeping genes) *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* [19].

Pseudomonas aeruginosa. Среди взрослых пациентов с МВ хроническая синегнойная инфекция обнаруживается у 17-83%, среди детей в возрасте до 18 лет - у 2-43%. Доля пациентов с интермиттирующей инфекцией примерно одинакова в детской и взрослой возрастных группах и достигает 26%. Хронически инфицированными считаются пациенты, у которых более чем в 50% респираторных образцов, собранных за последние 12 месяцев, обнаруживалась *P. aeruginosa*. Данный критерий (модифицированный критерий Лидса) применим и для определения хронического инфицирования другими лёгочными патогенами при МВ, за исключением нетуберкулёзных микобактерий [3].

Для индикации *P. aeruginosa* используют хромогенные питательные среды (CHROMagar™ *Pseudomonas* (CHROMagar, Франция), chromID *P. aeruginosa* (bioMérieux, Франция) и др.), селективные среды с добавлением негативных селективных агентов (цетримид, налидиксовая кислота, триклозан (*Pseudomonas* CN selective agar (Oxoid Ltd., Великобритания), *Pseudomonas aeruginosa* Agar (Bio-Rad, США) и др.), селективные среды с добавлением положительного селективного агента - ацетамида. Селективные среды обладают низкой специфичностью (примерно 30% для сред с негативными селективным агентом и менее 26% для сред с ацетамидом), тогда как специфичность хромогенных сред достигает 70% [20].

Колонии штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с МВ, часто могут иметь мукоидный морфотип. Колонизация пациента мукоидными штаммами значительно ухудшает прогноз лёгочной болезни. При этом мукоидные изоляты важно отличать от слизистых колоний. Слизистые колонии формируются при длитель-

ной инкубации на средах с глюколатом или высоким содержанием углерода, и способность к формированию слизистых колоний - свойство всех штаммов *P. aeruginosa*. Мукоидный морфотип выявляется на простых питательных средах и формируется штаммами, отличительной особенностью которых является способность обильно продуцировать полиуронид и альгинат [21]. В результате эволюции *P. aeruginosa* в лёгких пациентов с МВ может возникнуть SCV-морфотип. Он характеризуется повышенной устойчивостью к АМП и ассоциирован со значительным ухудшением функции лёгких [22].

«Золотым стандартом» для видовой идентификации *P. aeruginosa* является MALDI-ToF масс-спектрометрия [23]. Результаты идентификации, получаемые с использованием автоматических биохимических тест-систем, менее достоверны и не всегда соответствуют результатам, полученным при помощи масс-спектрометрии. Коэффициенты конгруэнтности для тест-систем TDR-300B (Mindray, Китай) и VITEK2 (bioMérieux, Франция) при сравнении с результатами масс-спектрометрии составляют 81% и 92%, соответственно [24].

Для выявления эпидемических клонов *P. aeruginosa* применяют MLST-типирование, в основе которого лежит анализ последовательностей консервативных генов *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, *trpE*. К эпидемическому клону относят клоны высокого эпидемического риска (ST₂₃₅, ST₃₀₈ и др.) и эпидемические МВ-специфические клоны (AUST-01/ST₆₄₉, Ливерпульский эпидемический штамм (ST₁₄₆/ST₆₈₃) и др.). Представители этих клонов часто характеризуются высоким уровнем устойчивости к АМП, колонизация такими штаммами ухудшает прогноз течения лёгочной болезни при МВ [6, 25].

Перечень АМП, чувствительность к которым определяют для штаммов *P. aeruginosa* в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), включает пиперациллин, пиперациллин-тазобактам, тикарциллин-клавуланат, цефепим, цефидерокол, цефтазидим, цефтазидим-авибактам, цефтолозан-тазобактам, дорипенем, имипенем, имипенем-релебактам, меропенем, меропенем-ваборбактам, азтреонам, ципрофлоксацин, левофлоксацин, амикацин, тобрамицин, колистин. Институт клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI) рекомендует дополнительно оценивать чувствительность к нетилмицину, офлоксацину, гатифлоксацину [26, 27]. В дополнение к фенотипической оценке АМП штаммы *P. aeruginosa* рекомендуется тестировать на носительство карбапенемаз. Для их детекции используют фенотипические (например, MBL E-тест, метод инактивации карбапенемаз), и молекулярно-генетические методы - выявление генов β-лактамаз при помощи ПЦР в реальном времени [27]. Существуют коммерческие наборы для ПЦР, предназначенные для детектирования генов β-лактамаз. Набор АмплиСенс MDR MBL-FL (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) позволяет выявлять гены карбапенемаз VIM, IMP, NDM; при помощи набора EasyScreen ESBL/CPO Detection Kit (Genetic Signatures, Австралия) можно определить гены 15-ти групп, включая VIM, IMP, NDM, IMI, GES.

Haemophilus influenzae. Стойкий инфекционно-

воспалительный процесс в нижних отделах респираторного тракта, вызванный *H. influenzae*, регистрируется примерно у 28% детей с МВ в первые 5 лет жизни и снижается до 10% при взрослении [28].

За последние годы не наблюдается значительно прогресса в методах изоляции и идентификации *H. influenzae*: по-прежнему, средами выбора являются шоколадные агары, обогащённые, как минимум, двумя факторами роста - НАД/НАДФ (V фактор) и геминном (X фактор). Методом выбора для идентификации *H. influenzae* является MALDI ToF масс-спектрометрия.

Эпидемиология гемофильной инфекции при МВ имеет свои особенности, которые могут повлиять на диагностические алгоритмы более глубокого исследования изолятов *H. influenzae*. Если при обсуждении немуковисцидозной гемофильной инфекции в качестве наиболее опасного варианта возбудителя подразумеваются штаммы *H. influenzae* серотипа b, то среди патогенетически значимых респираторных изолятов при МВ отсутствует доминирующий серотип и даже преобладают нетипируемые или бескапсульные штаммы, доля которых может составлять более 90% изолятов [29]. Принадлежность *H. influenzae* к лидирующим (ST₆, ST₃) или спорадическим клональным комплексам тоже не имеет клинического значения при МВ. На всё время протяжения гемофильного поражения лёгких при МВ регистрируется многократная смена различающихся по серотипу/сиквенс-типу штаммов *H. influenzae*, персистирующая инфекция в течение многих лет одним штаммом встречается лишь в редких случаях [30]. Такая картина заставляет ещё раз вспомнить афоризм, приписываемый Луи Пастеру «Микроб - ничто, субстрат - все!». С практической точки зрения это означает, что определение серотипа при муковисцидозе имеет лишь эпидемиологическое значение для определения опасности носителя *H. influenzae* для окружающих.

Поиск индикаторных для *H. influenzae* факторов патогенности (генов адгезинов *hmw1A*, *hmw2A*, *hia*), наличие которых коррелирует с опасностью немуковисцидозных изолятов, у МВ-штаммов тоже не имеет смысла, поскольку они не играют ключевой роли в патогенезе лёгочной болезни при МВ [29, 31].

Определение и интерпретация чувствительности к АМП для *H. influenzae* является техникой на уровне искусства. Сложности процедуры заключаются не только в особых требованиях для питательной среды (бульон либо агар Мюллера-Хинтона + 5% лизированной лошадиной крови и 20 мг/л β-NAD), но и в существовании технических неопределённостей (Area of Technical Uncertainty) в интерпретации пограничных результатов для множества АМП, включая пиперациллин-тазобактам, цефепим, цефотаксим, цефподоксим, цефтолозан-тазобактам, цефтриаксон, цефуросим, имипенем [26]. Для определения чувствительности к макролидам не используются фенотипические методы. Рекомендуется проводить тестирование, направленное на выявление генетических детерминант устойчивости к макролидам.

Парадокс гемофильного поражения респираторного аппарата при МВ заключается в том, что при понимании отдельных вопросов диагностики и патогенеза инфекционного процесса отсутствует единая стратегия элиминации *H. influenzae* и профилактики гемофильной инфекции.

***Burkholderia cepacia* complex.** Бактерии *Burkholderia cepacia* complex (ВСС) колонизируют до 6,7% пациентов с МВ в возрасте менее 18 лет и до 13,8% взрослых пациентов [3,4]. Обнаружение бактерий ВСС является крайне негативным прогностическим признаком, поскольку ВСС часто становятся причиной развития «серасия»-синдрома - прогрессирующего поражения лёгких и бактериемии, летальность при котором достигает 75% [32]. Большинство штаммов ВСС дают видимый рост на плотных питательных средах в течение 48 часов, однако для некоторых изолятов требуется более длительная инкубация - до 10 дней [33]. Для выявления ВСС в респираторных образцах используют селективные питательные среды, содержащие в качестве селективных агентов АМП: колистин, гентамицин, ванкомицин [34]. К селективным средам для ВСС относятся *Burkholderia cepacia* selective agar (BCSA; bioMérieux, Франция), BD *Cepacia* medium (Becton-Dickinson, США), MAST *Cepacia* medium (MAST laboratories, Великобритания). Применяют хромогенные среды: CHROMID В. *cepacia* Agar (bioMérieux, Франция), CHROMagar В. *cepacia* (CHROMagar, Франция).

Некоторые штаммы ВСС могут иметь необычный морфотип колоний. К необычным морфотипам относят (1) мукоидные, (2) SCV, (3) блестящие колонии. Интенсивность выработки изолятом экзополисахарида, который определяет формирование мукоидного морфотипа, зависит от питательной среды, используемой для культивирования. Для оценки способности штаммов ВСС вырабатывать экзополисахарид оптимальными являются среды с дрожжевым экстрактом либо с повышенной концентрацией маннитола [35, 36]. Морфотип SCV почти никогда не встречается в чистой культуре, а только в сочетании с нормальным морфотипом. При этом доля SCV в смешанной культуре не превышает 25%, в связи с чем этот морфотип часто не регистрируется при диагностике. Среди необычных морфотипов ВСС именно SCV является наиболее неблагоприятным с точки зрения влияния на течение лёгочной болезни при МВ [37]. Блестящий морфотип чаще характеризуется сниженной вирулентностью [38].

Варианты ВСС разделяют на десять генетически близких подгрупп - геномоваров: геномовар I (*Burkholderia cepacia*), геномовар II (*Burkholderia multivorans*), геномовар III (*Burkholderia cenocepacia*), геномовар IV (*Burkholderia stabilis*), геномовар V (*Burkholderia vietnamiensis*), геномовар VI (*Burkholderia dolosa*), геномовар VII (*Burkholderia ambifaria*), геномовар VIII (*Burkholderia anthina*), геномовар IX (*Burkholderia pyrrocinia*), геномовар X (*Burkholderia ubonensis*). Дополнительно к ВСС относят ряд видов, не объединённых в геномовары. *Burkholderia contaminans* и *Burkholderia lata* объединены в отдельную подгруппу - группа К [26, 39]. Биохимические тест-системы, в том числе автоматические, не позволяют достоверно идентифицировать бактерии ВСС. MALDI ToF масс-спектрометрия даёт более точные результаты. Масс-спектрометр VITEK MS (bioMérieux, Франция) идентифицирует комплекс ВСС, однако не позволяет надёжно дифференцировать виды внутри комплекса. Система для MALDI ToF масс-спектрометрии MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия) достоверно определяет принадлежность изолята к ВСС, идентифицирует виды *B. cenocepacia* и

B. vietnamiensis с достоверностью более 95%, но не позволяет надёжно идентифицировать другие виды комплекса. Для дифференциации видов внутри комплекса ВСС используют генетические методы. В частности, определяют уникальную для каждого вида последовательность гена *hisA* - гена фермента, участвующего в синтезе гистидина [40]. Основой эпидемиологических исследований является MLST-типирование, схема которого основана на определении последовательностей семи генов: *atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC*, *trpB*. Для более глубокого эпидемиологического анализа используют методы средней идентичности нуклеотидов (average nucleotide identity (ANI)) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации [39]. Описан ряд глобально распространённых эпидемических сиквенс-типов ВСС, включая ST₁₆, ST₂₈ (ET₁₂) [41]. Существуют сиквенс-типы, специфичные для определённых географических регионов. На территории Российской Федерации распространён сиквенс-тип ST₇₀₉, на территории Чехии - высококонтагиозный сиквенс-тип ST₃₂ [42, 43].

Бактерии ВСС обладают широким спектром природной резистентности. Они природно устойчивы к ампициллину, амоксициллину-клавуланату, ампициллину-сульбактаму, тикарциллину, тикарциллину-клавуланату, пиперациллину, пиперациллину-тазобактаму, цефотаксиму, цефтриаксону, азтреонаму, эртапенему, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, триметоприму, фосфомицину, аминогликозидам, полимиксинам [44]. В соответствии с рекомендациями CLSI, бактерии ВСС следует тестировать на чувствительность всего к нескольким АМП: цефтазидим, меропенем, левофлоксацин, миноциклин, триметоприм-сульфаметоксазол [27].

***Stenotrophomonas maltophilia*.** Бактерии *S. maltophilia* обнаруживают в респираторных образцах 16 - 19% пациентов с МВ [3, 4]. *S. maltophilia* считают маркером тяжелого течения легочной болезни. У инфицированных пациентов регистрируют более частые обострения заболевания, более часто возникают показания к госпитализации и назначению курсов антибиотиков внутривенно [45].

Селективная среда для выделения *S. maltophilia* - VIA-агар - была предложена К.Г. Керг и соавторами [46]. Она содержит ванкомицин, имипенем, амфотерицин В и индикаторную систему маннит/бромтимоловый синий. Позднее были предложены другие варианты селективных сред. Например, среда ВС (шоколадный агар с бацитрацином (Bacitracin-Chocolate agar) с помещенным на нее диском с имипенемом также может быть использована для выделения *S. maltophilia*. Однако, среда ВС обладает меньшей чувствительностью по сравнению с VIA-агаром [47]. В настоящее время на основе VIA-агара разработаны коммерческие питательные среды (например, *Stenotrophomonas* Selective Agar, HiMedia, Индия).

Особую сложность представляет выявление SCV-колоний - опасного морфотипа, резистентного ко многим антибиотикам, включая триметоприм-сульфаметоксазол. SCV-штаммы *S. maltophilia* могут быть аукострофами по гемину, метионину, тимидину и не растут на средах, обычно используемых для культивирования грам-отрицательных бактерий. Для их выделения следует использовать кровяной или шоколадный агар.

Биохимические тест-системы не дают надежных ре-

зультатов при идентификации штаммов *S. maltophilia* и могут идентифицировать их как BCC, *Achromobacter xylosoxidans*, *P. aeruginosa* или *Bordetella bronchiseptica*. Для надежной видовой идентификации применяют MALDI-TOF масс-спектрометрию или генетические методы, основанные на определении видоспецифической последовательности гена 23S рРНК [48]. Схема определения сиквенс-типа включает анализ последовательностей генов *atpD*, *gapA*, *guaA*, *mutM*, *nuoD*, *ppsA* и *recA*. MLST-анализ штаммов *S. maltophilia* не всегда является информативным, так как *S. maltophilia* отличается высокой генетической гетерогенностью и отсутствием преобладающих эпидемических клонов [49]. Тем не менее, определение сиквенс-типа может быть полезным при расследовании вспышек инфицирования [48].

Перечень препаратов, к которым *S. maltophilia* обладает природной устойчивостью, затрагивает почти все классы антибиотиков. Рекомендациями EUCAST предусмотрено исследование чувствительности только к триметоприму-сульфаметоксазолу. Рекомендации CLSI устанавливают критерии для интерпретации результатов определения чувствительности к триметоприму-сульфаметоксазолу, левофлоксацину, миноциклину, цефидероколу. Критерии интерпретации результатов тестирования чувствительности к тикарциллину-клавуланату, цефтазидиму и хлорамфениколу установлены только для метода микроразведений в бульоне [26, 27].

***Achromobacter* spp.** Доля пациентов с МВ, у которых выявляются *Achromobacter* spp., достигает 22% среди взрослых и 8% среди детей младше 18 лет [3, 4]. Несмотря на невысокую распространённость, виды *Achromobacter* являются предметом серьёзных исследований, поскольку они оказывают значительное влияние на течение лёгочной болезни. В частности, у пациентов, респираторный аппарат которых колонизирован ахромобактериями, наблюдается более быстрое снижение функции лёгких [50].

Achromobacter spp. обычно культивируют на простых питательных средах. Но для более эффективной изоляции ахромобактерий предложена селективная среда MCXVAA [51]. Она получила название по аббревиатуре названий её компонентов: агара МакКонки (*MacConkey agar*) с добавлением ксилозы (*Xylose*), ванкомицина (*Vancomycin*), азтреонама (*Aztreonam*), амфотерицина В (*Amphotericin B*).

Идентификация *Achromobacter* spp. при помощи классических микробиологических методов затруднительна из-за их биохимической схожести с другими неферментирующими бактериями (*P. aeruginosa*, BCC, *Acinetobacter* spp.). MALDI-ToF масс-спектрометрия позволяет достоверно идентифицировать ахромобактерии на уровне рода, но не всегда позволяет идентифицировать вид. Это связано с тем, что в базы данных систем для масс-спектрометрии включено небольшое количество видов *Achromobacter* [52]. Для рутинной клинической практики не обязательно идентифицировать ахромобактерии до вида, однако для эпидемиологических исследований необходимо определение видовой и сиквенс-типовой принадлежности изолята. Видовую идентификацию проводят при помощи генетических методов на основании определения последовательности гена *nrpA*, для определения сиквенс-типа дополнительно оценивают последовательность шести

генов: *nusA*, *rpoB*, *eno*, *gltB*, *lepA*, *nuoL* [52].

В респираторных образцах от МВ-пациентов наиболее часто обнаруживают виды *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter insuavis*, *Achromobacter ruhlandii*. Именно к виду *A. ruhlandii* относятся представители эпидемических клонов ахромобактерий, включая датский эпидемический штамм DES, российский эпидемический штамм ST₃₆ [53, 54].

Выбор АМП, к которым следует определять чувствительность ахромобактерий, зависит от уровня идентификации. В случае если достоверно идентифицирован вид *A. xylosoxidans*, в соответствии с рекомендациями EUCAST, определяют чувствительность к пиперациллину-тазобактаму, меропенему, триметоприму-сульфаметоксазолу [26]. Перечень основных АМП для случаев, когда идентифицирован другой вид или идентификация проведена только до рода, определяется рекомендациями CLSI (таблица 1G «Other Non-Enterobacterales») и включает цефтазидим, пиперациллин-тазобактам, триметоприм-сульфаметоксазол, гентамицин, тобрамицин. В таких случаях оценку чувствительности к АМП проводят только при помощи метода микроразведений в бульоне [27].

Нетуберкулёзные виды *Mycobacterium* spp. Среди почти 200 представителей рода *Mycobacterium* описано более 50 видов, вызывающих нетуберкулёзное поражение лёгких у пациентов с МВ. Эти виды с отличающимися тинкториальными и биохимическими свойствами, различными культуральными предпочтениями и профилями природной АМР объединены в одну группу «нетуберкулёзные микобактерии» исключительно по клинико-патогенетическим критериям.

Эксперты считают, что выявление и клиническая роль нетуберкулёзных микобактерий (НТМ) при МВ требуют улучшения и уточнения [55]. Показатели стойкого инфицирования бронхо-лёгочного аппарата НТМ расцениваются в качестве одного из самых важных индикаторов здоровья МВ-пациентов. В разных регионах мира этот показатель варьирует от 2% до 28% [56]. Такие различия между показателями инфицирования могут свидетельствовать об отсутствии стандартов диагностики МВ-ассоциированных микобактериозов. Статистически обоснованный тренд роста инфицирования, зарегистрированный за последние 12 лет [55] также может быть не объективным отражением заболеваемости, а следствием улучшения качества диагностических технологий.

Практически выгодными являются две классификации НТМ. Первая определяет бактериологическую диагностику, основанную на культивировании, и базируется на разделении возбудителей микобактериозов человека по скорости роста на две группы - быстрорастущие (видимый рост на питательных средах в течение 7 суток) и медленно растущие (рост более 7 суток) [57]. К быстрорастущим микобактериям с наиболее выраженным клиническим значением при МВ принадлежат группы: 1) *Mycobacterium chelonae/Mycobacterium abscessus* group (*Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium immunogenum*, *Mycobacterium franklinii*), 2) *Mycobacterium fortuitum* group (*Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium septicum*, *Mycobacterium porcinum*), 3) *Mycobacterium mucogenicum* group (*Mycobacte-*

rium mucogenicum), 4) *Mycobacterium smegmatis* group (*Mycobacterium smegmatis*), 5) пигментированные микобактерии (*Mycobacterium cosmeticum*, *Mycobacterium bacteremicum*) [58]. Относительно участия в лёгочной болезни при МВ представителей *Mycobacterium mageritense/Mycobacterium wolinskyi* group верифицированные данные отсутствуют. Наиболее актуальными для МВ среди медленно растущих микобактерий являются виды *Mycobacterium avium* complex (новое название - *Mycobacteroides abscessus* complex), включающий *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaera* [59], *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium colombiense*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium marseillense*, *Mycobacterium timonense* [58, 60-62].

Другая классификация, используемая в генодиагностике и основанная на генетических критериях и частоте изоляции в лабораториях, подразделяет НТМ на общие (common mycobacteria или GenoType CM) и дополнительные (additional species или GenoType AS) [63]. Доказанным клиническим значением для пациентов с МВ обладают следующие виды генотипа GenoType CM: *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *Mycobacterium interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*. Перечень значимых для МВ видов GenoType AS включает: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *Mycobacterium cellatum*, *M. smegmatis*, *Mycobacterium lentiflavum*, *M. szulgai*, *Mycobacterium hemophilum*.

Клинические рекомендации настаивают на скрининге МВ-пациентов на носительство НТМ один-два раза в год. Для изоляции быстрорастущих микобактерий можно использовать среды, применяющиеся в рутинной практике, включая универсальные кровяные и хромогенные агары, культивирование на которых проводится в течение 7 сут. Изоляция медленно растущих бактерий требует применения специальных сред - Левенштейна-Йенсена, Миддлбука, Финн-2. Культивирование следует проводить до появления видимого роста, при отсутствии роста - в течение 28 сут. Основная причина ложноотрицательных результатов при культивировании связана с тем, что микобактериозы чаще всего развиваются в виде микст-инфекции, при которой выделяются *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Burkholderia* spp. и другие микроорганизмы. Присутствующие в исследуемом материале бактерии часто подавляют рост НТМ на питательных средах, снижая качество диагностики [64].

Практически доступный способ идентификации, основанный на MALDI ToF масс-спектрометрии, позволяет достоверно определить группу НТМ и с 90%-ной вероятностью - видовую принадлежность изолята [65]. Более точная видовая идентификация должна проводиться при помощи секвенирования генов *hsp65* (ген белка теплового шока), *rpoB* (ген β -субъединицы РНК-полимеразы), *erm* (ген метилазы, обеспечивающей рибосомальную резистентность к эритромицину), генов 16S- или 23S-РНК [66].

Клиническая интерпретация положительного культурального исследования имеет особенности. Однократное обнаружение НТМ не является основанием для постановки диагноза микобактериоза лёгких [67]. Диа-

гноз ставится, если регистрируются положительные результаты одного или нескольких дополнительных посевов с выделением одного и того же вида микобактерий в течение 6 мес. Позитивным может считаться только результат, при котором материал для исследования получен строго из бронхолёгочного аппарата и не был контаминирован слюной, слизью из глотки и носоглотки. Диагноз микобактериоза должен быть подтверждён инструментальными методами исследования (предпочтительна компьютерная томография лёгких).

Диагноз микобактериоза лёгких может быть поставлен на основе однократного гистологического обнаружения гранулематозного воспаления, сопряжённого с положительным высевом НТМ либо с детекцией НТМ-специфичной ДНК молекулярно-генетическими методами (см. ниже) [67].

Коммерчески доступные наборы для молекулярно-генетической диагностики НТМ разработаны на основе: 1) мультиплексной ПЦР в сочетании с ДНК-гибридизацией (пример - набор DR. TBDR/NTM IVD Kit производства DR. Chip Corporation, Тайвань, способный идентифицировать 15 видов туберкулёзных микобактерий и наиболее актуальных НТМ); 2) линейной ДНК-гибридизации (line probe assay). К числу наиболее известных «line probe»-наборов следует отнести стрипы для твёрдофазной реверс-гибридизации GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия) [63] и Speed-Oligo Mycobacteria (Vincel, Испания) [68]. Набор GenoType Mycobacterium CM/AS, основанный на гибридизации специфических фрагментов генов 23SPHK, позволяет идентифицировать 21 вид НТМ с чувствительностью не менее 97% и специфичностью от 92 до 99%, ещё 19 видов определяются в пределах группы. Набор Speed-Oligo Mycobacteria, определяющий специфичность спейсеров 16S-23S рибосомальных РНК-генов, позволяет с достаточной достоверностью (специфичность и чувствительность более 90%) идентифицировать лишь 9 видов НТМ.

Протоколы оценки чувствительности НТМ к АМП, разработанные Институтом клинических лабораторных стандартов США (The Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI), предполагают использование различных схем для быстро- и медленно растущих микобактерий [69]. Для быстрорастущих НТМ разработаны критерии для тестирования чувствительности к амикацину, тобрамицину, кларитромицину, доксициклину, цефокситину, имипенему, линезолиду, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, триметоприм-сульфаметоксазолу. Изоляты *M. avium* complex тестируют на чувствительность к кларитромицину, линезолиду, моксифлоксацину. Для других видов медленно растущих НТМ определяется резистентность к амикацину, кларитромицину, линезолиду, ципрофлоксацину, этамбутолу, моксифлоксацину, рифабутину, рифампицину, триметоприм-сульфаметоксазолу. Тестирование следует проводить методом серийных разведений.

Существование эпидемически важных клонов, которые имеют повышенную опасность для развития микобактериозов у МВ-пациентов, доказано для представителей *M. abscessus* group. Сиквенс-типы ST₁ и ST₂₃ являются распространёнными в Азии, ST₇ - в Канаде [70, 71]. Нозокомиальное заражение МВ-пациентов НТМ является относительно редким, но возможным

событием [72]. Пациенты с микобактериозами могут представлять потенциальную эпидемиологическую угрозу для других пациентов с МВ.

Заключение. Проведённый анализ литературы позволил обозначить реперные точки в диагностике приоритетных респираторных патогенов, определяющих течение лёгочной болезни при МВ. При работе с *S. aureus* ключевыми задачами являются выявление SCV-фенотипа, MRSA-штаммов, штаммов с необычным резистентным фенотипом, эпидемиологически опасных клональных комплексов. Изучение *P. aeruginosa* должно быть сосредоточено на определении характера инфицирования (интермиттирующее или хроническое), оценке фенотипической резистентности, поиске генов карбапенемаз и определении эпидемиологически опасных сиквенс-типов. Обнаружение *H. influenzae* требует использования специальных питательных сред высокого качества, при выявлении *H. influenzae* акцент должен быть сделан на определении профиля АМР. При изоляции ВСС-штаммов необходимо учитывать особые требования к питательным средам и времени культивирования. Достоверная видовая идентификация большинства представителей ВСС возможна лишь на основе технологий секвенирования. Рекомендуется MLST-типирование обнаруженных ВСС-изолятов. При поиске *S. maltophilia* следует использовать селективные питательные среды. Принадлежность изолятов к *Achromobacter* spp. возможно установить только на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии, видовую идентификацию можно провести только на основе секвенирования. Выбор спектра АМП для изучения АМР-профиля ахромобактерий зависит от качества таксономической идентификации. Главная проблема диагностики НТМ связана с длительностью культивирования медленно-растущих видов. Верификация видовой идентификации НТМ возможна лишь на основе секвенирования индикаторных генов, включая *hsp65*, *rpoB*, *erm*, генов 16S/23SPHK.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 5-8, 10-17, 19-53, 55-71 см. REFERENCES)

4. Регистр пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. 2020 год. Данные с сайта Всероссийской ассоциации для больных муковисцидозом. Available at: https://api.med-gen.ru/site/assets/files/51107/site_registre_2020.pdf (дата обращения: сентябрь 2023 г.)
9. Чуркина Л.Н., Бидненко С.И., Ванечутте М., Авдеева Л.В., Макушенко А.С., Лютко О.Б. и др. Алгоритм идентификации атипичных форм стафилококков (SSCVs) - возбудителей хронических гнойно-воспалительных процессов у людей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 58(11-12): 26-30.
18. Гончаров А.Е., Зуева Л.П., Суворов А.Н., Глазовская Л.С., Брусина Е.Б., Азизов И.С. и др. Ведущие эпидемиологически значимые клоны золотистого стафилококка, циркулирующие в географически удаленных регионах Евразии. *Медицинский альманах*. 2014; 4(34): 27-30.
54. Воронина О.Л., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Аксенова Е.И., Семенов А.Н., Лазарева А.В. и др. Разнообразие и опасность *Achromobacter* spp., поражающих дыхательные пути больных муковисцидозом. *Пульмонология*. 2015; 25 (4): 389-402.

REFERENCES

1. Anderson M.P., Sheppard D.N., Berger H.A., Welsh M. J. Chloride

- channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am. J. Physiol.* 1992; 263(1 Pt 1): L1-14. DOI: 10.1152/ajplung.1992.263.1.L1.
2. Polgreen P.M., Alejandro P.C. Clinical phenotypes of cystic fibrosis carriers. *Annu. Rev. Med.* 2022; 73: 563-74. DOI: 10.1146/annurev-med-042120-020148.
3. ECFS Patient Registry. Annual Data Report. 2021. European Cystic Fibrosis Society. Available at: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/Annual%20Report_2021_09Jun2023.pdf (accessed September 2023)
4. Russian Association for patients with cystic fibrosis. Available at: https://api.med-gen.ru/site/assets/files/51107/site_registre_2020.pdf (accessed September 2023). (in Russian)
5. Hernandez L.C., Moreno R.M.G., Cartagena M.N.B., Pelaez A., Sole A., Fernandez A.A. et al. Experience with elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in patients with cystic fibrosis and advanced disease. *Bronconeumol.* 2023; S0300-2896(23):00176-X. DOI: 10.1016/j.arbres.2023.05.017.
6. Del Barrio-Tofino E., Lopez-Causape C., Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020; 56(6): 106196. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106196.
7. Erfanimesh S., Emaneini M., Modaresi M.R., Feizabadi M.M., Halimi S., Beigverdi R. et al. Distribution and characteristics of bacteria isolated from cystic fibrosis patients with pulmonary exacerbation. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2022; 2022: 5831139. DOI: 10.1155/2022/5831139.
8. Besier S., Smaczny C., von Mallinckrodt C., Krahl A., Ackermann H., Brade V. et al. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1): 168-72. DOI: 10.1128/JCM.01510-06.
9. Churkina L.N., Bidnenko S.I., Vaneechoutte M., Avdeeva L.V., Makushenko A.S., Lutko O.B. et al. Algorithm of Identification of Atypical Variants of Staphylococci, Pathogens of Chronic Pyoinflammatory Processes in Humans. *Antibiotiki I khimioterapiya*. 2013; 58(11-12): 26-30. (in Russian)
10. Dyon-Tafari V., Josse J., Safrani-Lahyani J., Assant-Trouillet S., Chiganne M., Vincent F. et al. Clinical evaluation of three chromogenic media for the isolation of *Staphylococcus aureus* in respiratory samples in patients with cystic fibrosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2021; 99(1): 115201. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115201.
11. Millette G., Seguin D.L., Isabelle C., Chamberland S., Lucier J.F., Rodrigue S. et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants from airways of adult cystic fibrosis patients as precursors of adaptive antibiotic-resistant mutations. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12(6): 1069. DOI: 10.3390/antibiotics12061069.
12. Ota Y., Matsumoto T., Sugano M., Honda T. Identification of clinical thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* by using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rinsho Byori*. 2015; 63(6): 683-7.
13. Keim K.C., George I.K., Reynolds L., Smith A.C. The clinical significance of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Lab. Med.* 2023; 54(3): 227-34. DOI: 10.1093/labmed/lmac101.
14. Wolter D.J., Emerson J.C., McNamara S., Buccat A.M., Qin X., Cochrane E. et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(3): 384-91. DOI: 10.1093/cid/cit270.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes Tables v3.2. Available at: <https://www.eucast.org> (accessed September 2023).
16. Alghamdi B.A., Al-Johani I., Al-Shamrani J.M., Alshamrani H.M., Al-Otaibi B.G., Almazmomi K. et al. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi. J. Biol. Sci.* 2023; 30(4): 103604. DOI: 10.1016/j.sjbs.2023.103604.
17. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA*. 2007; 298(15): 1763-71. DOI: 10.1001/jama.298.15.1763.
18. Goncharov A.E., Zueva L.P., Suворov A.N., Glazovskaya L.S., Brusina E.B., Azizov I.S. et al. Leading *Staphylococcus aureus* epidemic clones circulating in different geographic regions of Eurasia. *Meditinskiy al manakh*. 2014; 4(34): 27-30. (in Russian)
19. Enright M.C., Day N.P., Davies C.E., Peacock S.J., Spratt B.G. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin.*

- Microbiol.* 2000; 38(3): 1008-15. DOI: 10.1128/jcm.38.3.1008-1015.2000.
20. Weiser R., Donoghue D., Weightman A., Mahenthiralingam E. Evaluation of five selective media for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a strain panel from clinical, environmental and industrial sources. *J. Microbiol. Methods.* 2014; 99: 8-14. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.01.010.
 21. Govan J.R.W. Characteristics of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. In: Gacesa P., Russell N.J., eds. *Pseudomonas Infection and Alginates*. Springer, Dordrecht; 1990: 50–75. DOI: 10.1007/978-94-009-1836-8_4.
 22. Malone J.G. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infect. Drug. Resist.* 2015; 29(8): 237-47. DOI: 10.2147/IDR.S68214.
 23. Baillie S., Ireland K., Warwick S., Wareham D., Wilks M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry: rapid identification of bacteria isolated from patients with cystic fibrosis. *Br. J. Biomed. Sci.* 2013; 70(4): 144-8. DOI: 10.1080/09674845.2013.
 24. Moehario L.H., Tjoa E., Putranata H., Joon S., Edbert D., Robertus T. Performance of TDR-300B and VITEK®2 for the identification of *Pseudomonas aeruginosa* in comparison with VITEK®MS. *J. Int. Med. Res.* 2021; 49(2):300060521989893. DOI: 10.1177/0300060521989893.
 25. Parkins M.D., Somayaji R., Waters V.J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(4): e00019-18. DOI: 10.1128/CMR.00019-18.
 26. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1. Available at: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints (accessed September 2023).
 27. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2023. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Available at: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed September 2023).
 28. Thornton C.S., Parkins M.D. Microbial epidemiology of the cystic fibrosis airways: past, present, and future. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2023; 44(02): 269-86. DOI: 10.1055/s-0042-1758732.
 29. Cardines R., Giufre M., Pompilio A., Fiscarelli E., Ricciotti G., Di Bonaventura G. et al. *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *Int. J. Med. Microbiol.* 2012; 302(1): 45-52. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.08.003.
 30. Roman F., Canton R., Perez-Vazquez M., Baquero F., Campos J. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(04): 1450-9. DOI: 10.1128/jcm.42.4.1450-1459.2004.
 31. Fluit A.C., Bayjanov J.R., Benaissa-Trouw B.J., Rogers M.R., Diez-Aguilar M., Canton R. et al. Whole-genome analysis of *Haemophilus influenzae* strains isolated from persons with cystic fibrosis. *J. Med. Microbiol.* 2022; 71(8): 001570. DOI: 10.1099/jmm.0.001570.
 32. Branstetter J.W., Yarbrough A., Poole C. Management of cepacia syndrome with a combination of intravenous and inhaled antimicrobials in a non-cystic fibrosis pediatric patient. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 2020; 25(8): 730-4. DOI: 10.5863/1551-6776-25.8.730.
 33. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group. 2022. Available at: <https://www.cysticfibrosis.org.uk/sites/default/files/2023-01/CF%20Lab%20Standards%20FINAL.pdf> (accessed September 2023).
 34. Marrs E.C.L., Perry A., Perry J.D. Evaluation of three culture media for isolation of *Burkholderia cepacia* complex from respiratory samples of patients with cystic fibrosis. *Microorganisms.* 2021; 9(12): 2604. DOI: 10.3390/microorganisms9122604.
 35. Cuzzi B., Herasimenka Y., Silipo A., Lanzetta R., Liut G., Rizzo R. et al. Versatility of the *Burkholderia cepacia* complex for the biosynthesis of exopolysaccharides: a comparative structural investigation. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94372. DOI: 10.1371/journal.pone.0094372.
 36. Zlosnik J.E., Hird T.J., Fraenkel M.C., Moreira L.M., Henry D.A., Speert D.P. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(4): 1470-3. DOI: 10.1128/JCM.02273-07.
 37. Cooper V.S., Staples R.K., Traverse C.C., Ellis C.N. Parallel evolution of small colony variants in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Genomics.* 2014; 104(6 Pt A): 447-52. DOI: 10.1016/j.ygeno.2014.09.007.
 38. Bernier S.P., Nguyen D.T., Sokol P.A. A LysR-type transcriptional regulator in *Burkholderia cenocepacia* influences colony morphology and virulence. *Infect. Immun.* 2008; 76(1): 38-47. DOI: 10.1128/IAI.00874-07.
 39. Jin Y., Zhou J., Zhou J., Hu M., Zhang Q., Kong N. et al. Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biol. Direct.* 2020; 15(1): 6. DOI: 10.1186/s13062-020-0258-5.
 40. Devanga Ragupathi N.K., Veerarahavan B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2019; 18(1): 7. DOI: 10.1186/s12941-019-0306-0.
 41. Pope C.E., Short P., Carter P.E. Species distribution of *Burkholderia cepacia* complex isolates in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients in New Zealand. *J. Cyst. Fibros.* 2010; 9(6): 442-6. DOI: 10.1016/j.jcf.2010.08.011.
 42. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Sharapova N.E., Semenov A.N. et al. On Burkholderiales order microorganisms and cystic fibrosis in Russia. *BMC Genomics.* 2018; 19(Suppl. 3): 74. DOI: 10.1186/s12864-018-4472-9.
 43. Dedeckova K., Kalferstova L., Strnad H., Vavrova J., Drevinek P. Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 2013; 12(5): 475-81. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.12.007.
 44. EUCAST Expected Resistant Phenotypes Version 1.2. January 2023. Available at: https://www.eucast.org/expert_rules_and_expected_phenotypes/expected_phenotypes (accessed September 2023).
 45. Berdah L., Taytard J., Leyronnas S., Clement A., Boelle P.Y., Corvol H. *Stenotrophomonas maltophilia*: a marker of lung disease severity. *Pediatr. Pulmonol.* 2018; 53(4): 426-30. DOI: 10.1002/ppul.23943.
 46. Kerr K.G., Denton M., Todd N., Corps C.M., Kumari P., Hawkey P.M. A new selective differential medium for isolation of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 15(7): 607-10. DOI: 10.1007/BF01709373.
 47. Denton M., Hall M.J., Todd N.J., Kerr K.G., Littlewood J.M. Improved isolation of *Stenotrophomonas maltophilia* from the sputa of patients with cystic fibrosis using a selective medium. *Clin. Microbiol. Infect.* 2000; 6(7): 397-8. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2000.00098.x.
 48. Said M.S., Tirhani E., Lesho E. *Stenotrophomonas maltophilia*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. PMID: 34283489.
 49. Esposito A., Pompilio A., Bettua C., Crocetta V., Giacobazzi E., Fiscarelli E. et al. Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis lung over chronic infection: a genomic and phenotypic population study. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1590. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01590.
 50. Marsac B., Berdah L., Thouvenin G., Sermet-Gaudelus I., Corvol H. *Achromobacter xylosoxidans* airway infection is associated with lung disease severity in children with cystic fibrosis. *ERJ Open Res.* 2021; 7(2): 00076-2021. DOI: 10.1183/23120541.
 51. Amoureux L., Bador J., Fardeheb S., Mabilie C., Couchot C., Massip C. et al. Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in hospital, domestic, and outdoor environmental samples and comparison with human clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(23): 7142-9. DOI: 10.1128/AEM.02293-13.
 52. Isler B., Kidd T.J., Stewart A.G., Harris P., Paterson D.L. *Achromobacter* infections and treatment options. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2020; 64(11): e01025-20. DOI: 10.1128/AAC.01025-20.
 53. Gabrielaite M., Nielsen F.C., Johansen H.K., Marvig R.L. *Achromobacter* spp. genetic adaptation in cystic fibrosis. *Microb. Genom.* 2021; 7(7): 000582. DOI: 10.1099/mgen.0.000582.
 54. Voronina O.L., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Semenov A.N., Lazareva A.V. et al. Diversity and hazard of respiratory infection of *Achromobacter* spp. in cystic fibrosis patients. *Pul'monologiya.* 2015; 25(4): 389-402. (in Russian)
 55. Prieto M.D., Alam M.E., Franciosi A.N., Quon B.S. Global burden of nontuberculous mycobacteria in the cystic fibrosis population: A systematic review and meta-analysis. *ERJ Open Res.* 2023; 9(1): 00336-2022. DOI: 10.1183/23120541.00336-2022.
 56. Lipuma J.J. The changing microbial epidemiology in cystic fibro-

- sis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2): 299-323. DOI: 10.1128/cmr.00068-09.
57. Stahl D.A., Urbance J.W. The division between fast-and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *Journal of bacteriology.* 1990; 172(1): 116-24. DOI: 10.1128/jb.172.1.116-124.1990.
58. Turenne C.Y. Nontuberculous mycobacteria: insights on taxonomy and evolution. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 72: 159-68. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.01.017.
59. van Ingen J., Turenne C.Y., Tortoli E., Wallace R.J. Jr, Brown-Elliott B.A. A definition of the *Mycobacterium avium* complex for taxonomical and clinical purposes, a review. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018; 68(11): 3666-77. DOI: 10.1099/ijsem.0.003026.
60. Candido P.H.C., Nunes L.D.S., Marques E.A., Folescu T.W., Coelho F.S., de Moura V.C.N. et al. Multidrug-resistant nontuberculous mycobacteria isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(8): 2990-2997. DOI: 10.1128/jcm.00549-14.
61. Zhou Y., Mu W., Zhang J., Wen S.W., Pakhale S. Global prevalence of non-tuberculous mycobacteria in adults with non-cystic fibrosis bronchiectasis 2006–2021: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2022; 12(8): e055672. DOI: 10.1136/bmjopen-2021-055672.
62. Espinosa-del-Barrio L., Boira I., Esteban V., Chiner E. *Mycobacterium malmoense* infection in a patient with adult cystic fibrosis: a case report. *Arch. Bronconeumol.* 2023; 59(8): 540-1. DOI: 10.1016/j.arbres.2023.03.021.
63. Russo C., Tortoli E., Menichella D. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of Mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(2): 334-9. DOI: 10.1128/jcm.44.2.334-339.2006.
64. Zemanick E.T., Hoffman L.R. Cystic fibrosis: microbiology and host response. *Pediatr. Clin. North. Am.* 2016; 63(4): 617-36. DOI: 10.1016/j.pcl.2016.04.003.
65. Rodriguez Temporal D., Zvezdanova M.E., Benedi P., Marin M., Blazquez Sanchez M., Ruiz Serrano M.J. et al. Identification of Nocardia and non-tuberculous Mycobacterium species by MALDI-ToF MS using the VITEK MS coupled to IVD and RUO databases. *Microb. Biotechnol.* 2023; 16(4): 778-83. DOI: 10.1111/1751-7915.14146.
66. Piersimoni C., Scarparo C. Pulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8(5): 323-34. DOI: 10.1016/S1473-3099(08)70100-2.
67. Daley C.L., Iaccarino J.M., Lange C., Cambau E., Wallace R.J. Jr, Andrejak C. et al. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(4): 905-13. DOI: 10.1093/cid/ciaa1125.
68. Griffith D.E. Nontuberculous Mycobacterial disease: a comprehensive approach to diagnosis and management. 1st Ed. Berlin: Springer; 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-93473-0.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd ed. Available at: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m24/> (accessed September 2023).
70. Cheng A., Sun H.Y., Tsai Y.T., Lu P.L., Lee S.S.J., Lee Y.T. et al. Longitudinal non-cystic fibrosis trends of pulmonary *Mycobacterium abscessus* disease from 2010 to 2017: spread of the “globally successful clone” in Asia. *ERJ Open Res.* 2021; 7(1): 00191-2020. DOI: 10.1183/23120541.00191-2020.
71. Waglechner N., Tullis E., Stephenson A.L., Waters V., McIntosh F., Ma J. et al. Genomic epidemiology of *Mycobacterium abscessus* in a Canadian cystic fibrosis centre. *Sci. Rep.* 2022; 12: 16116. DOI: 10.1038/s41598-022-19666-8.
72. Gross J.E., Caceres S., Poch K., Hasan N.A., Jia F., Epperson L.E. et al. Investigating Nontuberculous Mycobacteria transmission at the Colorado Adult Cystic Fibrosis Program. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2022; 205(9): 1064-74. DOI: 10.1164/rccm.202108-1911OC.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Кропотов В.С.¹, Заславская М.И.², Александрова Н.А.², Кряжев Д.В.¹, Айзенштадт А.А.³, Ермолина Г.Б.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАДИЙ БИОПЛЁНКООБРАЗОВАНИЯ У БАКТЕРИЙ-ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛОР-ИНФЕКЦИЙ ПРИ ПОМОЩИ ФОТОМЕТРИИ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ С 3D-МОДЕЛИРОВАНИЕМ

¹ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия;

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия;

³ГБУЗ НО «Детская городская клиническая больница № 1 Приокского района г. Нижнего Новгорода», 603081, г. Нижний Новгород, Россия

Приведены результаты исследования биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с хронической ЛОР-инфекцией. Для изучения биоплёнок применены фотометрические методы и люминесцентная микроскопия в сочетании с компьютерным 3D-моделированием. Проведено измерение массы биоплёночного матрикса и массы бактериальных клеток в динамике развития биоплёнки. Биоплёнкообразование у всех культур бактерий исследовано в течение семи дней. Показано, что все исследуемые штаммы бактерий способны образовывать биоплёнку. Последовательная визуализация с помощью 3D моделей выявила стадийную организацию при формировании биоплёнок. Данные 3D моделирования подтверждены результатами фотометрического анализа изменений массы матрикса биоплёнки и клеточной составляющей. Образование зрелой биоплёнки у всех культур бактерий происходило на четвёртые сутки. Процесс биоплёнкообразования у штаммов бактерий имел различия в динамике изменения массы клеток и межклеточного матрикса. Наиболее быстрое нарастание бактериальной массы наблюдалось у *S. aureus* и *P. aeruginosa*, тогда как наиболее интенсивное образование межклеточного матрикса характерно для *P. aeruginosa*. Люминесцентная микроскопия с компьютерным 3D моделированием дополняют фотометрический метод исследования биоплёнкообразующих свойств бактерий, что расширяет представление о развитии микробной популяции внутри биоплёнки, роли матрикса в поддержании структуры биоплёнки. Комбинация нескольких методов позволяет определить оптимальное время и мишени для антимикробного воздействия на биоплёнку, оценить различные способы регулирования процесса биоплёнкообразования у бактерий при некоторых инфекциях.

Ключевые слова: бактериальная биопленка; биоплёнкообразование; матрикс; люминесцентная микроскопия; 3D-моделирование; ЛОР-инфекции.

Для цитирования: Кропотов В.С., Заславская М.И., Александрова Н.А., Кряжев Д.В., Айзенштадт А.А., Ермолина Г.Б. Исследование стадий биопленкообразования у бактерий - возбудителей ЛОР инфекций при помощи фотометрии и люминесцентной микроскопии с 3D-моделированием. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12): 761-768.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-761-768>

Для корреспонденции: Кропотов Василий Сергеевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.; e-mail: basilek@bk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-19-00357, <https://rscf.ru/en/project/21-19-00357/>).

Поступила 21.06.2023

Принята к печати 08.11.2023

Опубликовано 10.12.2023

Kropotov V.S.1, Zaslavskaya M.I.2, Alexandrova N.A.2, Kryazev D.V.1, Ayzenshtadt A.A.3

INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION STAGES IN BACTERIAL PATHOGENS OF ENT INFECTIONS BY PHOTOMETRY AND LUMINESCENT MICROSCOPY WITH 3D MODELING

1Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 603950, Nizhny Novgorod, Russia ;

2Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia;

3State Budgetary Health Institution of the Nizhny Novgorod Region "Children's City Clinical Hospital No. 1 of the Prioksky District of Nizhny Novgorod" 603081, Nizhny Novgorod, Russia

The article presents the results of a study of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with chronic ENT infection. Various photometric methods and luminescence microscopy combined with 3D computer modeling were used for biofilm studying. The mass of the biofilm matrix and the mass of bacterial cells in dynamics of biofilm development were measured. Biofilm formation in all bacterial cultures was studied for seven days. It was shown all investigated bacterial strains are capable to biofilm forming. Sequential visualization using 3D models revealed a staged organization of biofilm formation. The 3D modeling data were confirmed by the results of photometric analysis the change of biofilm matrix and the cellular component. The formation of a mature biofilm in all bacterial cultures occurred on the fourth day. However, the process of biofilm formation of bacterial strains had differences in the dynamics of changes in cell mass and extracellular matrix. The most rapid increase in the bacterial mass was observed in *S. aureus* and *P. aeruginosa*, while the most intensive formation of the extracellular

matrix was typical for *P. aeruginosa*. Luminescent microscopy with 3D computer modeling complements the photometric method investigation of bacteria biofilm-forming properties, which expands the understanding of microbial population development inside the biofilm, as well as the role of matrix in maintaining the biofilm structure. Using the combination of several methods makes it possible to determine the optimal time and targets for the antimicrobial effect on the biofilm, as well as to evaluate the different ways of regulation of bacterial biofilm formation in some infections.

Key words: bacterial biofilm; biofilm formation; matrix; luminescent microscopy; 3D modeling; ENT infections.

For citation: Kropotov V.S., Zaslavskaya M.I., Alexandrova N.A., Kryazev D.V., Ayzenshtadt A.A., Ermolina G. B. Investigation of biofilm formation stages in bacterial pathogens of ENT infections by photometry and luminescent microscopy with 3D modeling. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 761-768 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-761-768>

For correspondence: Kropotov V.S., PhD, Senior Researcher; e-mail: basilek@bk.ru

Information about authors:

Kropotov V. S., <https://orcid.org/0000-0002-6903-962x>;

Zaslavskaya M. I., <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>;

Alexandrova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-4845-8056>;

Kryazev D. V., <https://orcid.org/0000-0002-0517-8065>;

Ayzenshtadt A. A., <https://orcid.org/0000-0002-9436-0060>;

Ermolina G. B., <https://orcid.org/0000-0003-0520-2456>.

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

Acknowledgment. The work was carried out with the support of the Russian Science Foundation (project No. 21-19-00357, <https://rscf.ru/en/project/21-19-00357/>).

Received 21.06.2023

Accepted 08.11.2023

Published 10.12.2023

Введение. В настоящее время общепринятой является концепция, согласно которой подавляющее большинство микроорганизмов в естественных условиях существует не в виде свободноживущих планктонных клеток, а в составе различных ассоциаций и, прежде всего, биоплёнок [1-3]. Согласно современным представлениям, бактериальная биоплёнка (*англ.* biofilm) - обладающая пространственной и метаболической структурой бактериальная популяция, заключенная в межклеточное вещество (матрикс) и расположенная на границе раздела сред (фаз) [4,5]. Бактериальная биоплёнка может состоять из одного или нескольких видов бактерий, где микробные клетки прикреплены друг к другу и к субстратам [6,7].

Образование микроорганизмами биоплёнок является одним из механизмов хронизации инфекционного процесса [8,9]. Ряд хронических инфекций (лёгочные, ушные, раневые) – это инфекции, возникновение которых связано с использованием медицинского имплантируемого оборудования: линз, катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца, обусловлены бактериями, растущими в виде биоплёнок [10-12]. Более 80% инфекций, которые трудно диагностировать и лечить, связаны с бактериальными биоплёнками [13,14]. Неоспорима роль бактериальных биоплёнок в патогенезе хронических инфекций ЛОР-органов [15]. Отмечается высокая (до 62%) распространённость биоплёнок при хроническом ларингите [16]. При гистологическом изучении удалённых глоточных миндалин у детей, установлено, что распространённость биоплёнок в аденоидах составляет, в среднем, 63,5%, если ребёнок страдает хроническим средним отитом, и 47,1%, если отиты в анамнезе отсутствуют [17]. Биоплёнки в аденоидной ткани могут служить резервуаром для возбудителей инфекций не только в среднем ухе, но и в других отделах дыхательной системы [18]. Сложность борьбы с биоплёночными инфекциями обусловлена, в частности, тем, что бактерии в биоплёнках более

устойчивы к антибиотикам, бактериофагам, факторам иммунитета человека, чем планктонные клетки [19-21]. Механизмы такой устойчивости различны и зависят от структурных особенностей биоплёнок [22,23].

В связи с задачей своевременного выявления биоплёнок как на медицинском оборудовании, так и в тканях пациента, идёт поиск, отбор и совершенствование методов исследования процесса биоплёнокообразования. Классическим считается фотометрический метод [24], позволяющий установить принципиальную способность штаммов к биоплёнокообразованию. Предложенная нами ранее модификация фотометрического метода [25], даёт дополнительную возможность выявить наличие отдельных субкомпонентов (микробная масса, межклеточный матрикс) биоплёнки. Современная оптическая микроскопия позволяет не только оценить структурную организацию бактериальных биоплёнок, но и проводить верифицируемые количественные исследования пространственно-временных и физико-химических характеристик объектов. А дополнительное применение компьютерной обработки изображения позволяет совершенствовать оптический метод исследования. Этот подход позволяет не только ускорить и автоматизировать процесс визуализации стадий формирования бактериальной биоплёнки, но и даёт возможность получать новые, ранее недоступные, сведения об объекте [26,27].

Цель работы - комплексное исследование биоплёнокообразующих свойств и динамики биоплёнокообразования у бактерий-возбудителей хронических ЛОР-инфекций с помощью сочетания методов: фотометрии, люминесцентной микроскопии и компьютерной программы распознавания объектов.

Материал и методы. В работе использованы клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, выделенные в результате обследования микрофлоры рото- и носоглотки

119 пациентов ЛОР-отделения одного из многопрофильных детских стационаров Нижнего Новгорода в возрасте от 2-х до 16-ти лет с диагнозом хронический аденоидит и гипертрофия лимфоидного кольца П-III степени. Исследование проводилось в соответствии с нормами международного законодательства (Хельсинская декларация 1964 г.) на основании информиро-

ванного добровольного согласия на медицинское вмешательство с пациентом, либо его родителем (законным представителем). Выделенная условно-патогенная микрофлора преимущественно представлена *Staphylococcus aureus* (84,6%), в меньших количествах обнаруживались *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Всего выделено 39 изолятов (табл. 1).

Таблица 1

Клинические изоляты от пациентов ЛОР-отделения одного из многопрофильных детских стационаров Нижнего Новгорода (n= 39)

Вид	Абс.	%	Локус выделения (абс./%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	33	84,6	16/48,5 - носоглотка 15/45,5 - ротоглотка 2/6 - нос, параназальные синусы
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	7,7	3/100 - носоглотка
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	7,7	3/100 - нос, параназальные синусы

Идентификацию штаммов проводили культуральным методом с использованием биохимических тест-систем, а также методом время-пролётной MALDI-ToF масс-спектрометрии на масс-спектрометре Autoflex speed (Bruker Daltonics, Германия) с применением программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. Используются суточные чистые культуры бактерий, выращенные на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия).

Биоплёнкообразующая способность штаммов (скрининговое исследование) оценивалась с помощью классического фотометрического метода по O'Toole [24]: способность к формированию биоплёнки оценивали по интенсивности окрашивания кристаллическим фиолетовым сформировавшейся биоплёнки в лунках пластикового планшета, с последующей элюацией 96% спиртом. Оптическая плотность (ОП) элюата измерялась фотометрически в единицах оптической плотности при длине волны 540 нм. Степень плёнкообразования определяли по коэффициенту k , рассчитанному как отношение разности суммарной оптической плотности ОП₅₄₀ опытных образцов и контрольных к суммарной ОП₅₄₀ выросших в лунках планшета клеток до окрашивания.

Изучение количественно-временной динамики накопления массы клеток бактерий и межклеточного матрикса в составе биоплёнок проведено фотометрически, методом определения адсорбированного количества красителя в модификации, представленной в патенте РФ № 2770413 [25].

Для проведения микроскопического исследования биоплёнки выращивались на покровных стеклах для последующей микроскопии. Для этого, суспензию бактерий разводили до концентрации 1 по МакФарланду в ГРМ-бульоне (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), затем 100 мкл суспензии помещали на покровное стекло и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. Стекла после инкубации отмывали от не прикрепившихся клеток бактерий забуференным фосфатами физиологическим раствором (PBS). Затем стекла погружали узкой гранью в ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) под углом 40°-50° к поверхности агара в чашке Петри, заливали в чашку 10 мл ГРМ-бульона (ФБУН ГНЦ

ПМБ, Россия), после чего инкубировали при 37 °С. В каждой чашке размещали 4 стекла для выявления биоплёнкообразования. На 1, 2, 4 и 7-е сутки извлекали одно из стекол, с одновременной полной заменой жидкой питательной среды в чашке Петри. Покровное стекло отмывали от не прикрепившихся клеток и высушивали на листе фильтровальной бумаги. Препарат фиксировали в течение 3 минут в 96% этаноле и, после удаления спирта, приклеивали на предметное стекло с помощью прозрачного лака. Готовый препарат окрашивали раствором акридинового оранжевого (20 мкг/мл) в течение 10 минут, три раза промывали проточной водой, высушивали в темноте, просматривали с использованием микроскопа «Микмед-6 вариант 11» с люминесцентным модулем (ЛОМО, Россия) при увеличении x100 в иммерсионной системе и фотографировали цифровой камерой. В дальнейшем проводилась цифровая обработка полученных изображений с применением 3D-моделирования при помощи программного комплекса ImageJ ver. 1.52a.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлена с помощью программы Microsoft Excel 2013. Применены методы описательной статистики: $n=3$, вычислено среднее арифметическое (M), стандартная ошибка среднего (m).

Результаты. Все исследуемые штаммы бактерий продемонстрировали способность к биоплёнкообразованию. Согласно методу O'Toole [24], коэффициент удельного биоплёнкообразования у *P. aeruginosa* составлял - 4,6; у *K. pneumoniae* - 1,96, у *S. aureus* - 6,2 (см. табл. 1).

После первых суток культивирования, в соответствии с общепринятой теорией развития биоплёнки [7], клетки бактерий адгезировались на поверхности стекла и активно размножались, формируя монослой (рис. 1, а, б, в). На 3D модели видно, что в суточной биоплёнке *P. aeruginosa* наблюдаются как отдельные клетки, так и небольшие скопления клеток. В суточной биоплёнке *S. aureus* агломерации более выражены. Существенным отличием *K. pneumoniae* от вышеуказанных бактерий был факт более слабой колонизации поверхности стекла.

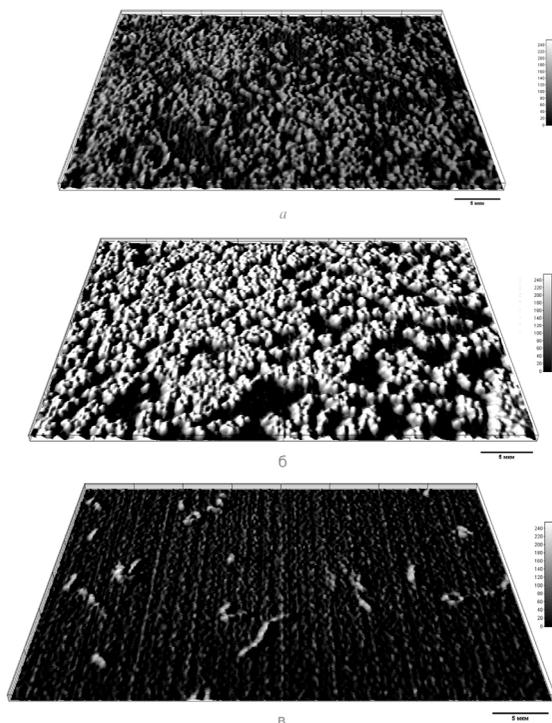


Рис. 1. Развитие биоплёнки после первых суток культивирования (окраска акридиновым оранжевым. Ув. x1000).

а - *Pseudomonas aeruginosa*; б - *Staphylococcus aureus*; в - *Klebsiella pneumoniae*.

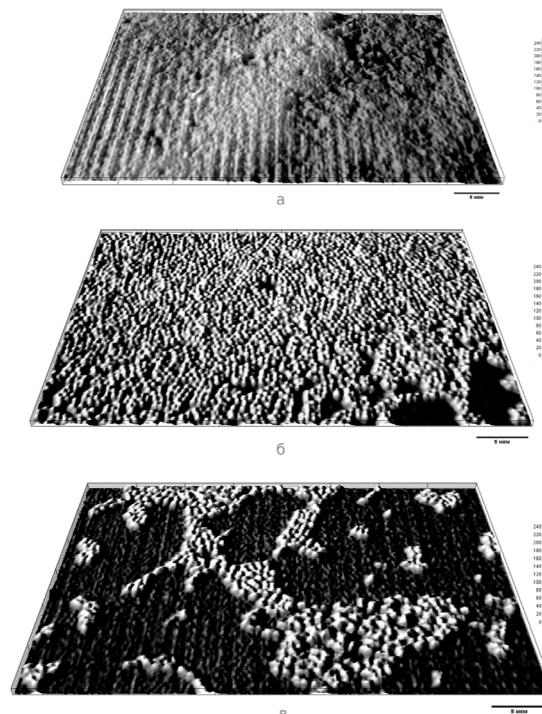


Рис. 2. Развитие биоплёнки после вторых суток культивирования (окраска акридиновым оранжевым. Ув. x1000):

а - *Pseudomonas aeruginosa*; б - *Staphylococcus aureus*; в - *Klebsiella pneumoniae*.

После двух суток культивирования (рис. 2, а,б,в) размножение клеток *P. aeruginosa* и *S. aureus* продолжалось. При этом *S. aureus* демонстрировал активное построение внеклеточного матрикса. Клетки *K. pneumoniae* размножались и синтезировали компоненты матрикса, но по обоим этим показателям отставали от представителей других видов бактерий.

На четвёртые сутки культивирования (рис. 3, а, б, в) различия в структуре биоплёнок между представителями разных видов слабо выражены. После 4-х суток культивирования у всех штаммов можно наблюдать зрелую сформированную биоплёнку с развитым матриксом и значительным количеством клеток (см. рис. 3).

После 7-х суток культивирования можно наблюдать элементы деградации биоплёнок (рис. 4). Они уже не занимали всей площади наблюдения, клеточная составляющая явно снижалась, матрикс приобрёл многослойность и рельефность. При этом на 7-е сутки биоплёнки *P. aeruginosa* (рис. 4, а, б, в) имели более сохранный ультраструктуру, чем *S. aureus* или *K. pneumoniae*.

На следующем этапе работы мы оценивали динамику накопления массы матрикса и клеток у исследуемых штаммов бактерий. Выяснено, что масса матрикса у всех культур бактерий нарастала линейно и достигала к 7-м суткам значений, превышающих массу клеточного вещества (рис. 5, а, б, в).

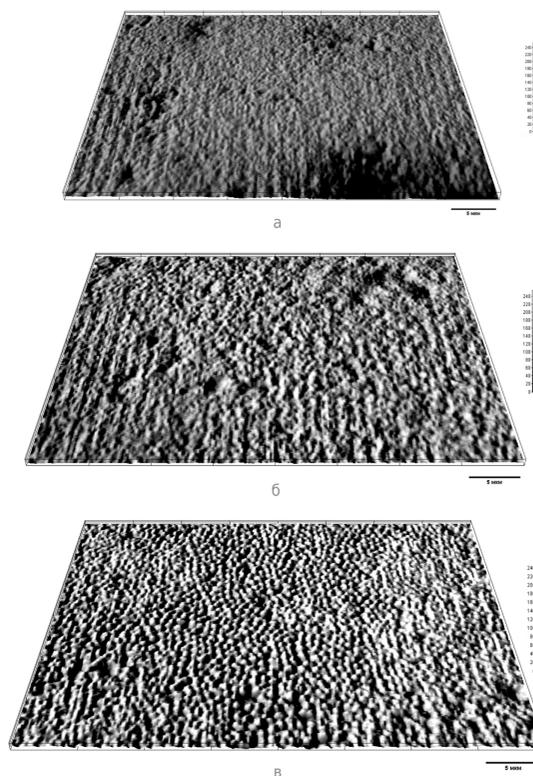


Рис. 3. Развитие биоплёнки после 4-х суток культивирования (окраска акридиновым оранжевым. Ув. x1000).

а - *Pseudomonas aeruginosa*; б - *Staphylococcus aureus*; в - *Klebsiella pneumoniae*.

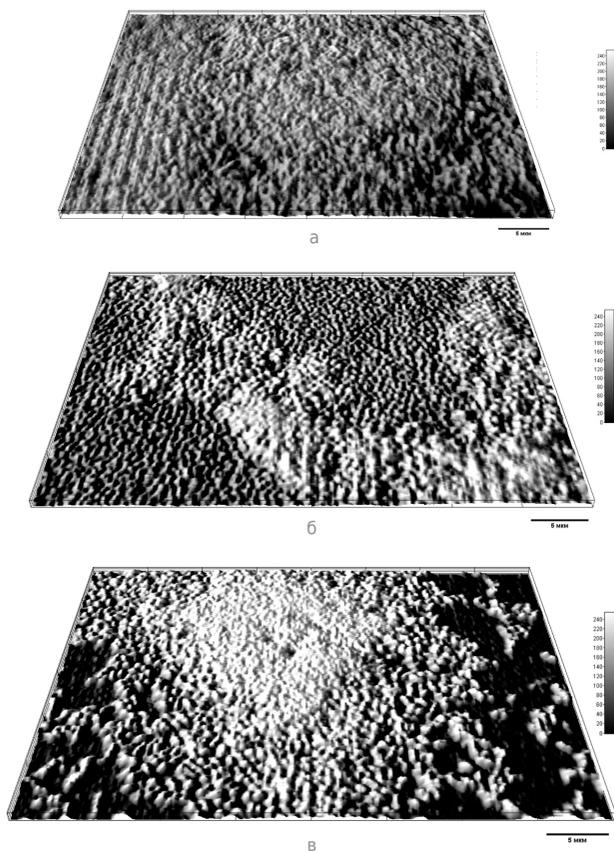


Рис. 4. Развитие биоплёнки после 7-ми суток культивирования (окраска акридиновым оранжевым. Ув. x1000).

а - *Pseudomonas aeruginosa*; б - *Staphylococcus aureus*; в - *Klebsiella pneumoniae*

Отличия наблюдались только в скорости нарастания массы матрикса после первых суток культивирования (тангенс угла наклона графика по отношению к оси абсцисс). После первых суток культивирования максимальный объём матрикса отмечен у *S. aureus* (рис. 5, б). Наиболее быстрое увеличение объёма матрикса (при относительно низкой массе матрикса в первые сутки культивирования) наблюдалось у *P. aeruginosa* ($tg=18,79$) (рис. 5, а), по сравнению с *S. aureus* ($tg=14,56$) (рис. 5, б) и *K. pneumoniae* ($tg=10,30$) (рис. 5, в).

Динамика изменения объёма клеточной составляющей у разных штаммов отличалась, имея общую тенденцию к снижению на 7-е сутки. Бактериальная масса *P. aeruginosa* резко увеличивалась через сутки после культивирования, затем плавно снижалась на протяжении 7 суток (рис. 5, а). Значительное увеличение клеточной массы в течение 3-х суток культивирования наблюдалось у *S. aureus* и *K. pneumoniae* (рис. 5, б, в). На 3D моделях видно, что плотность заполнения биоплёнкой поля наблюдения резко увеличивалась. Через 4 суток культивирования объём клеточной массы во всех биоплёнках начинал уменьшаться. При этом для *P. aeruginosa* характерно достаточно плавное и равномерное снижение количества клеточной массы (рис. 5, а). После семи суток культивирования количество клеток в структуры биоплёнки *P. aeruginosa* снижалось менее чем на 10% (рис. 5, а), в то время как в биоплёнках *S. aureus* и *K. pneumoniae*, бактериальная масса резко уменьшалась после 4-х суток культивирования (рис. 5, б, в).

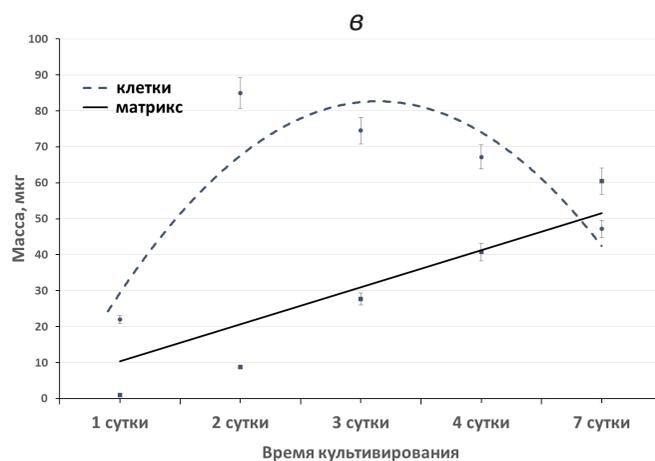
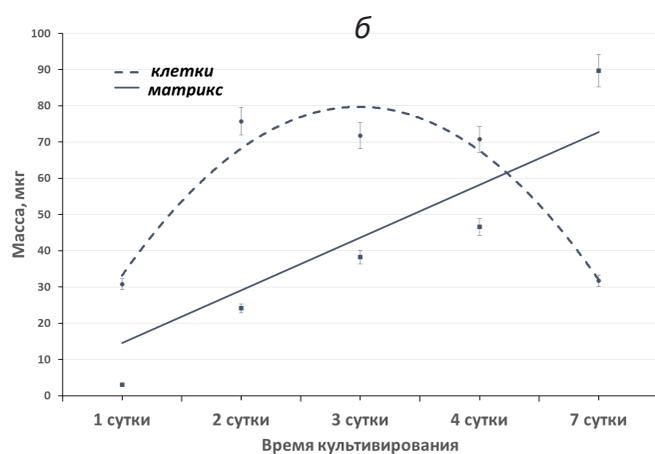
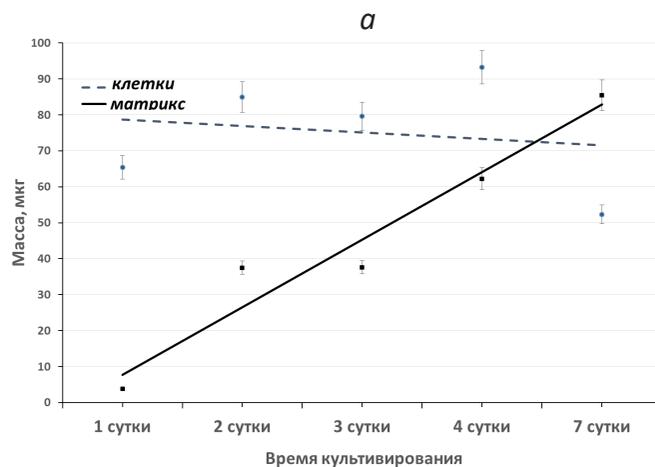


Рис. 5. Динамика изменения массы клеток и матрикса в биоплёнке:

а - *Pseudomonas aeruginosa*, б - *Staphylococcus aureus*, в - *Klebsiella pneumoniae*.

Способность микроорганизмов к формированию биоплёнок – это их функция от окружающей среды, т.е. применительно к условиям вышеописанных экспериментов - функция от питательной среды, в которой культивировались бактерии.

Поскольку в динамике образования биоплёнки *K. pneumoniae* в первые сутки культивирования выявлены существенные отличия от других исследованных культур, для корректировки возможной методической

ошибки, связанной с особенностями воздействия на данную культуру компонентов питательной среды ГРМ-бульона, проведены дополнительные эксперименты по образованию биоплёнки *K. pneumoniae* в иной питательной среде, отличающейся по составу (бульон Мюллера-Хинтона, состав среды: кислый казеиновый пептон (н), кукурузный крахмал, вытяжка из говядины). Сравнив данные, представленные на рис. 5, в с результатами дополнительного эксперимента (рис. 6) можно легко убедиться, что принципиальных отличий в динамике образования биоплёнки *K. pneumoniae* в различных питательных средах не наблюдается.

Данные статистической обработки результатов экспериментов приведены в табл. 2. Как следует из данных табл. 2 точность и повторяемость средних значений массы клеточного вещества и матрикса в эксперименте, согласно коэффициенту вариации, выше 90%.

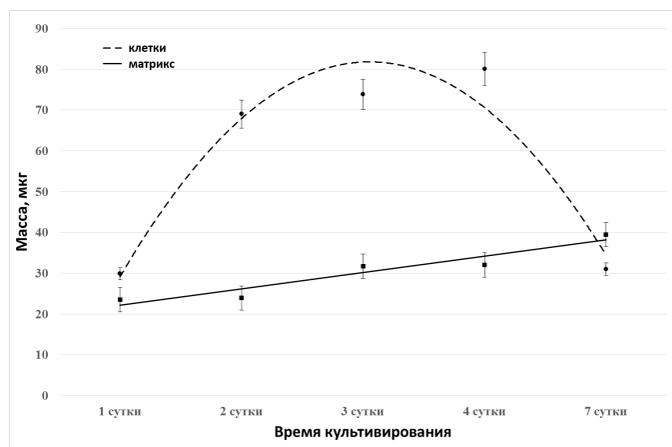


Рис. 6. Динамика изменения массы клеток и матрикса в биопленке *Klebsiella pneumoniae* при выращивании в бульоне Мюллера-Хинтона.

Таблица 2

Параметры динамики процесса образования биоплёнки у *K. pneumoniae* при культивировании в различных питательных средах

Сутки культивирования	Питательная среда																			
	ГРМ-бульон										Бульон Мюллера-Хинтона									
	клетки, мкг					матрикс, мкг					клетки, мкг					матрикс, мкг				
	ряд 1	ряд 2	ряд 3	среднее ± SD	CoV (%)	ряд 1	ряд 2	ряд 3	среднее ± SD	CoV (%)	ряд 1	ряд 2	ряд 3	среднее ± SD	CoV (%)	ряд 1	ряд 2	ряд 3	Среднее ± SD	CoV (%)
1-е	21,96	22,03	20,75	21,58 ± 0,72	3,3	00,91	00,94	00,85	00,9 ± 0,05	5,1	29,85	30,46	27,15	29,15 ± 1,76	6,0	23,48	25,89	22,18	23,85 ± 1,90	7,9
2-е	84,96	85,07	83,28	84,43 ± 1,00	1,2	08,74	08,72	07,78	08,41 ± 0,55	6,5	69,04	72,18	70,94	70,72 ± 1,58	2,2	23,88	24,05	25,72	24,60 ± 1,02	4,1
3-и	74,51	72,35	71,09	72,65 ± 1,72	2,4	27,71	25,12	29,45	27,43 ± 2,18	7,9	73,86	75,44	79,12	76,14 ± 2,70	3,5	31,69	33,15	28,54	31,13 ± 2,36	7,6
4-е	67,15	65,12	70,15	67,47 ± 2,50	3,8	40,73	42,14	38,79	40,55 ± 1,68	4,2	80,10	87,62	79,84	82,52 ± 4,42	5,4	31,99	29,04	34,38	31,80 ± 2,67	8,4
7-е	47,18	44,12	50,48	47,26 ± 3,18	6,7	60,47	65,24	68,14	64,62 ± 3,87	6,0	31,00	27,05	29,46	29,17 ± 2,00	6,8	39,47	42,34	37,92	39,91 ± 2,24	5,6

Примечание. SD - стандартное отклонение; CoV – коэффициент вариации.

Обсуждение. Низкая способность штамма *K. pneumoniae* к формированию биоплёнки, выявленная уже через сутки культивирования, хорошо соотносится с данными оценки биоплёнокообразования классическим фотометрическим методом по O'Toole. Результаты, полученные при анализе 3D моделей биоплёнок, после двух суток культивирования (рис. 2) показали, что биоплёнка *K. pneumoniae*, при дальнейшем культивировании образует многослойную структуру, обладающую рельефной поверхностью и мало отличается от биоплёнок других изученных культур. Использование только одного метода O'Toole недостаточно для получения полного представления о биоплёнокообразующих свойствах бактерий, в частности, динамике биоплёночного процесса и ультраструктуре биоплёночного сообщества.

При анализе раннего этапа формирования биоплёнки (1-е сутки) видно, что, согласно ахроматической шкале, интенсивность окраски внеклеточного матрикса более выражена у биоплёнок *S. aureus*, по сравнению с *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Это может свиде-

тельствовать о более активной выработке компонентов матрикса золотистым стафилококком по сравнению с другими бактериями на раннем (1-е сутки) этапе формирования биоплёнки. В дальнейшем (2-7-е сутки), наиболее интенсивное нарастание объёма матрикса отмечено у *P. aeruginosa*. Увеличение объёма матрикса во всех биоплёночных культурах шло по пути прямой линейной зависимости и наблюдалось в течение всего времени культивирования.

Динамика размножения клеток в биоплёнках у разных бактерий имела особенности. При этом если для *P. aeruginosa* (рис. 5, а) динамика изменения массы клеток в интервале 1-7-ми суток показывала линейную зависимость, то для описания изменения клеточной массы в биоплёнках *S. aureus* и *K. pneumoniae* необходимо применять полиномиальное уравнение (рис. 5, б, в).

Заключение. Исследование клинических изолятов *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *K. pneumoniae*, полученных от детей с хроническими оппортунистическими инфекциями ЛОР-органов, с помощью фотометрических мето-

дов, люминесцентной микроскопии, 3D-моделирования показало, что все исследуемые штаммы способны формировать трёхмерные биоплёночные структуры, состоящие из клеток бактерий и внеклеточного матрикса. Образование наиболее сбалансированной и зрелой биоплёнки у всех культур бактерий происходит достаточно синхронно - на 4-е сутки. Статистическая обработка данных фотометрии об увеличении объёма матрикса и клеточной массы, последовательная визуализация биоплёнки с помощью 3D моделей выявила характерный для биоплёнок стадийный процесс их формирования, имеющий особенности для каждого вида бактерий.

Подтверждена высокая информативность исследования биоплёнокообразования с использованием микрофотографий, полученных с помощью оптического микроскопа с люминесцентным модулем и программного комплекса ImageJ. Вышеуказанный метод может существенно дополнить базу знаний о механизмах и этапах формирования биоплёнок, роли матрикса в поддержании структуры биоплёнки и динамике изменения клеточной массы.

Предложенный комбинированный способ исследования бактериальных биоплёнок не только позволяет получить развернутую картину событий, но и определить оптимальное время и мишени для антимикробного воздействия на биоплёночное сообщество и его субкомпоненты, использовать данный прием для оценки различных вариантов регулирования процесса биоплёнокообразования, направленных на снижение риска развития хронических оппортунистических бактериальных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А. Биопленка *Vibrio cholerae*: механизмы, регулирующие образование, и сигналы внешней среды, способствующие ее формированию. Проблемы особо опасных инфекций [Интернет]. 2019; (3):19-25. Доступно на: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1170>.
- 4 Шарипова М.Р., Марданова А.М., Рудакова Н.Л., Пудова Д.С. Бистабильность и формирование матрикса биопленки как механизмы адаптации *Bacillus subtilis* в стационарной фазе. *Микробиология* [Интернет]. 2021; 90(1):24-42. Доступно на: <https://elibrary.ru/item.asp?doi=10.31857/S0026365620060178>.
- 6 Кропотов В.С., Заславская М.И., Игнатова Н.И., Кряжев Д.В. Современные методы исследования ультраструктуры бактериальных биоплёнок (обзор литературы). *Проблемы медицинской микологии*. 2022; 24(4):10-20.
- 8 Ильина Т.С., Романова Ю.М. Бактериальные биопленки: роль в хронических инфекционных процессах и поиск средств борьбы с ними. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021; 39(2):14-24.
- 21 Чеботарь И.В., Бочарова Ю. А., Гурьев А.С., Маянский Н.А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(2):116-121.
- 25 Кряжев Д.В., Ермолина Г.Б., Кропотов В.С. Способ оценки бактериальной биоплёнки. Патент РФ № 2770413 С1; 2022.

REFERENCES

- 1 Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritskiy A.A. *Vibrio cholerae* biofilm: mechanisms that regulate formation and environmental signals that promote its formation. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* [Internet]. 2019; (3):19-25. Available at: <https://journal.microbe.ru/jour/article/view/1170>. (in Russian)
- 2 Lade H., Park J.H., Chung S.H., Kim I.H., Kim J.M., Joo H.S. et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Dif-

- ferentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *J. Clin. Med.* [Internet]. 2019; 8(11). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6912320/>.
3. Cavalheiro M., Pereira D., Formosa-Dague C., Leitão C., Pais P., Ndlovu E. et al. From the first touch to biofilm establishment by the human pathogen *Candida glabrata*: a genome-wide to nanoscale view. *Commun. Biol.* [Internet]. 2021; 4(1). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34285314/>.
4. Sharipova M.R., Mardanova A.M., Rudakova N.L., Pudova D.S. Bistability and biofilm matrix formation as adaptation mechanisms of *Bacillus subtilis* in the stationary phase. *Mikrobiologiya* [Internet]. 2021; 90(1):24-42. Available at: <https://elibrary.ru/item.asp?doi=10.31857/S0026365620060178>. (in Russian)
5. Bjarsholt T., Buhlin K., Dufrene Y.F., Gomelsky M., Moroni A., Ramstedt M. et al. Biofilm formation – what we can learn from recent developments. *J. Intern. Med.* [Internet]. 2018; 284(4):332-45. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6927207/>.
6. Kropotov V.S., Zaslavskaya M.I., Ignatova N.I., Kryazhev, D.V. Modern methods for examining the ultrastructure of bacterial biofilms (literature review). *Problemy meditsinskoj mikologii*. 2022; 24(4):10-20. (in Russian)
7. Schilcher K., Horswill A.R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol. mol. biol. rev. MMBR* [Internet]. 2020; 84(3). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430342/>.
8. Ilyina T.S., Romanova Y. Bacterial biofilms: their role in chronic infection processes and the means to combat them. *Mol. genet. microbiol. virol.* (Russ. Version). 2021; 39:14. (in Russian)
9. Abu Khweek A., Amer A.O. Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila* [Internet]. *Frontiers in cellular and infection microbiology. Frontiers Media S.A.* 2018; 8:38. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5835138/>.
10. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A. et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. med. assoc. J. CMA.* 2018; 81(1):7-11.
11. Arciola C.R., Campoccia D., Montanaro L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion [Internet]. *Nature Reviews Microbiology.* Nature Publishing Group; 2018; 16: 397-409. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29720707/>.
12. Bell T., O'Grady N.P. Prevention of Central Line-Associated Blood-stream Infections [Internet]. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2017; 31:551-9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5666696/>.
13. Mirzaei R., Mohammadzadeh R., Alikhani M.Y., Shokri Moghadam M., Karampoor S., Kazemi S. et al. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life* [Internet]. 2020; 72(7):1271-85. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/iub.2266>.
14. Mesrati I., Saidani M., Jemili M., Ferjeni S., Slim A., Boubaker I.B.B. Virulence determinants, biofilm production and antimicrobial susceptibility in *Staphylococcus aureus* causing device-associated infections in a Tunisian hospital. *Int. J. antimicrob. agents* [Internet]. 2018; 52(6):922-9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29775684/>.
15. Ding L., Wang J., Cai S., Smyth H., Cui Z. Pulmonary biofilm-based chronic infections and inhaled treatment strategies. *Int. J. Pharm.* 2021; 604:120768.
16. Kinnari T.J. The role of biofilm in chronic laryngitis and in head and neck cancer. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2015; 23(6):448-53.
17. Kania R., Vironneau P., Dang H., Bercot B., Cambau E., Verillaud B. et al. Bacterial biofilm in adenoids of children with chronic otitis media. Part I: a case control study of prevalence of biofilms in adenoids, risk factors and middle ear biofilms. *Acta otolaryngol.* (Stockh.). 2019; 139(4):345-50.
18. Vestby L.K., Grønseth T., Simm R., Nesse L.L. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* [Internet]. 2020; 9(2):59. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7167820/>.
19. Grande R., Puca V., Muraro R. Antibiotic resistance and bacterial biofilm. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2020; 30(12):897-900.
20. Vuotto C., Pascolini C., Balice M., Libori M., Tiracchia V., Salvia A. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in Kleb-

- siella pneumoniae urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* [Internet]. 2017; 123(4):1003-18. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28731269/>.
21. Chebotar' I.V., Bocharova Y.A., Gur'ev A.S., Mayansky N.A. Bacteria survival strategies in contact with antibiotics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; (2):116-21. (in Russian)
 22. Badar W., Ullah Khan M.A. Analytical study of biosynthesised silver nanoparticles against multi-drug resistant biofilm-forming pathogens. *IET Nanobiotechnol.* [Internet]. 2020; 14(4):331-40. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1049/iet-nbt.2019.0287>.
 23. Hall C.W., Mah T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press; 2017; 41: 276-301.
 24. O'Toole G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J. Vis. Exp. JoVE* [Internet]. 2011; (47):2437. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182663/>.
 25. Kryazhev D.V., Ermolina G.B., Kropotov V.S. Method of evaluation of bacterial biofilm. Patent RF № 2770413 C1; 2022. (in Russian)
 26. Relucenti M., Familiari G., Donfrancesco O., Taurino M., Li X., Chen R. et al. Microscopy methods for biofilm imaging: Focus on sem and VP-SEM pros and cons [Internet]. *Biology* (Basel); 2021; 10: 1-17. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33445707/>.
 27. Caizán-Juanarena L., Krug J.R., Vergeldt F.J., Kleijn J.M., Velders A.H., Van As H. et al. 3D biofilm visualization and quantification on granular bioanodes with magnetic resonance imaging. *Water Res.* 2019; 167:115059.

Мультивитаминный комплекс для детей

*Иммунитет
на 5 отлично!*



Мультивитаминный
комплекс для детей

с 3 лет
ЭКОлаб



100 мл



Натуральный
состав



Полный комплекс
витаминов для детей
с 3 лет



Поддержка иммунной
системы



Полноценное развитие
детского организма

www.ekolab.ru

доступно
на маркетплейсах



БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНАЯ ДОБАВКА. НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ.

ДИАГНОСТИКА COVID

ИХА-SARS-CoV-2-Ag

№ РЗН 2022/18810 от 16.11.2022 г.

Тест-система иммунохроматографическая для качественного выявления антигенов вируса SARS-CoV-2 в образцах назофарингеальных мазков человека

- Безошибочное выявление бессимптомных случаев инфицирования
- Прямой метод этиологической диагностики наряду с ПЦР
- Набор укомплектован всем необходимым
Удобное хранение при температуре 2-30 °С
- Оценка результата: визуально через 10-15 минут

Диагностическая чувствительность набора: 99,46 %
Диагностическая специфичность набора: 99,70 %



ИХА-COVID-19-IgM/IgG

№ РЗН 2020/11955 от 14.09.2020 г.

Тест-система иммунохроматографическая для качественного дифференцированного выявления антител IgM/IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 в образцах сыворотки, плазмы или цельной крови человека

- Исследуемые образцы: сыворотка, плазма или цельная кровь человека
- Объем образца: 10 мкл
- Оценка результата: визуально через 10-15 минут
- Срок годности набора: 25 месяцев

Диагностическая чувствительность набора - 98%
Диагностическая специфичность набора - 100%



г. Электрогорск,
ул. Буденного, д. 1



8-800-333-33-47



www.ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru

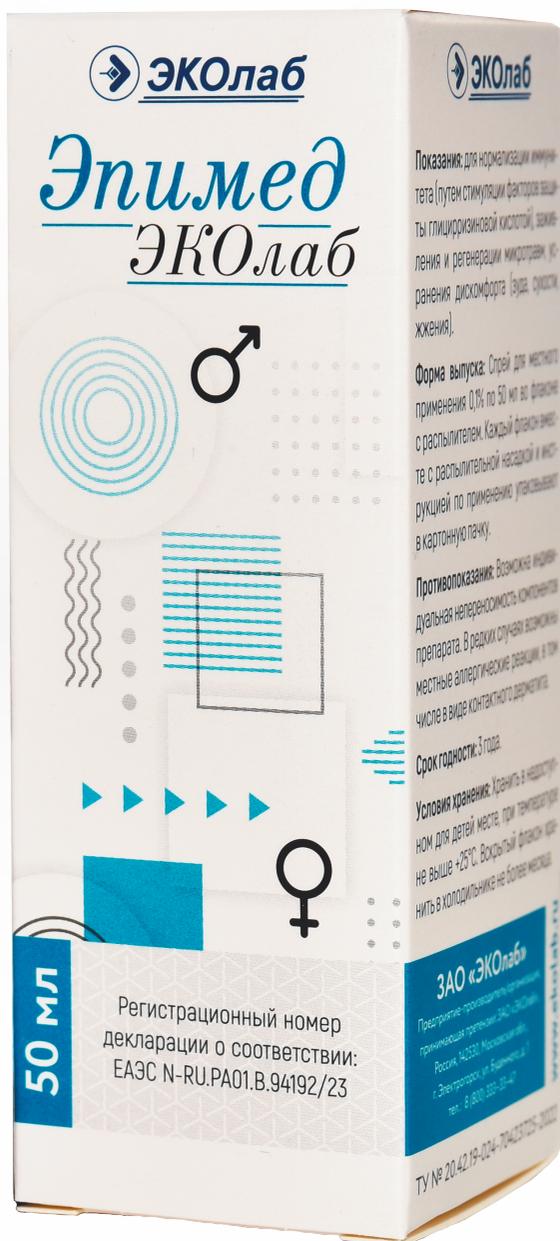
РЕКЛАМА



Эпимед

ЭКОлаб

ИНТИМНОЕ ЗДОРОВЬЕ ДО И ПОСЛЕ



Оказывает следующие действия:

- Иммуностимулирующее
- Противовирусное
- Противовоспалительное
- Противозудное
- Регенерирующее



Спрей для наружного и местного применения

WILDBERRIES

OZON

Я М Market

www.ekolab.ru

НОВИНКИ ИХА-Диагностики



Экспресс-тест для качественного определения суммарных антител к вирусу иммунодефицита человека 1 и 2 типа в образцах сыворотки, плазмы или цельной крови человека

«ИХА-ВИЧ 1/2»

№ РЗН 2023/21550 от 21.11.2023



- ✓ ранняя диагностика ВИЧ-инфекции
- ✓ мониторинг эффективности противовирусной терапии
- ✓ определение ВИЧ статуса человека
- ✓ выявление антител IgA/IgG/IgM к ВИЧ 1/2
- ✓ порог обнаружения - 2 МЕ/мл
- ✓ исследуемый материал: сыворотка, плазма или цельная кровь
- ✓ бесприборный учет результата
- ✓ подходит для самотестирования
- ✓ быстрый формат исследования
- ✓ срок годности 25 месяцев

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,66%-100% (с доверительной вероятностью 95%).
Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,68%-100% (с доверительной вероятностью 95%).

Экспресс-тест для качественного определения суммарных антител к антигенам вируса гепатита С в образцах сыворотки, плазмы или цельной крови человека

«ИХА-антиВГС»

№ РЗН 2023/21425 от 25.10.2023

- ✓ ранняя диагностика гепатита С
- ✓ выявление антител IgA/IgG/IgM к гепатиту С
- ✓ исследуемый материал:
сыворотка, плазма или цельная кровь
- ✓ бесприборный учет результата
- ✓ подходит для самотестирования
- ✓ быстрый формат исследования
- ✓ срок годности 25 месяцев

Диагностическая чувствительность набора реагентов: 99,6% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).

Диагностическая специфичность набора реагентов: 99,67% - 100% (с доверительной вероятностью 95%).



КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Дмитрюкова М.Ю.¹, Малтызова М.И.¹, Голод А.А.¹, Комиссарова К.С.², Сенина М.Е.^{1,3}, Гуштин А.Е.^{3,4}

ВАЛИДАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ 13-ТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНО-ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ООО «НекстБио», 111394, Москва, Россия;

²ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева», 197376, Санкт-Петербург, Россия;

³ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии Департамента здравоохранения г. Москвы», 119071, г. Москва, Россия;

⁴ООО «Интерлабсервис», 115035, Москва, Россия

Респираторно-вирусные инфекции являются основной причиной недееспособности экономически активного населения, нередко приводят к тяжелым осложнениям и летальным исходам, особенно у новорожденных детей, пожилых и иммунокомпрометированных лиц. Свой вклад в снижение заболеваемости и смертности от респираторных инфекций может внести своевременная и точная диагностика возбудителей ОРВИ. Цель данного исследования – разработка и валидация наборов реагентов для одновременного выявления 13-ти основных возбудителей респираторно-вирусных инфекций, совместно с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот. Были протестированы стандартные образцы с известной концентрацией для определения аналитических характеристик набора, а также 162 образца биологического материала, содержащие возбудителей ОРВИ, из коллекции НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева в сравнении с набором RespiFinder 2Smart (PathoFinder, Нидерланды). Аналитическая чувствительность набора составила 500 копий/мл для всех выявляемых вирусов, за исключением коронавируса человека NL63, для которого минимальная выявляемая концентрация определена как 1000 копий/мл. Показано отсутствие перекрестных реакций с другими микроорганизмами и вирусами, обнаруживаемыми в дыхательных путях, а также с ДНК человека. При использовании набора сравнения RespiFinder 2Smart, наилучшая сходимость показана для аденовируса и метанеумовируса (коэффициент каппа Коэна больше 0,81). Наименьшая сходимость результатов – у риновируса (умеренное согласие, коэффициент каппа Коэна 0,57). При этом дискордантные образцы были положительны в тестируемом наборе и отрицательны в RespiFinder 2Smart. Таким образом, разработанный набор «АмплиПрайм ОРВИ-комплекс» показал высокую чувствительность и специфичность относительно выявляемых патогенов, хорошую сходимость результатов с набором сравнения, а также небольшое время, затрачиваемое на полный цикл анализа. Ключевые слова: острые респираторно-вирусные инфекции; полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Дмитрюкова М.Ю., Малтызова М.И., Голод А.А., Комиссарова К.С., Сенина М.Е., Гуштин А.Е. Валидация набора реагентов для одновременного выявления 13-ти возбудителей острых респираторно-вирусных инфекций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12): 769-774. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-769-774>

Для корреспонденции: Дмитрюкова Марина Юрьевна, канд. биол. наук, руководитель отдела разработки новой продукции ООО «НекстБио»; e-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 25.09.2023

Принята к печати 30.10.2023

Опубликовано 10.12.2023

Dmitryukova M.Yu.¹, Maltysova M.I.¹, Golod A.A.¹, Komissarova K.S.², Senina M.E.^{1,3}, Guschin A.E.^{3,4}

VALIDATION OF THE REAGENT KIT FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF 13 MAIN VIRAL RESPIRATORY PATHOGENS

¹“NextBio” LLC, 111394, Moscow, Russia;

² Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, St. Petersburg, Russia;

³ Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, 119071, Moscow, Russia;

⁴“Interlabservice” LLC, 115035, Moscow, Russia

Respiratory infections are the main cause of temporary inability of economically active population, and increase risk of complications and fatal outcome in newborn, elderly and immunocompromise people. Appropriate and precise detection of respiratory pathogens should reduce morbidity and mortality of acute respiratory infections. The aim of this study was to develop and validate the reagent kit for simultaneous detection of 13 main respiratory pathogens combined with automatic instruments for nucleic acids purification. The quantified standardize control samples were tested for analytical characteristics, and 162 biological samples containing respiratory pathogens from Smorodintsev Research Institute of Influenza collection of were tested against RespiFinder 2Smart. Analytical sensitivity was 500 copies/ml for all identified pathogens except human coronavirus NL63 (1000 copies/ml). No cross-reaction with microorganisms and viruses from respiratory tract, as well as human DNA was shown. The highest agreement between tested kit and RespiFinder was shown for adenovirus and metapneumovirus detection (Cohen's kappa greater than 0.81), and lowest – for rhinovirus (mild agreement, Cohen's kappa 0.57). In last case discordant result were positive with tested kit and negative with RespiFinder kit.

Thus, the developed kit has shown high analytical sensitivity and specificity, good agreement between results obtained by tested and comparison kits, as well as short time for full analysis cycle.

Key words: acute respiratory infection; polymerase chain reaction.

For citation: Dmitryukova M.Yu., Maltysova M.I., Golod A.A., Komissarova K.S., Senina M.E., Guschin A.E. Validation of the reagent kit for simultaneous detection of 13 main viral respiratory pathogens. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12):769-774 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-769-774>

For correspondence: Dmitryukova M.Yu., PhD, e-mail: m.dmitryukova@nextbio.ru

Information about authors:

Dmitryukova M.Y., <https://orcid.org/0000-0001-6050-2393>;
Maltysova M.I., <https://orcid.org/0000-0003-3102-4972>;
Golod A.A. <https://orcid.org/0000-0002-4058-2514>;
Komussarova K.S. <https://orcid.org/0000-0002-1465-5548>;
Senina M.E. <https://orcid.org/0000-0002-8185-4459>;
Guschin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-0399-1167>.

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

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

Received 25.09.2023

Accepted 30.10.2023

Published 10.12.2023

Введение. Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются самыми распространенными причинами недееспособности населения. Экономический ущерб в 2022 году от острых инфекций верхних дыхательных путей множественной и неуточненной локализации, без учета COVID-19, составил 935 млрд. рублей, или 93% всей экономической значимости инфекционных заболеваний [1].

К наиболее частым возбудителям ОРВИ относятся риновирус, респираторно-синцитиальный вирус (по новой классификации – ортопневмовирус человека), метапневмовирус, вирусы парагриппа 1-4-го типа, коронавирусы человека, аденовирус и бокавирусы человека.

В большинстве случаев респираторные инфекции ограничиваются поражением верхних дыхательных путей и проходят самостоятельно, но в некоторых случаях способны прогрессировать с поражением нижних дыхательных путей и развитием бронхолита, пневмонии. В частности, вирусы парагриппа 1, 2 и 3-го типов являются основной причиной крупа, бронхолита и пневмонии у младенцев и маленьких детей, и являются одной из главных причин госпитализации детей в возрасте до пяти лет [2]. Риновирусы редко вызывают осложнения, однако более 50% случаев ОРВИ у взрослых ассоциированы именно с ними [3].

Респираторные инфекции в раннем возрасте повышают риск развития астмы у предрасположенных лиц, и в дальнейшем ее обострение [4]. В первую очередь, это характерно для респираторно-синцитиального вируса [5], метапневмовируса [6] и риновируса [7]. К осложнениям со стороны сердечно-сосудистой системы могут приводить все респираторные вирусы, за счет развития гипоксии и вызванной ей легочной гипертензии, либо поражение носит специфический характер, в частности, аденовирус является потенциальным триггером миокардита и кардиомиопатии, за счет репликации в кардиомиоцитах [8]. Есть сообщения о метапневмовирус-ассоциированном поражении ЦНС [9].

Молекулярные методы выявления возбудителей инфекционных болезней являются наиболее быстрыми и дешевыми для определения этиологии заболевания.

Цель работы - разработка набора реагентов для выявления основных возбудителей ОРВИ в биологическом материале методом ОТ-ПЦР совместно с полным циклом автоматической экстракции и приготовлением ПЦР смеси, а также его валидация относительно набора RespiFinder 2Smart (PathoFinder, Нидерланды).

Материал и методы. Амплификация с обратной транскрипцией. Набор реагентов «Амплипрайм ОРВИ-комплекс» предназначен для одновременного выявления 13-ти распространенных возбудителей инфекций респираторного тракта – вирусов парагриппа 1 - 4 типов, риновируса, респираторно-синцитиального вируса, коронавирусов 229E, NL63, HKU1 и OC43, метапневмовируса, аденовируса и бокавируса. Гены – мишени представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Мишени для выявления 13-ти возбудителей ОРВИ

Возбудитель	Ген-мишень
Вирусы парагриппа 1 - 4 типа, респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы 229E, NL63, OC43	Ген нуклеокапсида (N gene)
Коронавирус HKU1	Ген РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp gene)
Риновирус	Сайт прикрепления рибосомы (IRES)
Метапневмовирус	Ген белка слияния (F gene)
Аденовирус	Ген гексона (H gene)
Бокавирус	Левый нетранслируемый участок (5'UTR)

Определение аналитической чувствительности, повторяемости и воспроизводимости. Аналитические характеристики набора определяли с использованием стандартных образцов предприятия (СОП), представляющих собой модифицированные РНК-содержащие ms2-фаги, несущие фрагменты генома выявляемых вирусов (парагриппа 1-4-го типов, риновируса, респираторно-синцитиального вируса, коронавирусов 229E,

NL63, HKU1 и OC43, метапневмовируса), а также ДНК-содержащие плазмиды, несущие фрагмент генома бокавируса и аденовируса. Стандартные образцы разводили в биологическом материале (мазки из рото- и носоглотки), забранном в транспортную среду для респираторных мазков (АмплиПрайм® ТСР, ООО «НекстБио», Россия, РУ № ФСР 2012/14200). Биологический материал не содержал РНК выявляемых вирусов.

Для определения чувствительности были протестированы разведения СОП в концентрации 5000 копий/мл в пяти повторах, 1000 и 500 копий/мл в 20 повторах каждого возбудителя.

Для определения повторяемости и воспроизводимости результатов анализа стандартные образцы были разведены до концентрации 1×10^4 копий/мл в биологическом материале, не содержащем нуклеиновые кислоты выявляемых патогенов. Полученные модельные образцы были протестированы в 16 повторах для определения повторяемости на одном приборе в один день, и 32 повтора в разные дни и на разных приборах.

Экстракция была проведена с использованием набора для экстракции нуклеиновых кислот «Магно-Прайм® ФАСТ-Р» (ООО «НекстБио», Россия), методика с использованием автоматической станции для экстракции нуклеиновых кислот Microlab STARlet (Hamilton Bonaduz AG, Швейцария, рег. удостоверение № РЗН 2018/6981 от 05.04.2018).

Концентрация ms2-фагов и плазмид были определены методом цифровой ПЦР с использованием прибора QuantStudio 3D (Thermo Scientific, США).

Определение аналитической специфичности и

влияния интерферирующих веществ. Для определение специфичности выявления заявленных вирусов, был протестирован биологический материал (мазки из рото- и носоглотки), содержащий следующие патогены: вирусы гриппа А серотипы H5N1, H3N2, H0N1, H2N2, H7N9, вирус гриппа В (линии Виктория и Ямагата), *P. aeruginosa*, *M. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *H. influenza*, *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*

Для оценки влияния интерферирующих веществ в исследуемые образцы были внесены муцин (SigmaAldrich, США) в концентрации 0,23 мг/100 мкл, гемоглобин (SigmaAldrich, США), 0,20 ммоль / 100 мкл, мирамистин (Инфамед К, Россия), 0,001% действующего вещества в 100 мкл), хлоргексидин (Биоген НПЦ, Россия), 0,5% действующего вещества в 100 мкл.

Набор сравнения. В качестве набора сравнения использован набор реагентов RespiFinder 2Smart (PathoFinder, Нидерланды). Набор позволяет выявлять 20 вирусных патогенов: вирусы гриппа А (с типированием пандемического варианта 2009 года H1N1pdm09), гриппа В, респираторно-синцитиальный вирус типы А и В, метапневмовирус, риновирус (энтеровирус), аденовирус, вирусы парагриппа 1-4 типов, бокавирус, коронавирусы человека NL63/HKU1 (без типирования), коронавирусы OC43, 229E, SARS-CoV-2 и MERS. Кроме того, в панель включены 4 бактериальных возбудителя – *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *B. pertussis*. Метод основан на анализе кривой плавления ампликонов, полученных в ходе ПЦР с обратной транскрипцией.

Было протестировано 162 образца, содержащие воз-

Таблица 2

Определение аналитической чувствительности

Мишень	5000 копий/мл, 5 повторов		1000 копий/мл, 20 повторов		500 копий/мл, 20 повторов	
	Положительных	Среднее Ct (95%ДИ)	Положительных	Среднее Ct (95%ДИ)	Положительных	Среднее Ct (95%ДИ)
Вирус парагриппа 1-го типа	5	31,50 (31,19-31,81)	20	33,95 (33,77-34,13)	20	35,06 (34,85-35,27)
Вирус парагриппа 2-го типа	5	31,80 (31,60-32,00)	20	34,40 (34,28-34,52)	20	35,43 (35,23-35,62)
Вирус парагриппа 3-го типа	5	33,42 (33,23-33,62)	20	36,43 (35,87-36,41)	20	37,82 (37,47-38,18)
Вирус парагриппа 4-го типа	5	31,08 (30,96-31,19)	20	33,54 (33,42-33,65)	20	34,45 (34,28-34,63)
Респираторно-синцитиальный вирус (ортопневмовирус)	5	30,81 (30,40-31,22)	20	32,93 (32,30-33,56)	20	34,23 (33,37-35,09)
Риновирус	5	33,46 (33,03-33,88)	20	35,98 (35,58-36,38)	18	38,83 (38,43-39,23)
Коронавирус 229E	5	34,33 (34,03-34,62)	20	36,85 (36,63-37,06)	20	37,94 (37,66-38,22)
Коронавирус NL63	5	36,50 (36,09-36,90)	18	38,80 (37,93-39,63)	13	39,25 (38,55-39,95)
Коронавирус HKU1	5	33,63 (33,53-33,72)	20	36,40 (36,22-36,59)	20	37,41 (37,17-37,64)
Коронавирус OC43	5	34,36 (33,89-34,82)	20	36,85 (36,49-37,21)	19	37,85 (37,23-37,93)
Метапневмовирус	5	31,62 (31,34-31,90)	20	34,08 (31,00-34,15)	20	35,14 (34,97-35,31)
Аденовирус	5	31,50 (31,40-31,59)	20	34,05 (33,79-34,31)	20	35,10 (34,69-35,50)
Бокавирус	5	30,60 (30,54-30,66)	20	32,84 (32,67-33,00)	20	34,12 (33,86-34,37)

будителей ОРВИ из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, г. Санкт-Петербург. Образцы собирались в разное время и хранились при температуре -80 °С. Тестирование проводили параллельно двумя наборами, согласно инструкции по применению.

Этические аспекты. Биологический материал, использованный для проведения работы, был получен после значимых исследований. Дизайн исследования не был связан с риском для пациентов, и не оказывал влияние на их права и благополучие, способ получения материала не позволял провести идентификацию лица, от которого данный материал был получен. Исходя из

этого, одобрение этического комитета не требовалось.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием ПО Excel (пакета MS Office, Microsoft, США).

Результаты. Аналитические характеристики набора были определены с использованием модельных образцов, представляющими собой разведения искусственных конструкций, содержащих фрагменты геномов выявляемых вирусов, в негативном биологическом материале. Результаты определения чувствительности набора представлены в табл. 2, повторяемости и воспроизводимости – в табл. 3.

Таблица 3

Определение повторяемости и воспроизводимости амплификации стандартного образца в концентрации 10⁴ копий/мл

Мишень	Повторяемость, 16 повторов тестирования, среднее значение Ct (95%ДИ)		Воспроизводимость, 32 повторов тестирования, среднее значение Ct (95%ДИ)	
Вирус парагриппа 1-го типа	31,24	(30,51-31,97)	31,44	(31,01-31,87)
Вирус парагриппа 2-го типа	33,12	(32,78-33,46)	32,95	(32,78-33,13)
Вирус парагриппа 3-го типа	33,04	(32,95-33,14)	33,17	(33,08-33,26)
Вирус парагриппа 4-го типа	30,51	(30,39-30,62)	30,61	(30,52-30,69)
Респираторно-синцитиальный вирус (ортопневмовирус)	30,40	(30,19-30,60)	30,21	(30,06-30,36)
Риновирус	32,51	(32,30-32,71)	32,40	(32,28-32,53)
Коронавирус 229E	33,20	(33,11-33,28)	33,60	(33,44-33,76)
Коронавирус NL63	34,76	(34,62-35,08)	34,52	(34,42-34,63)
Коронавирус HKU1	32,30	(32,03-32,08)	32,43	(32,26-32,60)
Коронавирус OC43	33,71	(33,49-33,93)	33,85	(33,70-33,00)
Метапневмовирус	30,91	(30,75-31,06)	31,02	(30,90-31,13)
Аденовирус	31,09	(30,98-31,20)	31,14	(31,04-31,24)
Бокавирус	30,25	(30,12-30,38)	30,28	(30,19-30,38)

Таблица 4

Коэффициент каппа Коэна при тестировании двумя наборами

Возбудитель	Количество положительных образцов	% Совпавших результатов	Коэффициент каппа Коэна*
Вирусы парагриппа	21	96,36	0,81
Риновирус	17	95,13	0,57
Респираторно-синцитиальный вирус (ортопневмовирус)	15	96,94	0,78
Коронавирусы человека	32	92,65	0,72
Аденовирус	31	96,96	0,89
Метапневмовирус	30	95,67	0,84
Бокавирус	40	88,98	0,67

Примечание. * - Интерпретация значений коэффициента принята следующая [10]:

0,00 - Согласие отсутствует;

<0,20 - Согласие почти отсутствует;

0,21 – 0,40 - Посредственное согласие;

0,41 – 0,60 - Умеренное согласие;

0,61 – 0,80 - Существенное согласие;

0,81 – 1,00 - Почти отличное согласие.

Сравнение с набором реагентов RespiFinder 2Smart. Было исследовано 162 образца из коллекции НИИ гриппа им. АА Смородинцева. Чаще всего выявлялся бокавирус (40 образцов, 24,7%), преимущественно в виде коинфекции с аденовирусом. Чуть реже обнаруживались коронавирусы (без типирования) и аденовирус (19,8 и 19,1% соответственно).

Для оценки согласия результатов выявления респираторных патогенов двумя наборами был рассчитан коэффициент каппа Коэна. Коэффициент Каппа Коэна (Cohen's kappa) позволяет оценивать согласие результатов двух классификаций для категориальных переменных [10]. Полученные данные представлены в табл. 4.

Обсуждение. В настоящее время молекулярные методы обнаружения патогенов человека и животных получили широкое распространение, и заменили многие диагностические методы, такие как культуры клеток и выявление антигенов. Особое значение молекулярные методы имеют для выявления возбудителей инфекций верхних и нижних дыхательных путей, поскольку позволяют одновременно выявлять значительное количество патогенов, дифференциальная диагностика которых по симптоматическим признакам затруднена.

Цель нашей работы заключалась в разработке и валидации набора реагентов для выявления 13-ти основных возбудителей острых респираторно-вирусных инфекций.

Аналитическая чувствительность набора позволяет оценивать минимальное количество возбудителя, который можно обнаружить в биологическом материале. В целом, хотя целесообразность определения единичных копий респираторных вирусов часто ставится под сомнение, вирусная нагрузка более 1000 копий/мл может быть ассоциирована с развитием симптомов и вероятностью осложнений, что было показано для риновируса [11, 12], вирусов парагриппы [13], респираторно-синцитиального вируса [14], метапневмовируса [15]. При этом, зависимости тяжести течения концентрации обнаружено не было. Чувствительность выявления вирусных патогенов разрабатываемым набором составила 500 копий/мл, за исключением коронавируса человека NL63, для которого минимальная выявляемая концентрация была 1000 копий/мл, что достаточно для выявления клинически значимых концентраций.

Аналитическая специфичность, в свою очередь, является показателем наличия перекрестных реакций с микроорганизмами и вирусами, присутствие которых можно ожидать в исследуемом биологическом материале, а также с ДНК человека. Эксперименты показали отсутствие перекрестной реакции с наиболее распространёнными респираторными патогенами вирусной природы и бактериальной природы. Кроме того, внесение наиболее часто используемых лекарственных препаратов и интерферирующих веществ, которые могут попасть в биологический материал при его взятии, не оказало влияния на получаемый результат.

Важным этапом оценки работоспособности нового набора реагентов является его сравнение с реагентами других производителей. В данной работе в качестве набора сравнения использован набор реагентов RespiFinder 2Smart (PathoFinder, Нидерланды). Набор имеет европейский сертификат качества (CE, Conformité Européenne), широко применяется на территории Европы и мира. Набор имеет хорошие аналитические характеристики (16), однако отмечается, что чувствительность набора относительно риновируса, вирусов парагриппа 1 и 3-го типа, метапневмовируса и респираторно-синцитиального вируса была ниже, чем у наборов сравнения (моноплексных наборов и набора реагентов xTAG Respiratory Virus Panel Fast Assay производства Abbot Molecular, США) [17, 18].

Согласие результатов выявления патогенов двумя наборами различалась от возбудителя к возбудителю. Наибольшее согласие (то есть, совпадение большинства результатов) наблюдалось для аденовируса и метапневмовируса (коэффициент каппа Коэна больше

0,81). Наименьшее – для риновируса (коэффициент каппа Коэна 0,57, умеренное согласие). При этом дискордантные образцы были положительны в наборе АмплиПрайм и отрицательны в RespiFinder.

Не менее важной характеристикой теста является время проведения исследования. Наиболее затратным периодом при тестировании большого количества образцов оказывается этап экстракции, который можно сократить с использованием автоматических станций для экстракции. Затрачиваемое время на полный цикл анализа при использовании станции Hamilton составило 2,5 часа, из них 20 минут занимает этап экстракции, 2 часа – приготовление ПЦР-смеси и амплификация. Время анализа RespiFinder 2Smart составляет после этапа экстракции те же 2,5 часа, вместе с этапом выделения нуклеиновых кислот – 3 – 3,5 часа.

Выводы. В ходе проведенной работы был разработан и валидирован набор реагентов для молекулярной диагностики 13-ти основных возбудителей респираторных инфекций. Набор показал высокую чувствительность и специфичность в отношении выявления заявленных вирусов, хорошую сходимость результатов при сравнении с набором реагентов для выявления возбудителей ОРВИ RespiFinder 2Smart, а также короткое время, необходимое для проведения полного цикла анализа.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1, 3, 5, 6, 9, 11-18 см. REFERENCES)

- Халиуллина С.В., Анохин В.А., Демиденко К.Ю., Нягашкина Е.В., Халиуллина К.Р., Покровская Е.М., Хаертынов Х.С. Этимологические особенности современных острых респираторных вирусных инфекций у детей раннего возраста, госпитализированных в отделение интенсивной терапии. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2018; 63(4): 101–7.
- Потапова Н.Л. Жизнеугрожающая бронхиальная астма у детей: от предикторов до прогноза. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2021; 66(2): 29–34.
- Хаитов Р.М., Моноциты, Р-лимфоциты и дендритные клетки при риновирус-индуцированном обострении бронхиальной астмы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18(1): 228–36.
- Ишмурзин Г.П., Серебрякова О.А., Сюзев К.Н., Долганова Д.А., Гайнуллина А.Х. Осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы при респираторных вирусных инфекциях. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2022; 37(4): 31–7.
- Красько О.В. Статистический анализ данных в медицинских исследованиях: в 2 частях. Часть I. Минск: Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова; 2014.

REFERENCES

- <https://www.rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/b50/t4kqksh4b12a2iwiwnha29922vu7naki5/GD-SEB.pdf>
- Khaliullina S.V., Anokhin V.A., Demidenko K.Yu., Nyagashkina E.V., Khaliullina K.R., Pokrovskaya E.M., Khaertynov Kh.S. Etymological peculiarities of modern acute respiratory viral infections in children of early age, hospitalized to the intensive care unit. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii*. 2018; 63(4): 101–7. (in Russian)
- Burk M., El-Kersh K., Saad M., Wiemken T., Ramirez J., Cavallazzi R. Viral infection in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. Rev.* 2016; 25(140):178–88.
- Potapova N.L. Life-threatening bronchial asthma in children: from predictors to prognosis. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii*. 2021; 66(2): 29–34. (in Russian)
- Hartert T.V., Wu P., Brunwasser S.M. Respiratory syncytial virus and asthma: untying the Gordian knot. *Lancet Respir. Med.* 2021; 9(10):1092–4.

6. Rudd P.A., Thomas B.J., Zaid A., MacDonald M., Kan-O K., Rolph M.S. et al. Role of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in asthma exacerbations: where are we now? *Clin. Sci. (London)*. 2017; 131(14):1713-21.
7. Khaitov R.M., Nikonova A.A., Khaitov M.R. Monocytes, B-cells and dendritic cells during rhinovirus-induced asthma exacerbation. *Byulleten`Sibirskoy meditsiny*. 2019; 18(1):228-36. (in Russian)
8. Ishmurzin G.P., Serebryakova O.A., Syuzev K.N., Dolganova D.A., Gainullina A.K. Cardiovascular complications of respiratory viral infections. *Sibirskiy zhurnal klinicheskoy I eksperimental'noy meditsiny*. 2022; 37(4):31-7. (in Russian)
9. Arnold J.C., Singh K.K., Milder E., Spector S.A., Sawyer M.H., Gavali S., Glaser S. Human metapneumovirus associated with central nervous system infection in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009; 28(12):1057-60.
10. Kras'ko O.V. Statistical data analysis in medical studies: in 2 parts. [Statisticheskiy analiz dannykh v meditsinskikh issledovaniyakh. Chast' 2]. Minsk: Mezhdunarodnyi gosudarstvennyi ekologicheskiy institut imeni A.D. Sakharov; 2014. (in Russian)
11. Jacobs S.E., Lamson D.M., St. George K., Walsh T.J. Human Rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26(1): 135-162.
12. Granados A., Goodall E.C., Luinstra K., Smieja M., Mahony J. Comparison of asymptomatic and symptomatic rhinovirus infections in university students: incidence, species diversity, and viral load. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 82(4):292-6.
13. Seo S., Xie H., Leisenring W.M., Kuypers J.M., Sahoo F.T., Goyal S. et al. Risk Factors for Parainfluenza Virus Lower Respiratory Tract Disease after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2019; 25(1):163-71.
14. Borg I., Rohde G., Löseke S., Bittscheidt J., Schultze-Werninghaus G., Stephan V., Bufe A. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. *European Respiratory Journal*. 2003; 21: 944-51.
15. Oong X.Y., Chook J.B., Ng K.T., Chow W.Z., Chan K.G., Hanafi N.S. et al. The role of human Metapneumovirus genetic diversity and nasopharyngeal viral load on symptom severity in adults. *Virol. J.* 2018; 15:91.
16. Dabisch-Ruthe M., Vollmer T., Adams O., Knabbe C., Dreier J. Comparison of three multiplex PCR assays for the detection of respiratory viral infections: evaluation of xTAG respiratory virus panel fast assay, RespiFinder 19 assay and RespiFinder SMART 22 assay. *BMC Infectious Diseases*. 2012; 12:163.
17. Liu G.S., Niu P.H., Zhao S.C., Lu R.J., Tan W.J. Detection of six common human paramyxoviruses in patients with acute febrile respiratory symptoms using a novel multiplex real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2019; 91(4):564-9.
18. Beckmann C., Hirsch H.H. Comparing Luminex NxTAG-Respiratory Pathogen Panel and RespiFinder-22 for multiplex detection of respiratory pathogens. *J. Med. Virol.* 2016; 88(8):1319-24.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Жигалева О.Н.¹, Марданлы С.Г.^{1,2}, Гашенко Т.Ю.^{1,2}, Ермолаев И.И.^{1,2}

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ПЦР ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГТТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

Вирус гепатита В (HBV) наряду с другими вирусными гепатитами является распространенным возбудителем и опасным инфекционным агентом среди тех, которые вызывают заболевания печени у людей, он определен как одна из основных глобальных проблем здравоохранения не только в России, Европе, но и во всем мире. С момента открытия вируса гепатита В было инфицировано примерно 400 миллионов человек во всем мире; цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома, основные последствия хронического гепатита В, приводящие к более полумиллиона смертей в год. В 2016 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) поставила амбициозную цель ликвидировать вирусный гепатит, как основную глобальную угрозу общественному здравоохранению к 2030 году. Виремия HBV является важнейшим фактором риска прогрессирования хронической HBV-инфекции, в связи с этим направлены поиски на новые методы обнаружения вируса гепатита В наряду с хорошо зарекомендовавшими себя иммунологическими методами. Качественное выявление ДНК HBV в крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало важнейшим инструментом в оценке и лечении инфекции. В статье приводится описание разработки набора реагентов для выявления вируса HBV методом ПЦР. Диагностическая чувствительность и специфичность разрабатываемого набора составляет 100 %, такие результаты были получены на пробах от 200 пациентов с подтвержденным и отрицательным результатом по HBV. По анализу литературных данных показано, что скорость мутаций в геноме для HBV выше, чем для большинства ДНК-вирусов. В связи с этим областью для посадки праймеров послужил ген POL, после выравнивания последовательностей генотипов HBV, в том числе с приобретенными мутациями. Включенный в набор эндогенный внутренний контроль, нацеленный на ген человека (бета-глобулин), позволит судить о реальном наличии клеток человека в образце и правильности проведения этапа пробоподготовки.

Ключевые слова: вирус гепатита В (HBV); полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ); ПКО; ВКО; праймеры; детекция; разработка набора.

Для цитирования: Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов с применением метода ПЦР для качественной идентификации ДНК вируса гепатита В. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (12):775-779. DOI: <https://doi.org/10.51620.0869-2084-2023-68-12-775-779>

Для корреспонденции: Жигалева Ольга Николаевна, руководитель научно-производственного отдела НПО ПЦР ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: jigon@mail.ru

Финансирование. Исследование финансировалось ЗАО "ЭКОлаб".

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.11.2023

Принята к печати 30.11.2023

Опубликовано 10.12.2023

Zhigaleva O.N.1, Mardanly S.G.1,2, Gashenko T.Yu.1,2, Ermolaev I.I.1,2

DEVELOPMENT OF A PCR REAGENT KIT FOR QUALITATIVE IDENTIFICATION OF HEPATITIS B VIRUS DNA

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

Hepatitis B virus (HBV) along with other viral hepatitis is a common pathogen and dangerous infectious agent among those that cause liver disease in humans, it is identified as one of the major global health problems not only in Russia, Europe, but also worldwide. Since its discovery, the hepatitis B virus has infected approximately 400 million people worldwide; cirrhosis and hepatocellular carcinoma, the main consequences of chronic hepatitis B, leading to more than half a million deaths per year. In 2016, the World Health Organization (WHO) set an ambitious goal to eliminate viral hepatitis as a major global public health threat by 2030. HBV viremia is a critical risk factor for the progression of chronic HBV infection, and new methods for detecting hepatitis B virus, alongside well-established immunological methods, are being sought. Qualitative detection of HBV DNA in blood by polymerase chain reaction (PCR) has become an essential tool in evaluation and treatment of infection. This article describes the development of a reagent kit for the detection of HBV by PCR. Diagnostic sensitivity and specificity of the developed kit is 100%, these results were obtained on samples from 200 patients with confirmed and negative HBV results. A review of the literature shows that the mutation rate in the genome for HBV is higher than for most DNA viruses. In this regard, the POL gene was used as the region for primer seeding, after alignment of HBV genotypes, including those with acquired mutations. The endogenous internal control included in the kit, targeting the human gene (beta-globulin), will judge the actual presence of human cells in the sample and the correctness of the sample preparation step.

Key words: hepatitis B virus (HBV); real-time polymerase chain reaction (PCR-RT); PCS; IES; primers; detection; kit development.

For citation: Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I. Development of a PCR reagent kit for qualitative identification of hepatitis B virus DNA. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (12): 775-779 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-12-775-779>

For correspondence: Zhigaleva OI'ga Nikolaevna, specialist of the Innovative Development Department PCR CJSC «EKOLab»; e-mail: jigon@mail.ru

Information about authors:

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>;
Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;
Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>;
Ermolaev I.L., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>.

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

Acknowledgment. The study was funded by CJSC «EKOLab».

Received 15.11.2023

Accepted 30.11.2023

Published 10.12.2023

Введение. Гепатит В — это вирусное инфекционное заболевание, поражающее печень и протекающее в острой или хронической форме [1]. Вирус гепатита В (HBV) входит в состав семейства *Hepadnaviridae* рода *Orthohepadnavirus*.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2019 году в мире насчитывалось 296 млн. человек, живущих с хроническим гепатитом В, при этом ежегодно происходит около 1,5 млн. новых случаев инфицирования. По оценкам, в том же году от гепатита В умерло 820 000 человек, главным образом в результате цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (первичного рака печени) [2]. По статистике в России в 2020 году заболеваемость гепатитом В среди населения составила 4,7 человека на 100 000 населения, в 2021 году 4,8 человека на 100 000 населения, что почти в 2 раза меньше чем в 2019/2018 годах, где заболеваемость составляла 9,9/9,3 человека на 100 000 населения [3].

Вирус гепатита В является уникальным среди вирусных патогенов человека, поскольку он представляет собой ДНК-вирус, который реплицируется через РНК-посредник, и, таким образом, относится к ДНК- и РНК-вирусам с обратной транскрипцией [4,5]. Молекула ДНК представлена короткой нитью, которая является плюс-нитью, длинная нить ДНК минус-нитью. Длинная цепь связана с ДНК-полимеразой, которая достраивает плюс-цепь до полноценной структуры. ДНК-полимераза способствует синтезу новых цепей ДНК на матрице как ДНК, так и РНК [6].

Инфекционный вирион HBV имеет сферическую структуру с двойной оболочкой диаметром 42 нм, состоящую из липидной оболочки. Геномная структура HBV, содержащаяся внутри капсулы вируса, является одновременно компактной и сложной, при этом она способна кодировать семь различных белков, занимая всего 3,2 килобазы (кб) [6]. HBV содержит четыре открытые рамки считывания ((С (ядро), Р (полимераза), S (поверхностный антиген), Х (белок)) и семь белков (HBeAg, HBcAg, LHBs, MHBs, SHBs, полимераза, HBx)) [7]. Гетерогенность последовательностей является характерной чертой HBV. Однако в результате ограничений, связанных с перекрывающимися открытыми рамками считывания и наличием вторичных структур РНК, таких как эILON, кодируемых перекрывающимися областями, скорость мутаций в различных областях генома HBV варьируется. По оценкам, геном HBV эволюционирует со скоростью примерно от 10^{-4} до 10^{-6} нуклеотидных замен/год [8-10].

На сегодняшний день, основываясь на межгруппо-

вой дивергенции по всему геному, HBV филогенетически классифицирован на 10 генотипов, обозначенных латинскими буквами от А до J, имеющих строгое географическое распределение. Каждый генотип характеризуется также своим субгенотипом, однако, у таких генотипов как: E, G, H, I, J субгенотипов нет. В Российской Федерации доминирующими являются генотипы D (около 90% случаев) и А (около 10%), однако, на разных территориях частота генотипов может различаться [11]. Наряду с генотипом для субгенотипа также характерно четко сложившееся географическое распространение, которое может меняться в связи с миграцией населения. Такие присутствующие различия между генотипами и их субтипами имеют клиническую значимость для проведения эффективной антиретровирусной терапии [1, 12].

Диагностика и мониторинг HBV-инфекции основаны на выявлении вирусных антигенов и специфических анти-HBV-антител, а также обнаружения нуклеиновых кислот, нацеленных на геномный материал вируса. Наличие ДНК HBV в периферической крови является надежным маркером активной репликации вируса. По сравнению с иммуноанализами, обнаружение и количественная оценка ДНК HBV признаны на сегодняшний день более актуальными для диагностики инфекции, принятия терапевтических решений и оценки ответа на проводимую терапию антиретровирусными препаратами [13]. На сегодняшний день разработан ряд методов обнаружения ДНК HBV, таких как ПЦР, в том числе количественная ПЦР в режиме реального времени (qPCR-RT), петлевая изотермическая ПЦР (LAMP), амплификация по катящемуся кругу (RCA) и др. [14]. Большинство, присутствующих на рынке коммерческих наборов для выявления и количественного определения HBV в основном основаны на ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией, обладающей хорошей стабильностью, чувствительностью, специфичностью и точностью. Таким образом, высокочувствительные методы определения ДНК HBV необходимы для целей прогноза, диагностики и мониторинга лечения.

В наборах, присутствующих на рынке в качестве внутреннего контрольного образца (ВКО), используется экзогенная синтетическая конструкция. При разработке набора была реализована система с использованием эндогенного ВКО для диагностики HBV.

Цель исследования - разработать набор реагентов для качественного выявления ДНК HBV методом ПЦР в реальном времени.

Материал и методы. Для разработки набора биологический материал в количестве 200 образцов был получен от компании INVITRO (Москва). Образцы плазмы и сыворотки крови от пациентов с HBV хранились при температуре -20 °С.

Экстракция нуклеиновых кислот из сыворотки и плазмы крови проводилась с использованием набора «КовидЭК Экстракт» - РУ № РЗН 2022/18013 от 17.08.2022 (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) в соответствии с протоколом [15].

Внутренний контрольный образец (ВКО) в данном наборе представляет собой ген *β-глобулин*. Детекция ВКО в ходе реакции амплификации свидетельствует о наличии в исследуемом образце клинического материала, а также позволяет оценить правильность и точность проведения анализа.

Положительный контрольный образец (ПКО) содержит плазмиду (pUC19) с синтетическим фрагментом гена ДНК HBV в 1X TE буфере.

Амплификация, детекция и обработка результатов оценивалась с помощью амплификатора Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель ООО «Био-Рад Лаб-оратории» (США).

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в базе данных GenBank был проведен с помощью программы VectorNTI Suite 9.0.0 (AlignX). Праймеры были выбраны после анализа литературных данных, зонды были разработаны с использованием программного обеспечения Primer Express (Applied Biosystems, США). Для предсказания поведения подобранных праймеров была использована программа AmplifX (CNRS, Aix-

Marseille Université). Специфичность подобранных праймеров на ДНК HBV определялась с помощью анализа *in silico* с использованием программы BLAST online [16].

Оценка аналитической надёжности с определением специфичности и чувствительности проведена согласно ГОСТ Р 53079.1-2008 и ГОСТ Р 53022.2-2008 [17].

Результаты и обсуждение. Был разработан набор «ГепаЭК В» для выявления ДНК HBV в клиническом материале методом ПЦР в режиме реального времени. Условия проведения ПЦР подобраны экспериментально.

При разработке набора метод проведения исследований состоял из нескольких этапов: выделение ДНК HBV, реакции амплификации с одновременной детекцией результата в режиме «реального времени».

Экстрагирование ДНК проводилось из 250 мкл образца. В каждую постановку амплификации помимо исследуемых образцов (N) входили 2 контрольных образца: отрицательный контроль ПЦР (ОКО) и положительный контроль ПЦР (ПКО).

Конечный объем смеси для амплификации составлял 25 мкл, включая 20 мкл предварительной смеси для ПЦР (Master mix) и 5 мкл концентрированного образца ДНК.

Для создания праймеров был выбран ген (*POL*) вируса HBV. Последовательности праймеров и зондов, использованных при разработке набора, представлены в таблице. Праймеры были подобраны после изучение литературных данных [18-20].

Полное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено для поиска консервативных участков в последовательностях HBV с использованием биотехнологических программ.

Используемые праймеры

Мишень	Ген	Последовательность (5'-3')	Ориентация праймера
HBV	<i>POL</i>	GTAGTCTGCATTGCGTTTTATCA	Прямой
		GACAGTTCCGGCAACATACAATT	Обратный
		GGAGGCGGAGCTGGCAA	Флуоресцирующий зонд
Homo sapiens	<i>β-глобулин</i>	ATCTTGGCTCACTGCAACCT	Прямой
		CCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC	Обратный
		ACAGCGCGTTGTCTATGTG	Флуоресцирующий зонд

Праймеры были разработаны после определения условий реакции, таких как GC%, температура плавления (Tm), длина праймера и их взаимосвязи между собой.

Контролем проводимых манипуляций по обнаружению вируса методом ПЦР стало использование гена самого человека [21].

Выравнивание 200 нуклеотидных последовательностей гена *β-глобулин*, взятых в базе данных GenBank, показало консервативные участки для расчета олигонуклеотидов [22].

Включенный в тест ген *β-глобулин* человека в качестве внутреннего контроля помогал оценивать качество проведенных исследований и достоверность результатов. Наличие эндогенного ВКО позволяет контролировать ход амплификации в каждой пробирке с реакционной смесью, позволяя эффективно оценивать каждый этап проведения анализа, а также позволяет оценить качество хранения пробы, что не позволяет сделать эк-

зогенный ВКО (рис. 1, а, б).

Для эндогенного ВКО у каждой пробы наблюдается свой выход на графике с различным уровнем флуоресценции (RFU), для синтетической конструкции наблюдается выход из одной точки, в большей части с одинаковым для всех проб (RFU).

Амплификация и детекция проводилась как отдельно для выявления HBV по одному каналу (моноплексное выявление), так и одновременно выявлялся HBV и ген человека (ВКО) по двум каналам (мультиплексное выявление) для оценки возможности конкуренции между каналами для ВКО и спецификации.

Результаты сравнительной детекции HBV + ген человека и HBV представлены на рис. 2, а, б.

Конкуренции между каналами не выявлено. Все результаты по выявлению положительных и отрицательных проб совпали между разрабатываемым набором и коммерческим набором сравнения.

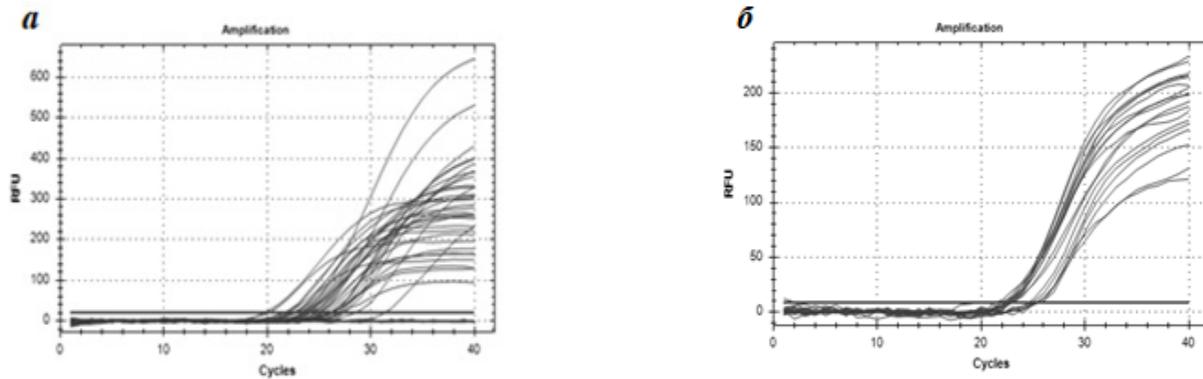


Рис. 1. Результаты сравнительной детекции эндогенного ВКО и синтетической конструкции ВКО.

а - результаты детекции эндогенного ВКО; б - результаты детекции синтетической конструкции ВКО. Здесь и на рис. 2: по оси абсцисс - количество циклов (Cycles), по оси ординат - уровень флуоресценции (RFU).

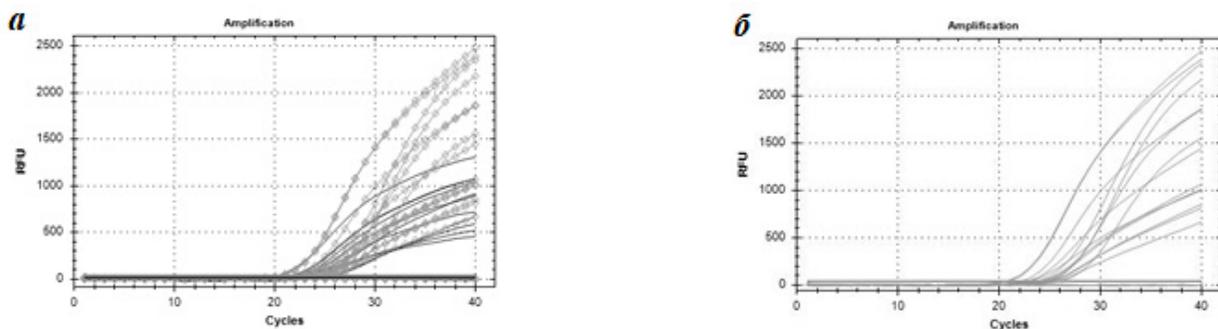


Рис. 2. Результаты сравнительной детекции HBV + ген человека и HBV.

а - результаты детекции по двум каналам в ПЦР в одной пробирке (HBV + эндогенный ВКО). Кривые с ромбами – выявление ДНК HBV (специфика), кривые без обозначений – выявление ДНК гена человека (ВКО); б - результаты детекции по одному каналу в ПЦР в одной пробирке (HBV).

Специфичность набора «ГепАЭК В» обеспечивается выбором специфических праймеров и зондов. Это также обеспечивается жесткими условиями реакции, праймеры и зонды были подвергнуты обработке на предмет возможной гомологии со всеми последовательностями, опубликованными в GenBank. Было установлено, что праймеры и зонды очень специфичны для последовательностей HBV. Специфичность набора оценивалась на панели нуклеиновых кислот других вирусов: РНК вирусов HCV, HAV, HDV, HGV, SARS-CoV-2, HIV, ДНК вирусов EBV, HCMV. Все результаты были отрицательными, показывая, что ни один из этих образцов не вступал в перекрестную реакцию с реакционной системой определения ВГС, тем самым подтверждая ее специфичность, которая составила 100 %.

Для определения чувствительности была создана серия разведений от 10^5 МЕ/мл до 10^1 МЕ/мл HBV с использованием набора «ГепАЭК В». Анализ был проведен в трех параллелях, на 100 положительных пробах с HBV. Предел обнаружения для каждой проводимой параллели составил 6×10^2 МЕ/мл. Это означает, что с вероятностью 100 % будет обнаружено 6×10^2 МЕ/мл.

Повторяемость и воспроизводимость определения ДНК HBV были установлены путем тестирования положительных и отрицательных образцов крови и плазмы крови.

Условия повторяемости включали: тестирование в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени.

Условия воспроизводимости – тестирование в разных лабораториях, разными операторами, в разные дни, на разных приборах, разных серий набора реагентов. Процедура проводилась двумя разными операторами с двумя разными наборами одной серии в разные дни.

Таким образом, воспроизводимость и повторяемость работоспособности набора реагентов составляет 100 %.

Заключение. Разрабатываемый набор реагентов для анализа методом ПЦР в реальном времени представляет собой быстрый и высокоспецифичный набор для выявления вируса HBV в крови. В сравнении с традиционными иммунологическими методами, ПЦР в реальном времени позволит снизить вероятность выдачи ложноотрицательных результатов. Постоянный пересмотр и анализ на возможные мутации в гене *POL* обеспечит работоспособность набора реагентов. Выявление вируса в крови позволит своевременно проводить терапию лекарствами, проводить скрининг донорской крови и способствует уменьшению распространения HBV. Включенный в набор эндогенный ВКО повысит точность проводимого анализа ПЦР.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-10, 10-14, 16, 18-20, 22 с.м. REFERENCES)

1. Рубрикатор клинических рекомендаций (Острый гепатит В (ГВ) у взрослых); 2023. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/672_1 (2 мая 2023 г.).
2. Всемирная организация здравоохранения (Гепатит В); 2023. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/>

- hepatitis-b (2 мая 2023 г.).
3. Федеральная служба государственной статистики (Росстат); 2023. Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/search?q=заболеваемость+гепатитом> (7 мая 2023 г.).
 11. Ивашкин В.Т., Юшук Н.Д., Маевская М.В., Знойко О.О., Дудина К.Р., Кареткина Г.Н. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и Российского общества по изучению печени по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом В. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2014; 3: 58-88.
 15. ЗАО «ЭКОлаб» (Отделение ПЦР-диагностики - КовидЭК Экстракт); 2023. Режим доступа: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (дата обращения 4 мая 2023 г.).
 17. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И. Разработка набора реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита В в клиническом материале методом ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2023; 22(4): 86-93. DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94.
 21. Жигалева О.Н., Ермолаев И.И., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю. Разработка набора реагентов для качественного обнаружения РНК вируса ВИЧ-1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (5): 298-304. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-298-304.
-
- ## REFERENCES
1. Rubric of clinical guidelines (Acute hepatitis B (HB) in adults) 2023. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/672_1 (2 мая 2023). (in Russian)
 2. World Health Organization (Hepatitis B) 2023. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (2 мая 2023). (in Russian)
 3. Federal State Statistics Service (Rosstat) 2023. Available at: https://eng.rosstat.gov.ru/search?q=incidence+of+hepatitis+&date_from=&content=on&date_to=&search_by=all&sort=relevance (7 мая 2023). (in Russian)
 4. Liang T. J. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*. 2009; 49(5): S13–S21. DOI: 10.1002/hep.22881.
 5. Venkatakrisnan B., Zlotnick A. The Structural Biology of Hepatitis B Virus: Form and Function. *Annual review of virology*. 2016; 3(1): 429–51. DOI: 10.1146/annurev-virology-110615-042238.
 6. Zhao K., Liu A., Xia Y. Insights into Hepatitis B Virus DNA Integration-55 Years after Virus Discovery. *The Innovation*. 2020; 1(2): 1-10. DOI: 10.1016/j.xinn.2020.100034.
 7. Ho J. K., Jeevan-Raj B., Netter H. J. Hepatitis B Virus (HBV) Subviral Particles as Protective Vaccines and Vaccine Platforms. *Viruses*. 2020; 12(2): 1-26. DOI: 10.3390/v12020126.
 8. Zehender G., Ebranati E., Gabanelli E., Sorrentin, C., Lo Presti A., Tanzi E. et al. Enigmatic origin of hepatitis B virus: an ancient traveling companion or a recent encounter?. *World journal of gastroenterology*. 2014; 20(24): 7622–34. DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7622.
 9. Spitz N., Mello F. C. A., Moreira A. S., Gusatti C. S., Martins R. M. B., Gomes S. A. et al. Reconstruction of the spatial and temporal dynamics of hepatitis B virus genotype D in the Americas. *PloS One*. 2019; 14(7): 1-20. DOI: 10.1371/journal.pone.0220342.
 10. Araujo N.M., Teles S.A., Spitz N. Comprehensive analysis of clinically significant hepatitis B virus mutations in relation to genotype, subgenotype and geographic region. *Frontiers in microbiology*. 2020; 11: 1-22. DOI: 10.3389/fmicb.2020.616023.
 11. Ivashkin V.T., Yushchuk N.D., Maevskaia M.V., Znoyko O.O., Dudina K.R., Karetkina G.N. et al. Clinical guidelines of the Russian Gastroenterological Association and the Russian Society for the Study of the Liver on the diagnosis and treatment of adult patients with hepatitis B. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2014; 3: 58-88. (in Russian)
 12. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World journal of gastroenterology*. 2014; 20(18):5427–34. DOI: 10.3748/wjg.v20.i18.5427.
 13. Wu B., Xiao F., Li P., Du Y., Lin J., Ming K. et al. Ultrasensitive detection of serum hepatitis B virus by coupling ultrafiltration DNA extraction with real-time PCR. *PLoS One*. 2017; 12(2): 1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0170290.
 14. Wang S., Li H., Ko Z., Ren F., Jin Y., Yang L. et al. Highly sensitive and specific detection of hepatitis B virus DNA and drug resistance mutations utilizing the PCR-based CRISPR-Cas13a system. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021; 27(3): 443–50. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.04.018.
 15. CJSC «EKOlab» (PCR diagnostic department - CovidEK Extract); 2023. Available at: <https://ekolab.ru/catalog/laboratornaya-diagnostik/otdelenie-ptsr/kovidek-ekstrakt/> (accessed 4 May 2023). (in Russian)
 16. Basic Local Alignment Search Tool 2023. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 30 April 2023).
 17. Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I. Development of a reagent kit for the quantitative determination of hepatitis B virus (HBV) DNA in clinical material by PCR with hybridization-fluorescence detection. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2023; 22(4): 86-93. DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94. (in Russian)
 18. Portilho M. M., Mendonça A. C. D. F., Bezerra C. S., do Espirito-Santo M. P., de Paula V. S., Nabuco L. C. et al. Usefulness of in-house real time PCR for HBV DNA quantification in serum and oral fluid samples. *Journal of virological methods*. 2018; 256: 100–6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.03.001.
 19. Naito H., Hayashi S., Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(1): 362–4. DOI: 10.1128/JCM.39.1.362-364.2001.
 20. Ding L., Rui C., Zhansheng J., Xiangling W., Pin, L., Zhen Y. et al. Detection of hepatitis B virus genotypes A to D by the fluorescence polarization assay based on asymmetric PCR. *Journal of virological methods*. 2010; 168(1-2): 31–7. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.04.011.
 21. Zhigaleva O.N., Ermolaev I.I., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu. Development of the reagent kit for qualitative realtime detection of HIV-1 RNA by polymerase chain reaction. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (5): 298-304. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-5-298-304. (in Russian)
 22. International Nucleotide Sequence Database Collaboration; 2023. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 8 May 2023).