

ООО Издательская группа
«Медиа Сфера»

Акционерное общество
"ЭКОлаб"

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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 70
3 • 2025

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ

ЖУРНАЛ

МАРТ

Журнал основан в январе 1955 г.

Учредители:

ООО Издательская группа
«Медиа Сфера» (печатное издание)
127238, г. Москва, Дмитровское ш., 46
кор. 2;

Акционерное общество "ЭКОлаб"
(электронное издание)
142530, Московская область,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1

Издатель:
Акционерное общество "ЭКОлаб"

Телефон редакции:
8-916-201-80-47

Зав. редакцией:
Л.А.Шанкина
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Технический редактор:
Ч.А.Сафаров
E-mail: klinlab@internet.ru

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

Сдано в набор 14.02.2025
Подписано в печать 25.02.2025

Формат 60 × 88½
Печать офсетная
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 8,95

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

ПИ № ФС77-37760 от 07.10.2009 г.

ЭЛ № ФС77-80929 от 21.04.2021 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 Российского
индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological
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 Reu-
ters 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.pressa-rf.ru/cat/1/edition/e81645/Под->
[пписка на электронную версию:](https://elibrary.ru/title_about_new.asp?id=7849)
<https://www.pressa-rf.ru/rucont/edition/331548/>

ISSN: 0869-2084 (Print)

ISSN: 2412-1320 (Online)

Клин. лаб. диагностика. 2025. Том 70. № 3.
152-224

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);

Кочетов А.Г., 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);

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

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

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

Осман Кхалил Ареф, к.б.н. (Хомс, Сирия)

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

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

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

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

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

LLC Publishing Group
"Media Sphera"

Joint Stock Company
"EKOlab"

D

KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 70
3 • 2025

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MARCH

The Journal is founded in 1955

Founders:

LLC "Publishing Group "Media Sphera"
(print edition)
127238, Moscow, Dmitrovskoe sh., 46 k.
b. 2;
Joint Stock Company "EKOlab"
(electronic edition)
142530, Moscow region, Elektrogorsk,
St. Budyonnogo, 1

Publisher:

Joint Stock Company "EKOlab"

Editorial office phone:
8-916-201-80-47,

Managing editor:
L.A. Shankina
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Technical editor:
Ch.A. Safarov
E-mail: klinlab@internet.ru

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

WWW страница: <https://clinlabdia.ru/>
E-mail: klinlab@internet.ru

PI No. FS77-37760 dated 10/07/2009
EL No. FS77-80929 dated 04/21/2021

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

The Journal is presented in data base of the Russian
index of scientific quotation (RINZ) and in following
&R editions: Abstracts of Microbiology, 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 Literature,
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 (Print)
ISSN: 2412-1320 (Online)

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);

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

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

Areg A. Totolian, 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);

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

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

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

Osman Khalil Aref, Cand. Sci. (Biol.), (Homs, Syria)

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Алиева А.М., Рахаев А.М., Байкова И.Е., Анай Я.М., Котикова И.А., Никитин И.Г.
Метеориноподобный белок (metrnl): перспективный биологический маркер при атеросклерозе и нарушениях углеводного обмена (обзор литературы) 156

Дьяченко Е.И., Сарф Е.А., Бельская Л.В.
Диагностическая значимость онкомаркеров (CA125, CA 15-3, CA 27.29, MCA) в слюне при раке молочной железы 163

ГЕМАТОЛОГИЯ

*Вареха Н.В., Стуклов Н.И., Гимадиев Р.Р., Гордиенко К.В., Щеголев О.Б.,
Макарчев А.И., Гуркина А.А.*
Создание и оценка значимости прогностических моделей для определения уровня ферритина сыворотки с помощью машинного обучения в разных клинических группах 172

ИММУНОЛОГИЯ

Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Кудинова Э.Е., Егорова А.Н., Бубнова Л.Н.
Изучение полиморфизма генов иммунного ответа с помощью секвенирования нового поколения 182

МИКРОБИОЛОГИЯ

*Борисова О.Ю., Чагина И.А., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Андреевская И.Ю.,
Миронов А.Ю., Полосенко О.В., Подопригора И.В., Сидорова Н.А.*
Совершенствование среди Гисса с крахмалом и индикатора Андреде для бактериологического исследования на дифтерийную инфекцию 190

*Домотенко Л.В., Косилова И.С., Миронов А.Ю., Подкопаев Я.В.,
Мицевич И.П., Храмов М.В.*
Алгоритм использования отечественных питательных сред для выделения возбудителя ботулизма 196

Щербатая О.С., Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Воронина Н.А., Киселева А.А.
О выделении антибиотикорезистентных штаммов недифтериных коринебактерий в ассоциации с условно-патогенными микроорганизмами 204

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Баимова Р.Р., Рябико Е.Г., Останкова Ю. В., Токаревич Н.К.
Оптимизация способа детекции и генотипирования патогенных лептоспир в биологических образцах 210

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Кочетов А.Г., Ивойлов О.О.
Архаичное в современности: что регулирует в России приказ Минздрава о лабораторных исследованиях 218

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ И ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «Клиническая лабораторная диагностика» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы результаты диссертаций на соискание учёной степени доктора и кандидата наук

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Alieva A.M., Rakhaev A.M., Baikova I.E., Anay Ya.M., Kotikova I.A., Nikitin I.G.

Meteorin-like protein (metrnl): a promising biological marker in atherosclerosis and carbohydrate metabolism disorders (review of literature) 156

Dyachenko E.I., Sarf E.A., Bel'skaya L.V.

Diagnostic significance of salivary tumor markers (CA125, CA 15-3, CA 27.29, MCA) in breast cancer 163

HEMATOLOGY

Varekha N.V., Stuklov N.I., Gimadiev R.R., Gordienko K.V.

Shchegolev O.B., Makarchev A.I., Gurkina A.A.

Development and value evaluation of predictive models for determining blood serum ferritin levels in different clinical groups using machine learning 172

IMMUNOLOGY

Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Kudinova E.E., Egorova A.N., Bubnova L.N.

Study of immune response gene polymorphisms using next-generation sequencing 182

MICROBIOLOGY

Borisova O.Yu., Chagina I.A., Gadua N.T., Pimenova A.S., Andrievskaya I.Yu.,

Mironov A. Yu., Polosenko O.V., Podoprigora I.V., Sidorova N.A.

Improvement of Gissa medium with starch and Andrede indicator for bacteriological examination for diphtheria infection 190

Domotenko L.V., Kosilova I.S., Mironov A.Yu.,

Podkopaev Ya.V., Mitzovich I.P., Khramov M.V.

Algorithm for using domestic nutrient media to isolate the causative agent of botulism 196

Sheherbataya O.S., Kharseeva G.G., Alutina E.L., Voronina N.A., Kiseleva A.A.

On the isolation of antibiotic-resistant strains of non-diphtherine corinebacteria in association with opportunistic microorganisms 204

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Baimova R.R., Riabiko E.G., Ostankova Yu. V., Tokarevich N.K.

Optimization of the method for detection and genotyping of pathogenic leptospira in biological samples 210

ORGANIZATION LABORATORY SERVICE

Kochetov A.G., Ivojlov O.O.

Archaic in modernity: what the Russian Ministry of Health's Order on

Laboratory Research Regulates? 218

БИОХИМИЯ



<https://elibrary.ru/dyzqdv>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Алиева А.М.¹, Рахаев А.М.², Байкова И.Е.¹, Анай Я.М.², Котикова И.А.¹, Никитин И.Г.¹

МЕТЕОРИНОПОДОБНЫЙ БЕЛОК (METRNL): ПЕРСПЕКТИВНЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И НАРУШЕНИЯХ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова» Министерства науки и высшего образования России, 360004, Нальчик, Россия

Сердечно-сосудистые заболевания являются важной глобальной проблемой в области медицины, социологии и экономики. Одним из факторов, способствующих развитию этих заболеваний, являются нарушения метаболизма углеводов. В настоящее время ведётся активный поиск новых биологических маркёров и терапевтических мишеней с целью разработки эффективных подходов к стратификации риска и вторичной профилактике сердечно-сосудистой патологии. Интерес исследователей привлекает Metrn (также известный как Metrnl, Meteorin-β, Subfatin, Cometin), являющийся секреторным белком с высокой экспрессией в адипоцитах, эндотелиальных клетках, активированных моноцитах и миоцитах. Metrn представляет собой новый секретируемый белок, оказывающий плейотропное воздействие на воспаление, иммунологию и метаболизм Цель: анализ исследований, посвящённых изучению Metrnl в роли биомаркёра при атеросклерозе и нарушениях углеводного обмена. Согласно имеющимся данным, Metrnl является перспективной молекулой, обладающей диагностическим и прогностическим потенциалом при атеросклерозе и нарушениях углеводного обмена. Учитывая результаты проведённых исследований, можно предположить, что определение уровня Metrnl окажется полезным при сахарном диабете 2 типа, ишемической болезни сердца, при оценке риска атеросклероза и дисфункции эндотелия. Metrnl, по всей видимости, следует определять, в качестве прогностического маркёра у пациентов с инфарктом миокарда, сердечной недостаточностью, острым нарушением мозгового кровообращения. Особый интерес представляют данные по изменению уровня Metrnl на фоне физических тренировок: динамическое отслеживание концентрации этого маркёра, возможно, позволит следить за эффективностью таких упражнений. Необходимы дальнейшие исследования, посвящённые изучению Metrnl в качестве дополнительного лабораторного показателя. Регуляция концентрации и экспрессии Metrnl, возможно, окажется многообещающей стратегией для лечения людей с нарушениями липидного и углеводного обмена.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания; атеросклероз; ишемическая болезнь сердца; сахарный диабет; биологический маркер; Metrnl

Для цитирования: Алиева А.М., Рахаев А.М., Байкова И.Е., Анай Я.М., Котикова И.А., Никитин И.Г. Метеориноподобный белок (metrnl): перспективный биологический маркер при атеросклерозе и нарушениях углеводного обмена (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (3): 156-162.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-156-162>

EDN: DYZQDV

Для корреспонденции: Алиева Амина Магомедовна, канд. мед. наук, доц. каф. госпитальной терапии им. академика Г.И. Сторожакова; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.11.2024

Принята печати 28.11.2024

Опубликовано 25.02.2025

Alieva A.M.¹, Rakhaev A.M.², Baikova I.E.¹, Anay Ya.M.², Kotikova I.A.¹, Nikitin I.G.¹

METEORIN-LIKE PROTEIN (METRNL): A PROMISING BIOLOGICAL MARKER IN ATHEROSCLEROSIS AND CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS (REVIEW OF LITERATURE)

¹Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of Russia, 117997, Moscow, Russia;

²Kabardino-Balkarian State University named after Kh. M. Berbekov of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, 360004, Nalchik, Russia

Cardiovascular diseases are an important global problem in medicine, sociology and economics. One of the factors contributing to the development of these diseases is carbohydrate metabolism disorders. Currently, there is an active search for new biological markers and therapeutic targets in order to develop effective approaches to risk stratification and secondary prevention of cardiovascular

pathology. Of particular interest to researchers is Metrnl (also known as Metrnl, Meteorin- β , Subfatin and Cometin), a secretory protein with high expression in adipocytes, endothelial cells, activated monocytes and myocytes. Metrnl is a new secreted protein that has a pleiotropic effect on inflammation, immunology and metabolism. The purpose of this article is to analyze studies devoted to the study of Metrnl as a biomarker in atherosclerosis and carbohydrate metabolism disorders. According to the available data, Metrnl is a promising molecule with diagnostic and prognostic potential in atherosclerosis and carbohydrate metabolism disorders. Given the results of the studies, it can be assumed that Metrnl level determination will be useful in type 2 diabetes mellitus, coronary heart disease, in assessing the risk of atherosclerosis and endothelial dysfunction. Metrnl should apparently be determined as a prognostic marker in patients with myocardial infarction, heart failure, and acute cerebrovascular accident. Of particular interest are the data on changes in Metrnl level during physical training: dynamic monitoring of the concentration of this marker may allow monitoring the effectiveness of such exercises. Further studies are needed to study Metrnl as an additional laboratory indicator. Regulation of Metrnl concentration and expression may prove to be a promising strategy for the treatment of people with lipid and carbohydrate metabolism disorders.

Key words: cardiovascular diseases; atherosclerosis; coronary heart disease; diabetes mellitus; biological marker; Metrnl

For citation: Alieva A.M., Rakhaev A.M., Baikova I.E., Anay Ya.M., Kotikova I.A., Nikitin I.G. Meteorin-like protein (metrnl): a promising biological marker in atherosclerosis and carbohydrate metabolism disorders (review of literature). *Klinicheskaya Laboratoriya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 156-162 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-156-162>
EDN: DYZQDV

For correspondence: Alieva Amina Magomedovna, M.D., Associate Professor of the department of Hospital Therapy named after academician G.I. Storozhakov; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Information about authors:

Alieva A.M., <https://orcid.org/0000-0001-5416-8579>;
Rakhaev A.M., <https://orcid.org/0000-0001-9601-1174>;
Baikova I.E., <https://orcid.org/0000-0003-0886-6290>;
Anay Ya.M., <https://orcid.org/0009-0009-3251-3699>;
Kotikova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-5352-8499>;
Nikitin I.G., <https://orcid.org/0000-0003-1699-0881>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 01.11.2024

Accepted 28.11.2024

Published 25.02.2025

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются причиной смертельного исхода более чем в 50% случаев, при этом чаще всего больные умирают от ишемической болезни сердца (ИБС) [1, 2]. Главным этиологическим фактором ИБС является атеросклероз, который на ранних стадиях заболевания достаточно часто протекает бессимптомно [1, 2]. Коварство ИБС состоит в том, что более чем у половины больных дебютом данного заболевания является инфаркт миокарда (ИМ) [1, 2]. Весомый вклад в развитие и прогрессирование ССЗ вносят нарушения углеводного обмена [3]. Продолжается поиск и изучение сердечно-сосудистых биологических маркеров, способных помочь в диагностике ССЗ, выступать в роли прогностического показателя и помочь в оценке эффективности назначаемой терапии [4-6]. Интерес учёных привлекает изучение метеориноподобного белка (также известный как Metrnl, Meteorin- β , Subfatin и Cometin) в качестве диагностического и прогностического биологического маркёра.

Цель: анализ работ, посвящённых исследованию Metrnl в роли диагностического и прогностического маркёра при атеросклерозе и нарушениях углеводного обмена.

Поиск и критерии отбора источников литературы. Представлен анализ современных публикаций на заданную тему. Проведено исследование источников литературы, охватывающее все значимые материалы по состоянию на 20 октября 2024 года. Использованы базы данных Национальной медицинской библиотеки Соединенных Штатов Америки (PubMed), Российской научной электронной библиотеки, интегрированной с

Российским индексом научного цитирования (РИНЦ) eLibrary.ru, Российской научной электронной библиотеки, построенной на концепции открытой науки Кибер-Ленинка (cyberleninka.ru). В процессе поиска задействованы следующие ключевые слова и словосочетания: сердечно-сосудистые заболевания, биологические маркёры, метеориноподобный белок, cardiovascular diseases, biological markers, Metrnl, Meteorin- β , Subfatin, Cometin. В обзор вошло 52 источника, включая актуальные экспериментальные и клинические исследования, обзорные статьи. С целью повышения специфичности и чувствительности поиска применены логические операторы и фильтры: типы статей-книги, клинические и оригинальные работы, клинические случаи, систематические обзоры, мета-анализы.

Биология Metrnl. Metrnl является секреторным белком, имеющим общую гомологию с нейротрофическим фактором метеорином [7-9]. Несмотря на то, что Metrnl и метеорин имеют структурное сходство, уровни их экспрессии и распределения различаются. Метеорин преимущественно экспрессируется в центральной нервной системе, Metrnl имеет относительно более широкое распространение, с высокой экспрессией в адипоцитах, эндотелиальных клетках, активированных моноцитах и миоцитах [7-9]. Metrnl кодируется геном *Metrnl*, обнаруженому у человека на 17-й хромосоме (17q25.3) [7-9]. Metrnl состоит из 311 аминокислот, включая зрелый белок из 266 аминокислот и сигнальный пептид из 45 аминокислот [7-9]. Рецептор фактора стволовых клеток KIT (представляет собой тирозинкиназный receptor III типа) является высокоаффинным к

Metrl, но специфический рецептор пока не идентифицирован [7-9].

Metrl при сердечно-сосудистых заболеваниях и нарушениях углеводного обмена: данные экспериментальных исследований. Сверхэкспрессия Metrl снижает уровни матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) различных хемокинов и активирует путь Wnt (один из внутриклеточных сигнальных путей, регулирующий эмбриогенез и дифференцировку клеток)/ β -catenin (β -катенин - белок, участвующий в регуляции экспрессии генов), тем самым подавляя повышенную инфильтрацию иммунокомпетентных клеток [10,11]. Metrl подавляет секрецию провоспалительных цитокинов через сигнальный путь UCHL-1 (деубиквитинирующий фермент убиквитин карбокси-концевая гидролаза L1)/NF- κ B (ядерный фактор каппа B, универсальный фактор транскрипции) [12]. Повышенная продукция Metrl способствует экспрессии и фосфорилированию AMPK (аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа, контролирующая энергетический баланс клетки) и усилиению аутофагии [13].

Metrl селективно активирует макрофаги белой жировой ткани посредством эозинофил-зависимого усиления действия STAT-6 (сигнальный белок и активатор транскрипции 6). Это увеличивает экспрессию TNF (ти-розингидроксилаза-фермент, ответственный за катализическое превращение L-тироцина аминокислоты в дигидроксифенилаланин), затем индуцирует выработку катехоламинов, способствующих «побурению» жировой ткани [7-9].

У мышей, находившихся на диете с высоким содержанием жиров (HFD), Metrl способствовал процессам «побурения» в белой жировой ткани (WAT), усиливая экспрессию генов, связанных с термогенезом и окислением жирных кислот β [14]. Metrl как *in vitro*, так и *in vivo* активирует гены, связанные с адипогенезом и липолизом, через сигнальный путь PPAR γ (рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма, фактор транскрипции) [15].

После физической нагрузки и воздействия холода скелетные мышцы и жировая ткань вырабатывают Metrl, впоследствии попадающий в кровоток. Повышение концентрации циркулирующего Metrl приводит к увеличению расхода энергии, «побурению» WAT и улучшению толерантности к глюкозе [16].

Изучено влияние тренировок с электростимуляцией (RT) на морфологические и метаболические показатели WAT, бородавки жировой ткани (BAT) и на концентрацию Metrl в плазме крови [17]. RT уменьшили размер адипоцитов в WAT, но не вызывали изменений в митохондриальных и термогенезных белках. В BAT уровень PGC-1 α (гамма-коактиватор 1-альфа рецептора, активирующего пролифератор пероксисом, регулятор митохондриального биогенеза) оказались значительно выше в группе RT по сравнению с контрольной группой. Обнаружена значимая положительная корреляция между экспрессией PGC-1 α в BAT и концентрацией Metrl в плазме крови.

Metrl в адипоцитах контролирует чувствительность к инсулину, по крайней мере, посредством своего локального аутоинтегрального/паракринного действия через путь PPAR γ [15]. Metrl улучшает функцию β -клеток, ингибируя их апоптоз и стимулируя их пролифера-

цию посредством активации пути WNT/ β -catenin (белок, участвующий в клеточной адгезии) [18]. Metrl уменьшает воспаление, резистентность к инсулину и вызывает окисление жирных кислот через AMPK или PPAR δ (рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором дельта, функционирующий как транскрипционный фактор)-зависимую сигнализацию в скелетных мышцах [19]. Metrl увеличивает поглощение глюкозы через кальций-зависимый путь AMPK α 2 в клетках скелетных мышц и увеличивает фосфорилирование HDAC5 (гистондеацетилаза-5, гистоны играют важнейшую роль в регуляции транскрипции, клеточного цикла и событий развития), транскрипционного репрессора GLUT4 (инсулинзависимый белок-переносчик глюкозы, осуществляет перенос глюкозы, посредством облегчённой диффузии через клеточную мембрану под контролем инсулина) [20]. Внутрибрюшинная инъекция рекомбинантного Metrl улучшила толерантность к глюкозе у мышей с ожирением [20].

Повышение экспрессии Metrl в почках приводит к улучшению их состояния за счёт снижения экспрессии молекул в сигнальном пути TGF- β 1 (трансформирующий фактор роста β -белок, контролирующий пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток)/Smads (семейство структурно сходных белков, являющихся основными сигнальными преобразователями для рецепторов TGF) у мышей с сахарным диабетом (СД) 2 типа, и за счёт снижения продукции фиброзных молекул, таких как актиновый белок α -SMA [21].

Изучено влияние 8-недельных тренировок по плаванию в тёплой и холодной воде и употребление экстракта корицы на сывороточные концентрации Metrl, HDAC5 и инсулиноврезистентность (ИР) у крыс с СД [22]. Сочетание плавания в холодной воде и потребления экстракта корицы привело к заметному увеличению концентраций Metrl в крови. Наблюдалось значительное снижение концентраций HDAC5 в крови.

В эксперименте задались вопросом, может ли внутривенное введение Metrl отсрочить начало СД у мышей линии NOD (Non-Obese Diabetes – модель СД без ожирения) [23]. Результаты исследования продемонстрировали, что внутривенное введение Metrl отсрочило начало СД у мышей NOD. Гистология поджелудочной железы показала снижение инфильтрации лейкоцитов, что связано с увеличением активности регуляторных Т-клеток, подавлением активности аутореактивных Т-клеток и изменением секреции цитокинов.

Дефицит Metrl в сосудистом эндотелии приводит к нарушению вазодилатации за счёт снижения фосфорилирования eNOS (эндотелиальная синтаза оксида азота) и активации воспаления за счёт усиления активности пути NF- κ B, что способствует развитию атеросклероза. Экзогенный Metrl устраняет эндотелиальную дисфункцию, вызванную дефицитом Metrl [24].

Лечение Metrl подавляло секрецию TNF- α (фактор некроза опухоли альфа-внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, синтезирующийся в основном моноцитами и макрофагами) и MCP-1 (моноцитарный хемотаксический белок 1, наиболее мощный фактор хемотаксиса моноцитов), фосфорилирование NF- κ B, киназы I κ B (ферментный комплекс, участвующий в распространении клеточного

ответа на воспаление) в обработанных липополисахаридом (ЛПС) HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека). Лечение Metrnl подавляло экспрессию молекул адгезии и апоптоза, усилило фосфорилирование AMPK, выработку PPAR δ дозозависимым образом. РНК-опосредованное подавление AMPK или PPAR δ восстановило все эти изменения. Показано, что Metrnl уменьшает воспалительные реакции через зависимые от AMPK и PPAR δ пути в обработанных ЛПС HUVEC [25].

У мышей с ИМ Metrnl улучшал состояние сердца путём избирательного расширения популяции эндотелиальных клеток, экспрессирующих KIT, в граничной зоне инфаркта. Мыши с дефицитом Metrnl не смогли установить этот KIT-зависимый ангиогенный ответ, и у них развилась тяжёлая постинфарктная сердечная недостаточность (СН). Эти данные подтвердили, что Metrnl является лигандом рецептора KIT в состоянии ишемии [26].

Metrnl уменьшает апоптоз кардиомиоцитов, вызванный ишемическим и реперфузионным повреждением (ИРП), путём смягчения стресса эндоплазматического ретикулума за счёт активации передачи сигналов AMPK-PAK2 (серин/треонин-протеинкиназа, модифицирует другие белки путём фосфорилирования остатков аминокислот, имеющих гидроксильные группы или гетероциклической аминогруппы гистидина) [27].

Metrnl при сердечно-сосудистых заболеваниях и нарушениях углеводного обмена: данные клинических исследований. В настоящее время существуют определённые разногласия относительно изменений уровней Metrnl у лиц с ожирением. Некоторые исследователи продемонстрировали, что циркулирующие уровни Metrnl, возможно, компенсаторно увеличиваются у лиц с избыточной массой тела или ожирением [28, 29], в то время как другие исследователи обнаружили снижение концентраций Metrnl при ожирении [30-34]. Ряд работ не выявили существенных отличий [35, 36]. Из-за различий в критериях включения, методах оценки и наличия многочисленных искажающих факторов в этих работах, необходимы хорошо контролируемые, крупномасштабные и всесторонние исследования [7-9].

Изучена связь Metrnl с ВАТ у младенцев при рождении, в возрасте 4 и 12 мес [37]. Уровни Metrnl в сыворотке крови высокие при рождении и снижались в течение первого года жизни, хотя и оставались выше, чем у взрослых. В возрасте 4 и 12 мес концентрации Metrnl положительно коррелировали с уровнем циркулирующего CXCL14 (хемокин (С-Х-С мотив) лиганд 14), хемокином, высвобождаемым ВАТ, но не с параметрами ожирения или метаболического статуса. Концентрации Metrnl положительно коррелировали с активностью ВАТ в задней части шеи у девочек в возрасте 12 мес. Концентрации Metrnl высоки в первый год жизни и коррелируют с показателями ВАТ и с уровнями CXCL14. Эти данные предполагают, что Metrnl активно секретируется ВАТ и может быть лабораторным маркёром её активности в раннем возрасте.

Физические упражнения могут индуцировать экспрессию Metrnl и повышать концентрации циркулирующего Metrnl [38-40]. В частности, бег под уклон и круговые тренировки повышают концентрации Metrnl в крови [39, 40].

Уровни Metrnl в крови снижены у людей с СД 2 ти-

па по сравнению с людьми без нарушений углеводного обмена [7-9, 41]. Отмечено снижение Metrnl не только у пациентов с СД 2 типа, но и у больных с преддиабетом [42]. Сывороточные уровни Metrnl обратно коррелируют с площадью висцерального жира (VFA) у пациентов с СД 2 типа [33].

Уровни Metrnl определяли в сыворотке крови у 150 пациентов, разделённых на 3 группы: 1 группа (контрольная группа, $n=50$), 2 группа (впервые диагностированный СД 2 типа, $n=50$), 3 группа (длительно текущий СД 2 типа, $n=50$) [43]. Не выявлено никаких статистически значимых различий между гендерными и возрастными характеристиками трёх групп. Уровни Metrnl у участников: контрольная группа - 20,05 (1,56-103,78); 2 группа - 2,62 (1,25-103,78); 3 группа - 2,01 (0,80-19,84) пг/мл. Уровни Metrnl у участников контрольной группы выше, чем у участников в группах с недавно диагностированным СД 2 типа и длительно текущим СД 2 типа ($p<0,001$).

Определялась связь низких уровней Metrnl в сыворотке крови с нарушением толерантности к глюкозе (НТГ), дисфункцией эндотелия, атеросклерозом [44]. В исследование включено 260 человек, 89 из которых имели нормальную толерантность к глюкозе (1 группа), 77 – с НТГ (2 группа), 94 – с СД 2 типа (3 группа). Уровни Metrnl в сыворотке крови значительно меньше у пациентов 3 группы по сравнению с лицами 1 группы ($p<0,001$). Уровни Metrnl отрицательно коррелировали с концентрациями в крови глюкозы натощак, глюкозы через 2 ч после нагрузки, инсулином натощак, уровнями HbA1c (гликированный гемоглобин), hs-CRP (высокочувствительный С-реактивный белок), IL-6 (интерлейкин-6), TNF- α , показателями HOMA-IR, CIMT (толщина комплекса интима-медиа), baPWV (скорость пульсовой волны плечо-лодыжка), с концентрациями ICAM-1 (молекула клеточной адгезии, присутствующая в низкой концентрации на мембранах лейкоцитов и эндотелиальных клеток), VCAM-1 (белок, входящий в суперсемейство иммуноглобулинов, участвующий в адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток, передаче сигналов), CD_{62E} (Е-селектин, гликопротеин, находящийся на клеточной поверхности, относится к классу молекул клеточной адгезии) в крови. Высокий уровень Metrnl в сыворотке крови значительно ассоциирован со сниженным риском СД 2 типа после контроля потенциальных факторов риска. Более того, эта связь оставалась значимой после дальнейшей корректировки для IL-6, TNF- α , hs-CRP, CIMT, baPWV, ICAM-1, VCAM-1, CD_{62E}. Авторы сделали вывод: 1) низкий уровень Metrnl в сыворотке крови связан с НТГ, нарушением эндотелиальной функции и атеросклерозом; 2) Metrnl можно считать возможным суррогатным маркёром эндотелиальной дисфункции и атеросклероза, и независимым фактором риска СД 2 типа.

Изучено влияние круговых тренировок с отягощениями (в течение 8 нед) на концентрацию Metrnl в крови и показатели ИР у больных с СД 2 типа [40]. Двадцать больных случайным образом разделены на контрольную ($n=10$, возраст 51 ± 1 год, индекс массы тела (ИМТ) $27,43\pm0,98$ кг/м 2) и экспериментальную группы ($n=10$, возраст 51 ± 1 год, ИМТ $30,12\pm0,92$ кг/м 2). Участники контрольной группы поддерживали свою ежедневную физическую активность и не занимались ка-

кой-либо систематической программой тренировок на протяжении всего исследования. Концентрации Metrnl существенно не изменились в контрольной группе, но значительно увеличились в экспериментальной группе ($p=0,001$). ИР значительно уменьшилась в экспериментальной группе ($p=0,028$).

У пациентов с диабетической нефропатией (ДН) анализировали уровни Metrnl в сыворотке крови [45]. В исследование включены 96 пациентов с СД 2 типа и 45 пациентов с ДН. Одновременно измерялся ряд параметров, включая соотношение талии к бедрам (ИТБ), ИМТ, альбумин-креатининовое соотношение (АКС), индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИМЛ), альбумин-глобулиновый коэффициент (АГК), оценивалась функция печени и почек, липидный профиль крови и др. Длительность заболевания (OR (отношение шансов): 1,12, 95% CI (доверительный интервал): 1,01–1,24, $p=0,031$), артериальная гипертензия (АГ) (OR: 4,86, 95% CI: 1,16–20,49, $p=0,031$), уровень глюкозы в крови натощак (OR: 1,23, 95% CI: 1,03–1,48, $p=0,025$), ИТБ (OR: 2,53, 95% CI: 1,03–6,22, $p=0,044$) оказались независимыми факторами риска развития ДН ($p<0,05$). АГК (OR: 0,13, 95% CI: 0,02–0,76, $p=0,024$) и Metrnl (OR: 0,99, 95% CI: 0,98–1,00, $p=0,001$) идентифицированы как защитные факторы против ДН. Уровень Metrnl отрицательно коррелировал с тяжестью ДН ($rs=-0,447$, $p<0,001$). AUC (площадь под кривой) диагностической точности Metrnl для ДН составила 0,765 (95% CI: 0,686–0,844). Metrnl является защитным веществом при ДН; концентрация Metrnl в сыворотке крови обратно пропорциональна тяжести ДН.

Изучены уровни Metrnl в пуповинной крови и плазме крови женщин с ожирением и гестационным сахарным диабетом (ГСД) [46]. В исследование включено 19 женщин без ожирения с нормальной толерантностью к глюкозе, 20 женщин с ожирением и нарушением толерантности к глюкозе (НТГ), женщины с ГСД, контролируемым диетой (18 без ожирения и 17 с ожирением), и женщины с ГСД, контролируемым инсулином (19 без ожирения и 18 с ожирением). Всем женщинам проведено плановое кесарево сечение. Наличие ожирения и ГСД у матери связаны с более низкими уровнями Metrnl в пуповинной крови; изменения уровней Metrnl в пуповинной крови могут привести к изменениям в траектории роста плода и быть определяющим фактором для метаболических нарушений в более позднем возрасте у ребёнка.

Проведённые клинические исследования доказали связь Metrnl с атеросклерозом [7–9]. Более низкая концентрация Metrnl в сыворотке крови может привести к нарушению функции эндотелия, ухудшению толерантности к глюкозе и атеросклерозу [47]. Установлена отрицательная корреляция между уровнем Metrnl в сыворотке крови и тяжестью атеросклероза [44]. Уровни Metrnl в сыворотке крови связаны с прогрессированием атеросклероза, что делает его независимым прогностическим фактором при этой патологии [48].

Изучены уровни Metrnl и CRP, общего антиоксидантного статуса (TAS), общего оксидантного статуса (TOS) и индекса окислительного стресса (OSI) у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) [49]. В исследование включены 64 пациента с диагнозом ОИМ и 56 здоровых лиц контрольной группы. Значительные разли-

чия обнаружены между группами по уровням глюкозы ($p<0,001$), мочевины ($p<0,001$), креатинина ($p<0,001$), Tn-I (тропонин-I) ($p<0,001$), CRP ($p<0,001$), лейкоцитов ($p<0,001$), показателям TAS ($p<0,001$), TOS ($p<0,001$), OSI ($p<0,001$), уровням Metrnl ($p<0,001$). Установлено, что существует значительная отрицательная корреляция между уровнем Metrnl, временем от начала боли в груди до поступления в отделение неотложной помощи ($r=-0,345$, $p=0,005$) и уровнем Tn-I ($r=-0,372$, $p=0,002$) у пациентов с ОИМ. Значимая корреляция не наблюдалась с возрастом ($r=-0,058$, $p=0,650$), ИМТ ($r=0,092$, $p=0,472$), TAS ($r=0,079$, $p=0,533$), TOS ($r=0,113$, $p=0,374$), OSI ($r=0,042$, $p=0,740$), CRP ($r=-0,192$, $p=0,129$). При пороговом значении Metrnl $\leq 2,55$ нг/мл его чувствительность и специфичность определены как 82,81% и 80,36% соответственно при дифференциации пациентов с ОИМ от здоровой контрольной группы.

Оценины уровни Metrnl в крови у пациентов с инфарктом миокарда с подъёмом сегмента ST (ИМпСТ) [50]. Уровни Metrnl измеряли через 12 час после появления симптомов. Первичной конечной точкой являлась совокупность смертности от всех причин или нефатальный ИМ в течение 3 лет. Обследован 381 пациент (средний возраст 61 год, 21% женщин, 8% класс Killip III/IV). Уровни Metrnl связаны с возрастом, сердечно-сосудистыми факторами риска, с осложнениями ИМпСТ, в частности с СН и кардиогенным шоком. Metrnl независимо предсказывал смерть от любой причины или нефатальный ИМ в течение 3 лет (HR (отношение рисков), 1,86; 95% CI, 1,23–2,81; $p=0,003$). Пациенты в самом высоком тертиле ($>491,6$ пг/мл) имели более высокий риск для составной конечной точки, чем пациенты в самых низких тертилях (HR, 3,24; 95% CI, 1,92–5,44; $p<0,001$), даже после корректировки по возрасту, СД, остановке сердца, классу Killip, фракции выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) и клиренсу креатинина (HR, 1,90; 95% CI, 1,10–3,29; $p=0,021$). Уровни циркулирующего Metrnl предсказывают худший исход у пациентов с ИМпСТ.

Изучены концентрации Metrnl в сыворотке крови у 193 пациентов с ИБС (группа контроля 156 человек) [51]. Показатели Metrnl ниже у пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой ($p<0,001$). Концентрации Metrnl отрицательно коррелируют с ИМТ, уровнями общего холестерина (OX), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХСЛПНП), CRP, IL-1 β и IL-11, даже после корректировки с учётом потенциальных сопутствующих переменных ($p<0,05$). По сравнению с пациентами в самом высоком тертиле концентраций Metrnl пациенты в самом низком тертиле имели самые высокие риски ИБС (скорректированный OR=2,63, 95% CI=1,46–4,27, $p=0,001$). После корректировки с учётом потенциальных сопутствующих переменных концентрация Metrnl в сыворотке крови снижалась по мере увеличения количества стенозированных сосудов ($p<0,001$). Сниженная концентрация Metrnl отрицательно коррелирует с тяжестью ИБС по шкале Gensini. Данное исследование продемонстрировало значимую связь Metrnl с наличием и тяжестью ИБС, что позволяет предположить, что этот биологический маркёр может стать новой перспективной терапевтической мишенью при ИБС.

Проанализированы уровни Metrnl в крови у 35 па-

циентов с острым ишемическим инсультом (ОИИ) (группа контроля 30 здоровых человек) [52]. Уровни Metrnl ($p=0,001$), TAC (общая антиоксидантная способность) ($p=0,009$) значительно снизились, тогда как TOS ($p<0,001$) и OSI ($p<0,001$) значительно увеличились у пациентов с ОИИ по сравнению со здоровыми лицами. Пороговое значение Metrnl $\leq 1,63\%$ продемонстрировало чувствительность и специфичность 91,43% и 71,43% соответственно у пациентов с ОИИ. Наблюдалась значительная отрицательная корреляция между уровнями Metrnl и размером инфаркта у пациентов с ОИИ.

Заключение. Существует современные технологии для выявления новых биологических маркёров, что создает потребность в разработке мультибиомаркёрной модели для диагностики и предсказания развития ССЗ. В обзоре проведён анализ исследований, посвященных роли Metrnl в атеросклерозе и нарушениях метаболизма углеводов. Учитывая результат проведённых исследований, можно предположить, что определение уровня Metrnl окажется полезным при СД 2 типа, ИБС, при оценке риска атеросклероза и дисфункции эндотелия. Metrnl, по всей видимости, следует определять, в качестве прогностического маркёра у пациентов с ИМ, СН, ОНМК. Особый интерес представляют данные по изменению уровню Metrnl на фоне физических тренировок: динамическое отслеживание концентрации этого маркёра, возможно позволит следить за эффективностью таких упражнений. На момент написания статьи количество клинических и экспериментальных работ по данной теме остается ограниченным. Полученные данные отмечают Metrnl, как многообещающую молекулу с потенциалом для диагностики и прогноза при атеросклерозе и метаболических расстройствах. Тем не менее, до клинического применения Metrnl ещё далеко, поскольку имеются определённые проблемы, которые необходимо решить. Во-первых, несмотря на то, что получено некоторое представление о механизмах, с помощью которых Metrnl оказывает свое действие, большинство из этих механизмов сосредоточены на нисходящих путях, при этом исследования восходящих путей недостаточны. Несмотря на то, что КИТ идентифицирован как рецептор Metrnl, существование высокоспецифического рецептора для Metrnl до сих пор остается неясным. Идентификация конкретного рецептора станет важным шагом в выяснении терапевтических аспектов Metrnl. Ожидается, что предстоящие более обширные клинические и экспериментальные исследования покажут, что этот биологический маркёр может стать ценным дополнением к лабораторным методам диагностики. Регуляция уровня и экспрессии Metrnl может стать эффективной стратегией для лечения пациентов с атеросклерозом и нарушениями углеводного обмена.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-3, 7-52 СМ.)
REFERENCES

- Алиева А.М., Теплова Н.В., Батов М.А., Воронкова К.В., Валиев Р.К., Шнахова Л.М. и др. Пентраксин-3 – перспективный биологический маркер при сердечной недостаточности: литературный обзор. *Consilium Medicum*. 2022; 24 (1): 53-9. DOI: 10.26442/2075-1753.2022.1.201382.
- Алиева А.М., Резник Е.В., Пинчук Т.В., Аракелян Р.А., Валиев Р.К., Рахаев А.М. и др. Фактор дифференцировки роста-15 (GDF-15) как биологический ёпри сердечной недостаточности. *Архив внутренней медицины*. 2023; 13 (1): 14-23. DOI: 10.20514/2226-6704-2023-13-1-14-23.
- Алиева А.М., Теплова Н.В., Кисляков В.А., Воронкова К.В., Шнахова Л.М., Валиев Р.К. и др. Биомаркеры в кардиологии: мицроРНК и сердечная недостаточность. *Терапия*. 2022; 1: 60-70. DOI: 10.18565/therapy.2022.1.60-70.
- Deng P., Fu Y., Chen M., Wang D., Si L. Temporal trends in inequalities of the burden of cardiovascular disease across 186 countries and territories. *Int. J. Equity Health*. 2023; 22 (1): 164. DOI: 10.1186/s12939-023-01988-2.
- Silva S., Fatumo S., Nitsch D. Mendelian randomization studies on coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 2024; 13 (1): 29. DOI: 10.1186/s13643-023-02442-8.
- Wong N.D., Sattar N. Cardiovascular risk in diabetes mellitus: epidemiology, assessment and prevention. *Nat. Rev. Cardiol.* 2023; 20 (10): 685-95. DOI: 10.1038/s41569-023-00877-z.
- Alieva A.M., Teplova N.V., Batov M.A., Voronkova K.V., Valiev R.K., Shnakhova L.M. et al. Pentraxin-3 – a promising biological marker in heart failure: literature review. *Consilium Medicum*. 2022; 24 (1):53-9. DOI: 10.26442/20751753.2022.1.201382. (in Russian)
- Alieva A.M., Reznik E.V., Pinchuk T.V., Arakelyan R.A., Valiev R.K., Rakhaev A.M. et al. Growth differentiation factor-15 (GDF-15) is a biological marker in heart failure. *Arkhiv` vnutrenney meditsiny*. 2023; 13 (1): 14-23. DOI: 10.20514/2226-6704-2023-13-1-14-23. (in Russian)
- Alieva A.M., Teplova N.V., Kislyakov V.A., Voronkova K.V., Shnakhova L.M., Valiev R.K. et al. Biomarkers in cardiology: microRNA and heart failure. *Terapiya*. 2022; 1: 60-70. DOI: 10.18565/therapy.2022.1.60-70. (in Russian)
- Li Z., Gao Z., Sun T., Zhang S., Yang S., Zheng M. et al. Meteorin-like/Metrnl, a novel secreted protein implicated in inflammation, immunology, and metabolism: A comprehensive review of preclinical and clinical studies. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1098570. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1098570.
- Dong W.S., Hu C., Hu M., Gao Y.P., Hu Y.X., Li K. et al. Metrnl: a promising biomarker and therapeutic target for cardiovascular and metabolic diseases. *Cell Commun. Signal.* 2024; 22 (1): 389. DOI: 10.1186/s12964-024-01767-8.
- Miao Z.W., Hu W.J., Li Z.Y., Miao C.Y. Involvement of the secreted protein Metrnl in human diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 2020; 41 (12): 1525-30. DOI: 10.1038/s41401-020-00529-9.
- Du Y.N., Teng J.M., Zhou T.H., Du B.Y., Cai W. Meteorin-like protein overexpression ameliorates fulminant hepatitis in mice by inhibiting chemokine-dependent immune cell infiltration. *Acta Pharmacol. Sin.* 2023; 44 (7): 1404-15. DOI: 10.1038/s41401-022-01049-4.
- Huang D., Liu X., Gao X., Choi C.K., Giglio G., Farah L. et al. Meteorin-like protein/METRNL/Interleukin-41 ameliorates atopic dermatitis-like inflammation. *Allergy*. 2024. DOI: 10.1111/all.16150.
- Zhang L., Li Y., Wu Z., Shen Q., Zeng C., Liu H. et al. Metrnl inhibits choroidal neovascularization by attenuating the choroidal inflammation via inactivating the UCHL-1/NF- κ B signaling pathway. *Front. Immunol.* 2024; 15: 1379586. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1379586.
- Lu Q.B., Ding Y., Liu Y., Wang Z.C., Wu Y.J., Niu K.M. et al. Metrnl ameliorates diabetic cardiomyopathy via inactivation of cGAS/STING signaling dependent on LKB1/AMPK/ULK1-mediated autophagy. *J. Adv. Res.* 2023; 51: 161-79. DOI: 10.1016/j.jare.2022.10.014.
- Qiu Y., Nguyen K.D., Odegaard J.I., Cui X., Tian X., Locksley R.M. et al. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. *Cell*. 2014;157(6):1292-308. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.066.
- Li Z.Y., Song J., Zheng S.L., Fan M.B., Guan Y.F., Qu Y. et al. Adipocyte Metrnl antagonizes insulin resistance through PPAR γ signaling. *Diabetes*. 2015; 64 (12): 4011-22. DOI: 10.2337/db15-0274.
- Rao R.R., Long J.Z., White J.P., Svensson K.J., Lou J., Lokurkar I. et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. *Cell*. 2014; 157 (6): 1279-91. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.065.
- Amano Y., Nonaka Y., Takeda R., Kano Y., Hoshino D. Effects of electrical stimulation-induced resistance exercise training on white and brown adipose tissues and plasma meteorin-like concentration in rats. *Physiol. Rep.* 2020; 8 (16): e14540. DOI: 10.14814/phy2.14540.

18. Hu W., Wang R., Sun B. Meteorin-Like Ameliorates β Cell Function by Inhibiting β Cell Apoptosis of and Promoting β Cell Proliferation via Activating the WNT/ β -Catenin Pathway. *Front. Pharmacol.* 2021; 12: 627147. DOI: 10.3389/fphar.2021.627147.
19. Jung T.W., Lee S.H., Kim H.C., Bang J.S., Abd El-Aty A.M., Hacimüftüoglu A. et al. METRNL attenuates lipid-induced inflammation and insulin resistance via AMPK or PPAR δ -dependent pathways in skeletal muscle of mice. *Exp. Mol. Med.* 2018; 50 (9): 1-11. DOI: 10.1038/s12276-018-0147-5.
20. Lee J.O., Byun W.S., Kang M.J., Han J.A., Moon J., Shin M.J. et al. The myokine meteorin-like (metrnl) improves glucose tolerance in both skeletal muscle cells and mice by targeting AMPK $\alpha 2$. *FEBS J.* 2020; 287 (10): 2087-3104. DOI: 10.1111/febs.15301.
21. Lin L., Huang S., Lin X., Liu X., Xu X., Li C. et al. Upregulation of Metrnl improves diabetic kidney disease by inhibiting the TGF- $\beta 1$ /Smads signaling pathway: A potential therapeutic target. *PLoS One.* 2024; 19 (8): e0309338. DOI: 10.1371/journal.pone.0309338.
22. Tayebi S.M., Motaghinasab S., Eslami R., Ahmadabadi S., Basereh A., Jamhiri I. Impact of 8-week cold-and warm water swimming training combined with cinnamon consumption on serum METRNL, HDAC5, and insulin resistance levels in diabetic male rats. *Helijon.* 2024; 10 (8): e29742. DOI: 10.1016/j.helijon.2024.e29742.
23. Yao Z., Lin P., Wang C., Wang K., Sun Y. Administration of metrnl delays the onset of diabetes in non-obese diabetic mice. *Endocr. J.* 2021; 68 (2): 179-88. DOI: 10.1507/endocrj.EJ20-0351.
24. Zheng S., Li Z., Song J., Wang P., Xu J., Hu W. et al. Endothelial METRNL determines circulating METRNL level and maintains endothelial function against atherosclerosis. *Acta Pharm. Sin. B.* 2023; 13 (4): 1568-87. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.12.008.
25. Jung T.W., Pyun D.H., Kim T.J., Lee H.J., Park E.S., Abd El-Aty A.M. et al. Meteorin-like protein (METRNL)/IL-41 improves LPS-induced inflammatory responses via AMPK or PPAR δ -mediated signaling pathways. *Adv. Med. Sci.* 2021; 66 (1): 155-61. DOI: 10.1016/j.admvs.2021.01.007.
26. Rebold M.R., Klede S., Taft M.H., Cai C.L., Field L.J., Lavine K.J. et al. Meteorin-like promotes heart repair through endothelial KIT receptor tyrosine kinase. *Science.* 2022; 376 (6599): 1343-7. DOI: 10.1126/science.abb3027.
27. Xu L., Cai Y., Wang Y., Xu C. Meteorin-Like (METRNL) Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury-Induced Cardiomyocytes Apoptosis by Alleviating Endoplasmic Reticulum Stress via Activation of AMPK-PAK2 Signaling in H9C2 Cells. *Med. Sci. Monit.* 2020; 26: e924564. DOI: 10.12659/MSM.924564.
28. Alkhairi I., Cherian P., Abu-Farha M., Madhoun A.A., Nizam R., Melhem M. et al. Increased expression of Meteorin-Like hormone in type 2 Diabetes and Obesity and its Association with Irisin. *Cells.* 2019; 8 (10). DOI: 10.3390/cells8101283.
29. Wang K., Li F., Wang C., Deng Y., Cao Z., Cui Y. et al. Serum levels of Meteorin-Like (Metrnl) are increased in patients with newly diagnosed type 2 diabetes Mellitus and are Associated with insulin resistance. *Med. Sci. Monit.* 2019; 25: 2337-43. DOI: 10.12659/MSM.915331.
30. Ding X., Chang X., Wang J., Bian N., An Y., Wang G. et al. Serum metrnl levels are decreased in subjects with overweight or obesity and are independently associated with adverse lipid profile. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2022; 13: 938341. DOI: 10.3389/fendo.2022.938341.
31. Pelletero S., Piquer-Garcia I., Ferrer-Curriu G., Puig R., Martínez E., Moreno P. et al. Opposite changes in meteorin-like and oncostatin m levels are associated with metabolic improvements after bariatric surgery. *Int. J. Obes. (Lond).* 2018; 42 (4): 919-22. DOI: 10.1038/ijo.2017.268.
32. Moradi N., Fadaei R., Roozbehkia M., Nourbakhsh M., Nourbakhsh M., Razzaghy-Azar M. et al. Meteorin-like protein and Asprosin Levels in children and adolescents with obesity and their relationship with insulin resistance and metabolic syndrome. *Lab. Med.* 2023; 54 (5): 457-63. DOI: 10.1093/labmed/lmac152.
33. Du Y., Ye X., Lu A., Zhao D., Liu J., Cheng J. et al. Inverse relationship between serum Metrnl levels and visceral fat obesity (VFO) in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2020; 161: 108068. DOI: 10.1016/j.diabres.2020.108068.
34. Liu M., Gao X., Tian Y., Li H., Yin Z., Han L. et al. Serum Metrnl is Decreased in Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease: A Case-Control Study. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2024; 17: 533-43. DOI: 10.2147/DMSO.S447127.
35. Chung H.S., Hwang S.Y., Choi J.H., Lee H.J., Kim N.H., Yoo H.J. et al. Implications of circulating Meteorin-like (Metrnl) level in human subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2018; 136: 100-7. DOI: 10.1016/j.diabres.2017.11.031.
36. Fouani F.Z., Fadaei R., Moradi N., Zandieh Z., Ansaripour S., Yekaninejad M.S. et al. Circulating levels of meteorin-like protein in polycystic ovary syndrome: a case-control study. *PLoS ONE.* 2020; 15 (4): e0231943. DOI: 10.1371/journal.pone.0231943.
37. Garcia-Beltran C., Navarro-Gascon A., Lopez-Bermejo A., Quesada-Lopez T., de Zegher F., Ibáñez L. et al. Meteorin-like levels are associated with active brown adipose tissue in early infancy. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2023; 14: 1136245. DOI: 10.3389/fendo.2023.1136245.
38. Saghebjoo M., Einalloo A., Mogharnasi M., Ahmadabadi F. The response of meteorin-like hormone and interleukin-4 in overweight women during exercise in temperate, warm and cold water. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2018; 36 (3). DOI: 10.1515/hmbci-2018-0027.
39. Alizadeh A., Alizadeh H. Downhill running exercise increases circulating level of myokine meteorin-like hormone in humans. *J. Sports Med. Phys. Fit.* 2022; 62 (5): 700-4. DOI: 10.23736/S0022-4707.21.12246-7.
40. Tayebi S.M., Golmohammadi M., Eslami R., Shakiba N., Costa P.B. The effects of Eight Weeks of Circuit Resistance Training on serum METRNL levels and Insulin Resistance in individuals with type 2 diabetes. *J. Diabetes Metab. Disord.* 2023; 22 (2): 1151-8. DOI: 10.1007/s40200-023-01225-1.
41. Yao C., Zhang H., Wang L., Li J. Correlation of serum Meteorin-like (Metrnl) level with type 2 diabetic peripheral neuropathy. *BMC Endocr. Disord.* 2024; 24 (1): 83. DOI: 10.1186/s12902-024-01616-2.
42. Fadaei R., Dadmanesh M., Moradi N., Ahmadi R., Shokoohi Nahrkhala J., Aghajani H. et al. Serum levels of subfatin in patients with type 2 diabetes mellitus and its association with vascular adhesion molecules. *Arch. Physiol. Biochem.* 2020; 126 (4): 335-40. DOI: 10.1080/13813455.2018.1538248.
43. Onalan E., Cavli C., Dogan Y., Onalan E., Gozel N., Buran I. et al. Low serum levels of meteorin-like/subfatin: an indicator of diabetes mellitus and insulin resistance? *Endocrinol. Pol.* 2020; 71 (5): 397-403. DOI: 10.5603/EP.a2020.0038.
44. El-Ashmawy H.M., Selim F.O., Hosny T.A.M., Almassry H.N. Association of low serum Meteorin like (Metrnl) concentrations with worsening of glucose tolerance, impaired endothelial function and atherosclerosis. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2019; 150: 57-63. DOI: 10.1016/j.diabres.2019.02.026.
45. Chen J., Li Z.Y., Xu F., Wang C.Q., Li W.W., Lu J. et al. Low Levels of Metrnl are Linked to the Deterioration of Diabetic Kidney Disease. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2024; 17: 959-67. DOI: 10.2147/DMSO.S452055.
46. Lappas M. Maternal obesity and gestational diabetes decrease Metrnl concentrations in cord plasma. *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* 2021; 34 (18): 2991-5. DOI: 10.1080/14767058.2019.1676713.
47. Dadmanesh M., Aghajani H., Fadaei R., Ghorban K. Lower serum levels of Meteorin-like/Subfatin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus are negatively associated with insulin resistance and inflammatory cytokines. *PLoS One.* 2018; 13 (9): e0204180. DOI: 10.1371/journal.pone.0204180.
48. Miao Z.W., Wang N., Hu W.J., Zheng S.L., Wang D.S., Chang F.Q. et al. Chronic vascular pathogenesis results in the reduced serum Metrnl levels in ischemic stroke patients. *Acta Pharmacol. Sin.* 2024; 45 (5): 914-25. DOI: 10.1038/s41401-023-01204-5.
49. Giden R., Yasak I.H. Meteorin-like protein decreases in acute coronary syndrome. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2023; 27 (1): 208-14. DOI: 10.26355/eurrev_202301_30873.
50. Ferrer-Curriu G., Rueda F., Revuelta-López E., García-García C., Codina P., Gálvez-Montón C. et al. Meteorin-like protein is associated with a higher risk profile and predicts a worse outcome in patients with STEMI. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed).* 2023; 76 (11): 891-900. DOI: 10.1016/j.rec.2023.03.015.
51. Liu Z.X., Ji H.H., Yao M.P., Wang L., Wang Y., Zhou P. et al. Serum Metrnl is associated with the presence and severity of coronary artery disease. *J. Cell Mol. Med.* 2019; 23 (1): 271-80. DOI: 10.1111/jcmm.13915.
52. Yasak I.H., Yilmaz M., Goktekin M.C., Giden R., Koyuncu İ. Meteorin-Like Protein Levels Decrease in Patients With Acute Ischaemic Stroke. *Cureus.* 2022; 14 (11): e32042. DOI: 10.7759/cureus.32042.



ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОНКОМАРКЕРОВ (СА 125, СА 15-3, СА 27.29, МСА) В СЛЮНЕ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет», 644099, г. Омск, Россия

Актуальность. В последнее время внимание исследователей привлекает возможность определения онкомаркеров в слюне взамен традиционной сыворотке/плазме крови. Цель работы: анализ изменения концентрации онкомаркеров CA125, CA15-3, CA 27.29 и МСА в слюне при РМЖ с учетом экспрессии рецептора HER2, а также подбор оптимальных комбинаций онкомаркеров с наибольшей диагностической чувствительностью и специфичностью.

Материал и методы. Проведено исследование на 165 добровольцах, разделенных на 2 группы: основная (рак молочной железы, $n=110$) и контрольная группа (условно здоровые, $n=55$). Выборка включала равное количество пациенток с разными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ. Для построения деревьев классификации использован метод полного перебора для одномерных ветвлений CART.

Результаты. Установлено, что комбинация маркеров CA125, CA15-3, CA27.29 и МСА в слюне обладает диагностической чувствительностью 92.73%, специфичностью 83.64% и общей точностью 89.70% при сравнении контрольной группы с группой пациентов с РМЖ. Эта же комбинация позволяет с относительно высокой общей точностью выявить группу с положительной экспрессией рецептора HER2: чувствительность 83.33%, специфичность 90.91%, общая точность 86.36%. Назначение CA125, CA15-3, CA27.29 и МСА по отдельности показало свою неэффективность при первичной диагностике РМЖ за счет большой доли ложноположительных результатов.

Заключение. Измерение в слюне перечисленной комбинации маркеров может помочь оптимизировать их использование в рутинной диагностике пациентов с РМЖ и мониторинге за их состоянием.

Ключевые слова: слюна; рак молочной железы; онкомаркеры; CA125; CA 15-3; CA 27.29; МСА; диагностическая значимость

Для цитирования: Дьяченко Е.И., Сарф Е.А., Бельская Л.В. Диагностическая значимость онкомаркеров (СА125, СА 15-3, СА 27.29, МСА) в слюне при раке молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (3): 163-171.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-163-171>

EDN: KIQHPP

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук, зав. научно-исследовательской лаб. биохимии; e-mail: belskaya@omgpu.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда «Диагностическая и прогностическая значимость аминокислотного профиля слюны при раке молочной железы», проект 23-15-00188.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.09.2024

Принята к печати 21.11.2024

Опубликовано 25.02.2025

Dyachenko E.I., Sarf E.A., Bel'skaya L.V.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SALIVARY TUMOR MARKERS (CA125, CA 15-3, CA 27.29, MCA) IN SALIVA IN BREAST CANCER

Omsk State Pedagogical University, 644099, Omsk, Russia

Background. Recently, the attention of researchers has been attracted by the possibility of determining tumor markers in saliva instead of traditional serum/blood plasma. The aim of the work: to analyze changes in the concentration of tumor markers CA125, CA15-3, CA 27.29 and MCA in saliva in breast cancer, taking into account the expression of the HER2 receptor, as well as the selection of optimal combinations of tumor markers with the highest diagnostic sensitivity and specificity.

Material and methods. The study was conducted on 165 volunteers divided into 2 groups: the main (breast cancer, $n = 110$) and the control group (conditionally healthy, $n = 55$). The sample included an equal number of patients with different molecular biological subtypes of breast cancer. To construct classification trees, the exhaustive search method for one-dimensional CART branches was used.

Results. It was found that the combination of markers CA125, CA15-3, CA27.29 and MCA in saliva has a diagnostic sensitivity of 92.73%, specificity of 83.64% and overall accuracy of 89.70% when comparing the control group with the group of patients with breast cancer. The same combination allows identifying the group with positive expression of the HER2 receptor with a relatively high overall accuracy: sensitivity 83.33%, specificity 90.91%, and overall accuracy 86.36%. The appointment of CA125, CA15-3, CA27.29 and MCA separately showed its ineffectiveness in the primary diagnosis of breast cancer due to the large proportion of false positive results.

Conclusion. Measuring the above combination of markers in saliva can help to optimize their use in routine diagnosis of patients with breast cancer and monitoring their condition.

Key words: saliva; breast cancer; tumor markers; CA125; CA 15-3; CA 27.29; MCA; diagnostic significance

For citation: Dyachenko E.I., Sarf E.A., Bel'skaya L.V. Diagnostic significance of salivary tumor markers (CA125, CA 15-3, CA 27.29, MCA) in breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 163-171 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-163-171>
EDN: KIQHPP

For correspondence: Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Head of Laboratory, Biochemistry Research Laboratory, Omsk State Pedagogical University; e-mail: belskaya@omgpu.ru

Information about authors:

Dyachenko E.I., <https://orcid.org/0009-0005-3081-3226>;

Sarf E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4918-6937>;

Bel'skaya L.V., <https://orcid.org/0000-0002-6147-4854>.

Acknowledgment. This research was funded by Russian Science Foundation, grant number 23-15-00188.

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

Received 30.09.2024

Accepted 21.11.2024

Published 25.02.2025

Введение. Классический подход при диагностике рака молочной железы (РМЖ) в настоящее время включает в себя общий осмотр пациента, билатеральную маммографию совместно с ультразвуковым исследованием молочных желез и регионарных зон, лабораторное обследование на общие показатели крови и определение мутаций BRCA1/2 [1]. Такой алгоритм диагностики хорошо зарекомендован и эффективен в повседневной медицинской практике. Однако вопрос применения онкомаркеров при первичной диагностике РМЖ и дальнейшем мониторинге состояния пациента в настоящее время является спорным [2,3]. Существует ряд иностранных исследований и рекомендаций в области диагностики РМЖ, в которых приведен перечень рекомендованных онкомаркеров (CA15-3, CA27.29, МСА, РЭА), а также и их возможные эффективные комбинации [4-7]. В тоже время на территории России данные комбинации не нашли применения, а применение отдельных онкомаркеров не показало своей должной эффективности [8].

В последнее время внимание исследователей привлекает возможность определения онкомаркеров не традиционно в сыворотке/плазме крови, а в слюне [9]. Была высказана гипотеза, что происхождение биомаркеров слюны при РМЖ, вероятно, связано с общим эмбриональным происхождением тканей слюнных и молочной желез [10]. Кроме того, с иммуногистологической точки зрения существует несколько сходств между тканями данных желез [11,12]. Обе ткани имеют на эпителиальных клетках рецепторы HER2/neu, а также рецепторы эстрогенов, прогестерона и андрогенов, сверхэкспрессия которых наблюдается при РМЖ [13].

Известно, что CA125 может быть потенциальным диагностическим маркером РМЖ в слюне с приемлемой чувствительностью и специфичностью [14]. Повышенные уровни CA15-3 были обнаружены в слюне у пациентов с РМЖ [15], при этом выявлена умеренная связь между сывороточным и слюнным уровнем CA15-3 ($r=0,56$; $p=<0,01$) [16]. Результаты нескольких исследований показывают, что выбранные маркеры, особенно при оценке в качестве диагностической панели, имеют потенциал для использования при первоначальном выявлении (в сочетании с маммографией и физическим обследованием) и/или для последующего мониторинга, а также в комплексном скрининге на выявление РМЖ [17].

Целью настоящего исследования являлся анализ

изменения концентрации онкомаркеров CA125, CA15-3, CA 27.29 и МСА в слюне при РМЖ с учетом экспрессии рецептора HER2, а также подбор оптимальных комбинаций онкомаркеров с наибольшей диагностической чувствительностью и специфичностью.

Материал и методы. В исследовании случай – контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 2 группы: основную (РМЖ, возраст 52.9 [38.2; 58.7] года) и контрольную группу (условно здоровые, возраст 46.1 [36.0; 58.0] лет).

Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения рассматривались: женский пол, возраст пациентов 30–80 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии невключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Пациенты основной группы и группы сравнения были госпитализированы для хирургического удаления опухоли. У добровольцев контрольной группы не было выявлено патологий молочных желез при плановом маммографическом и ультразвуковом исследовании. Исследование одобрено на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» (протокол № 15 от 21 июля 2016 г.).

У всех пациенток основной группы гистологически и цитологически была подтверждена инвазивная карцинома молочных желез следующих стадий: стадия I+II – 62 (56,4%), стадия III+IV – 48 (43,6%). Выборка включала равное количество пациенток с разными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ: пациентки распределены следующим образом: тройной негативный (THРМЖ) – 22 (20,0%), луминальный А – 22 (20,0%), луминальный В (HER2-отрицательный) – 22 (20,0%), луминальный В (HER2-положительный) – 22 (20,0%), нелуминальный РМЖ – 22 (20,0%). У добровольцев контрольной группы не было выявлено патологий молочных желез при плановом маммографическом и ультразвуковом исследовании.

Образцы слюны собирали однократно на этапе госпитализации строго до начала лечения. Сбор образцов проведен в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой в объеме 2 мл. Образцы слюны собирали путем сплевывания без дополнительной стимуляции в интер-

вале 8-10 часов утра, время максимальной секреции слюны, натощак после предварительного полоскания полости рта водой. Непосредственно после сбора образцы центрифугировали при $10,000 \times g$ в течение 10 минут (ЦЛн-16), отбирали 1 мл верхнего слоя, переносили в пробирки типа Эппендорф и хранили в морозильной камере при температуре -80°C до проведения анализа.

Содержание в слюне онкомаркеров CA125, CA15-3, CA27.29 и MCA определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов «Хема» (Россия) на анализаторе Thermo Fisher Multiskan FC (Waltham, США). Объем аликовты во всех случаях составил 100 мкл, анализ и расчет концентрации муцинов (Е/мл) проведен в соответствии с инструкцией производителя. Процедура валидации каждой тест-системы включала четыре аналитических серии. В составе каждой аналитической серии были проанализированы калибровочные стандарты для построения градуировочной зависимости, а также необходимое количество образцов для контроля качества с определенной концентрацией соответствующего онкомаркера. Каждый образец анализировали в двух повторах.

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Предварительно проведена проверка характера распределения и гомогенности дисперсий в группах. Согласно тесту Шапиро-Уилка содержание всех определяемых параметров не соответствует нормальному распределению ($p<0.05$). Проведённый тест на гомогенность дисперсий в группах (тест Бартлетта) позволил отклонить гипотезу, что дисперсии гомогенны по группам ($p<0.0001$). Поэтому для обработки полученных данных были применены непараметрические методы статистики. Описание выборки производили с помощью медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми

при $p<0.05$.

Для построения деревьев классификации использован метод полного перебора для одномерных ветвлений CART (Statistica 10.0, StatSoft). Классификация проводилась на 2-х группах («РМЖ и Контроль», «HER2(-) и HER2(+))» и на 3-х группах («РМЖ HER2(-), РМЖ HER2(+) и Контроль»). Построение дерева классификации происходит по следующему алгоритму: (1) выбирается признак, по которому происходит разделение выборки (концентрации CA125, CA15-3, CA27.29 и MCA в слюне, выбирается один из признаков); (2) выбирается пороговое значение для этого признака; (3) выборка разделяется на две части: объекты, у которых значение признака меньше или равно порогу, и объекты, у которых значение признака больше порога; (4) для каждой из двух полученных подвыборок рекурсивно повторяются шаги 1–3, пока не будет достигнут критерий остановки (например, глубина дерева); (5) в листе дерева выводится ответ (отнесение объектов к определенной группе). На приведенных диаграммах около каждой вершины указаны условия ветвления, диаграмма внутри каждого листа показывает результат классификации: если все наблюдения классифицированы правильно, то столбик, соответствующий прогнозируемому классу, будет высоким, а остальные – маленькими. Красным цветом выделены листы, на которых ветвление заканчивается. При выборе метода CART было принято во внимание, что в процессе отбора признаков в древовидных решениях учитывается их мультиколлинеарность. При построении дерева автоматически отфильтровываются остаточные или дополнительные признаки, а в случае наличия сильной корреляционной взаимосвязи между признаками в структуру дерева включается только один из них.

Результаты. При сравнении подгруппы пациентов с РМЖ и контрольной группы показано, что при РМЖ в слюне повышается концентрация CA-125, тогда как концентрации остальных онкомаркеров понижаются (табл.1). Статистически значимое изменение показано только для CA-125 и CA27.29.

Таблица 1

Концентрация онкомаркеров в слюне при РМЖ и контроле

Онкомаркер	РМЖ (n=110)	Контроль (n=55)	p-value
CA-125, Е/мл	351.0 [254.9; 448.7]	291.0 [169.2; 401.9]	$p=0.0384$
CA15-3, Е/мл	31.0 [14.1; 83.6]	38.7 [15.5; 86.7]	-
CA27.29, Е/мл	2.66 [1.31; 6.47]	3.31 [2.06; 7.43]	$p=0.0332$
MCA, Е/мл	16.61 [7.08; 47.11]	22.21 [6.75; 87.49]	-

Установлено, что концентрация всех исследуемых онкомаркеров зависит от экспрессии рецептора HER2 (табл.2). Так, при HER2-положительных подтипах РМЖ наблюдается статистически значимое снижение CA27.29 и MCA по сравнению с контрольной группой (-56.5% и -65.2% соответственно). Концентрация CA15-3 также снижается (-48.8%, $p=0.1786$), но

в меньшей степени, при этом концентрация CA-125 растет (+34.7%).

На первом этапе была проверена применимость онкомаркеров для диагностики РМЖ в классическом варианте при использовании в качестве порогового значения медианы содержания соответствующего маркера в контрольной группе. ROC-анализ показал, что точность

классификации варьирует в достаточно широких преде-

лах: от 56.1% для CA15-3 до 74.2% для MCA (рис.1).

Таблица 2

Концентрация онкомаркеров в слюне при РМЖ в зависимости от экспрессии рецептора HER2

Онкомаркер	HER2(-), n=66 (Группа 1)	HER2(+), n=44 (Группа 2)	p-value
CA-125, Е/мл	306.7 [215.9; 412.2]	392.0 [323.8; 520.1]	p1-2=0.0046* p2-K=0.0014**
CA15-3, Е/мл	37.4 [18.5; 84.7]	19.8 [9.1; 78.3]	p1-2=0.0327
CA27.29, Е/мл	3.83 [1.91; 7.23]	1.44 [1.05; 3.72]	p1-2=0.0005 p2-K=0.0001
MCA, Е/мл	18.00 [9.36; 56.78]	7.73 [2.81; 33.30]	p1-2=0.0026 p2-K=0.0060

Примечание. Различия статистически значимы при $p<0,05$. * - показаны значения p-value для сравнения HER2(-) и HER2(+) подгрупп, ** - показаны p-value при сравнении с контрольной группой (K).

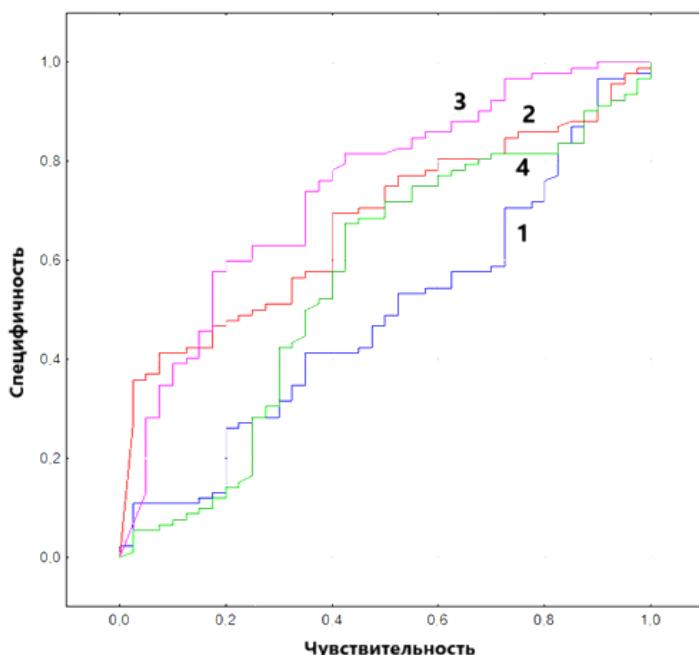


Рис.1. Результаты ROC-анализа применения отдельных онкомаркеров слюны для диагностики РМЖ: 1 – CA15-3 (AUC=56.1%), 2 – CA27.29 (AUC=72.2%), 3 – MCA (AUC=74.2%), 4 – CA-125 (AUC=58.2%).

Для повышения точности классификации мы применили методы машинного обучения для построения классификатора как для отдельных онкомаркеров, так и для их возможных комбинаций. Результаты, полученные на разных методах машинного обучения, были сопоставимы, поэтому мы выбрали для их представления метод построения деревьев решений как наиболее наглядный при прочих равных условиях.

На следующем этапе были построены деревья решения и рассчитаны диагностические характеристики исследуемых онкомаркеров слюны для выбора оптимального маркера РМЖ и/или комбинации маркеров без учета экспрессии HER2 (табл.3). Интересно отметить, что чувствительность во всех случаях выше 80% и достигает максимальных значений при комбинации CA15-3 и CA27.29. Специфичность же существенно ниже (табл.3), при этом только в двух комбинациях превышает 80%. Однако с учетом более высокой общей точности наиболее перспективив-

ной является комбинация всех четырех исследуемых онкомаркеров.

Дерево решений при использовании всех четырех онкомаркеров (CA15-3 + CA27.29 + MCA + CA-125) приведено на рис.2. Дерево имеет достаточно сложную структуру и содержит 17 ветвлений.

ROC-анализ для комбинации четырех онкомаркеров показал общую точность 84.8%, что несколько ниже значения, полученного при построении дерева решений (89.7%, см. табл.3). Дополнительно проведена проверка точности классификации для случая использования комбинации четырех онкомаркеров на независимой выборке (15 пациентов с РМЖ и 15 здоровых добровольцев), чувствительность составила 86.7%, специфичность – 73.3%. Полученные результаты в целом подтверждают наблюдение, что при валидации значения чувствительности и специфичности обычно оказываются примерно на 10% хуже расчетных значений.

Таблица 3

Сравнение диагностических характеристик при использовании отдельных онкомаркеров и их комбинаций для определения РМЖ без учета экспрессии рецептора HER2

ОнкоМаркер	Чувствительность, %	Специфичность, %	Общая точность, %
CA-125	90.00	58.18	79.39
CA15-3	90.00	61.82	80.61
CA27.29	84.55	74.55	81.21
MCA	95.45	58.18	83.03
CA15-3 + CA27.29	97.27	56.36	83.64
CA15-3 + MCA	93.64	63.64	83.64
CA27.29 + MCA	87.27	70.91	75.76
CA15-3 + CA-125	89.09	65.45	81.21
CA27.29 + CA-125	90.00	70.91	83.64
MCA + CA-125	82.73	81.82	82.42
CA15-3 + CA27.29 + MCA	93.64	54.55	80.61
CA15-3 + CA27.29 + MCA + CA-125	92.73	83.64	89.70

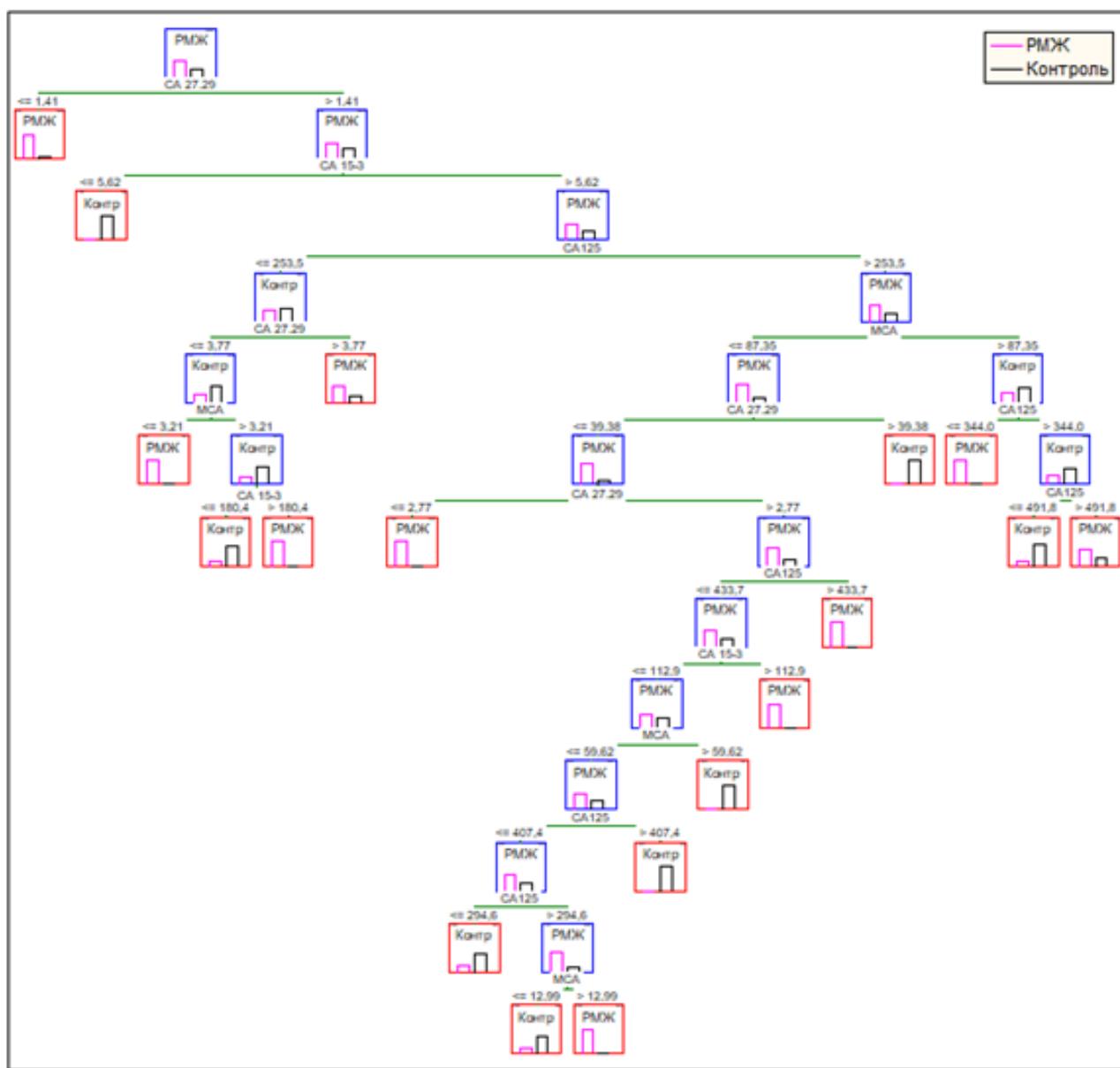


Рис.2. Дерево решений для классификации на две подгруппы (РМЖ и контроль).

Далее для подгруппы РМЖ были построены деревья решения для классификации HER2-положительных и отрица-

тельных подтипов (табл.4). Пример дерева решений с использованием всех четырех онкомаркеров приведен на рис.3.

Таблица 4

Возможность разделения подгрупп РМЖ с разным статусом экспрессии рецептора HER2

Онкомаркер	Верно классифицированы HER2(-), %	Верно классифицированы HER2(+), %	Общая точность, %
CA-125	87.88	61.36	77.27
CA15-3	86.36	72.73	80.91
CA27.29	87.88	84.09	86.36
MCA	90.91	65.91	80.91
CA15-3 + CA27.29 + MCA	89.39	75.00	83.64
CA15-3 + CA27.29 + MCA + CA-125	83.33	90.91	86.36

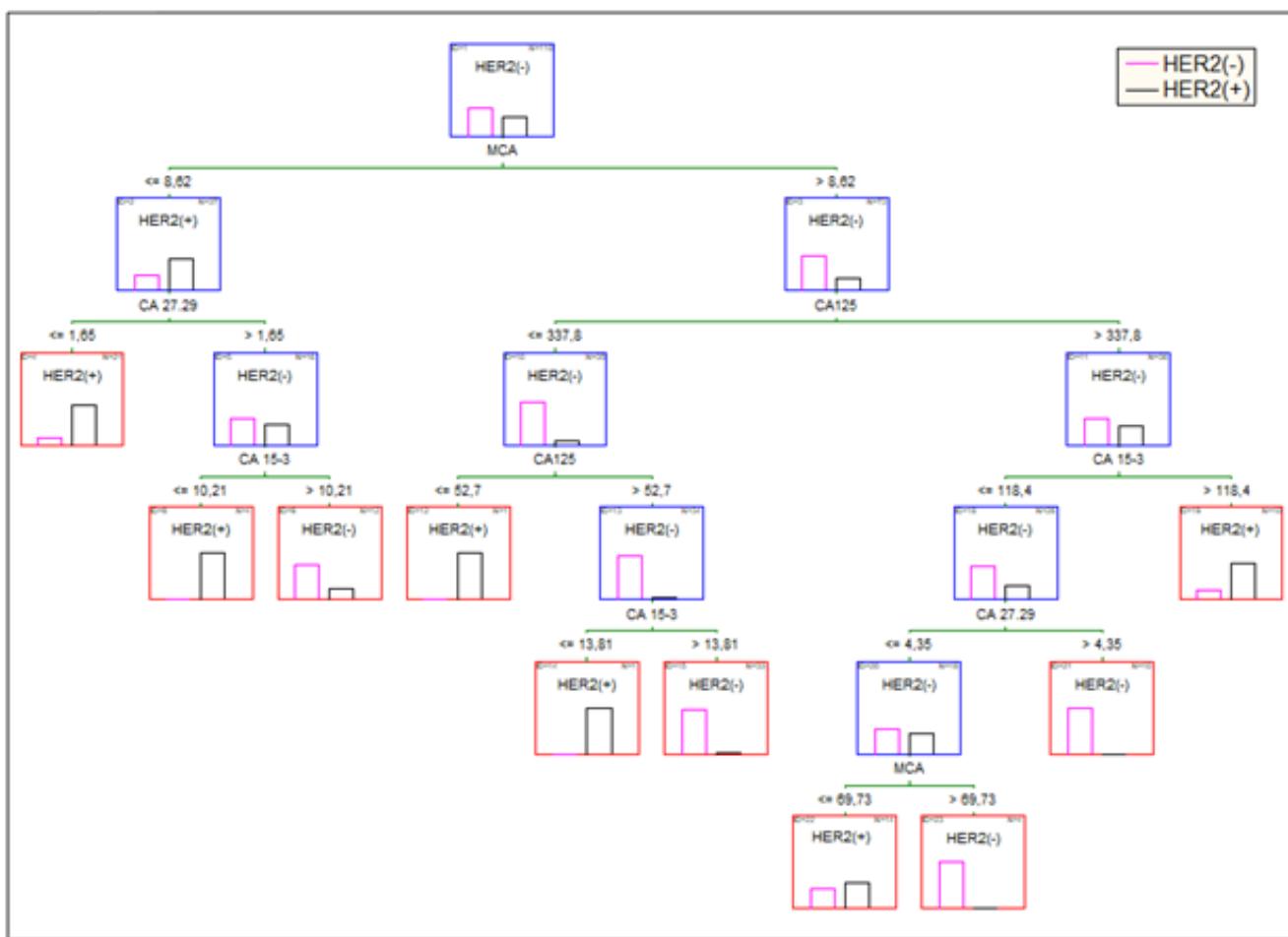


Рис.3. Дерево решений для классификации HER2-положительных и HER2-отрицательных подтипов РМЖ.

На заключительном этапе исследования нами построено дерево решений для классификации с учетом экспрессии HER2 и контроля (рис.4).

В данном случае оптимальной комбинацией онкомаркеров также является комбинация четырех показателей. Тестирование алгоритма показало, что чувствительность определения РМЖ составила 93.63%, при этом для HER2(-) и HER2(+) она составила 75.76 и 75.00% соответственно. Специфичность составила

65.45%. Следует отметить, что только один пациент с HER2(+) был ошибочно классифицирован как здоровый, тогда как в подгруппе HER2(-) число ошибок было выше (6 пациентов). Из 19 ошибочно классифицированных здоровых добровольцев 14 было отнесено к HER2(-) и только 5 к HER2(+). Таким образом, точность выявления HER2-положительного РМЖ с использованием определения комбинации онкомаркеров CA15-3 + CA27.29 + MCA + CA-125 в слюне достаточно высока.

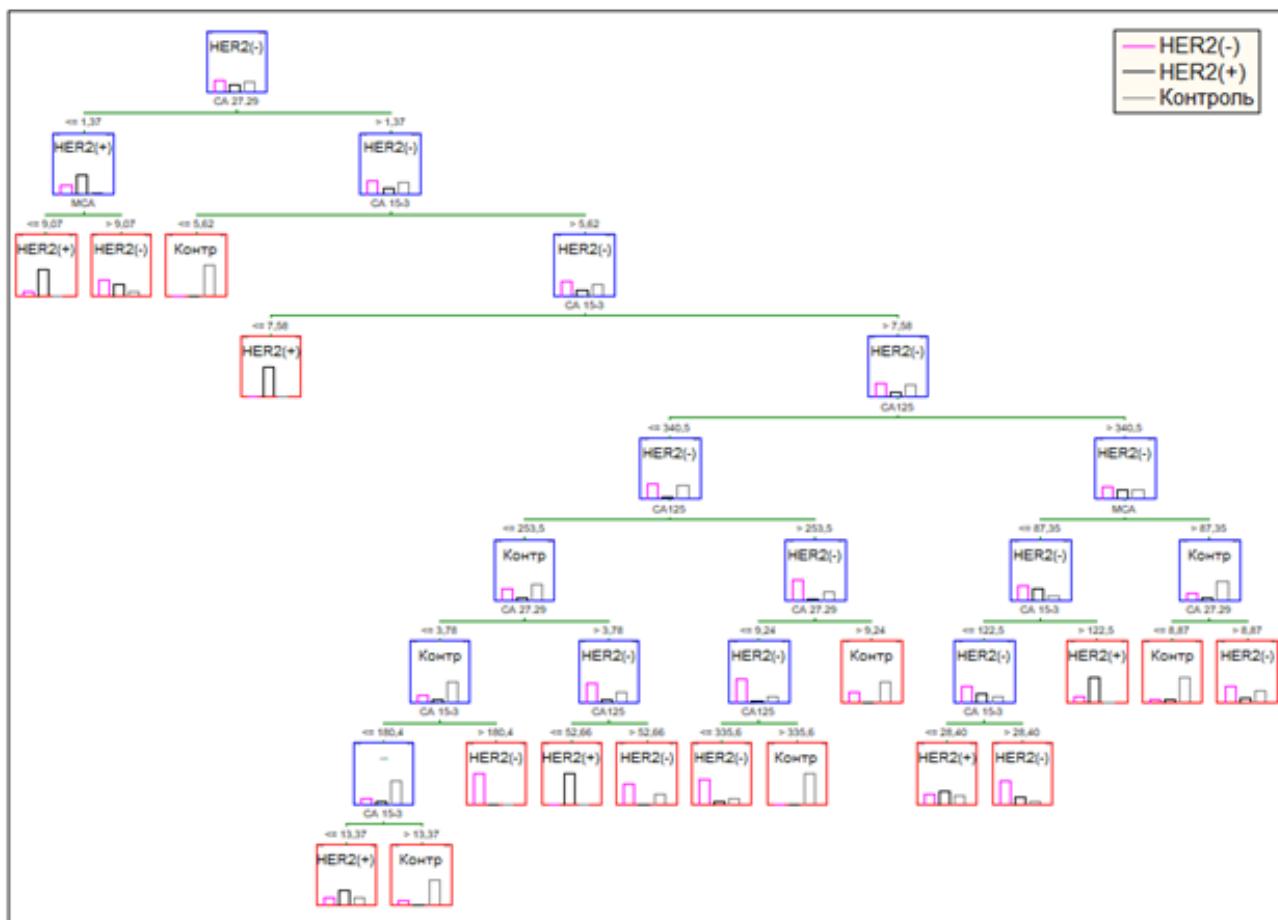


Рис. 4. Дерево решений для классификации HER2-положительных и HER2-отрицательных подтипов РМЖ и здорового контроля.

Обсуждение. Показана интересная закономерность снижения содержания в слюне онкомаркеров CA15-3, CA27.29, MCA и повышение содержания CA125 при РМЖ по сравнению с контрольной группой (см. табл.1). Общей характеристикой онкомаркеров CA125, CA15-3, CA27.29, MCA является их принадлежность к муцинам. CA15-3, CA27.29 и MCA объединены в одно семейство трансмембранных муцинов MUC1 за счет наличия схожих иммунодоминантных пептидных повторов (эпитопов) на данной молекуле [18-20]. Антиген CA125 является муцин-гликопротеином MUC16, также относящийся к группе мембранных-связанных муцинов [21]. Разнонаправленное изменение концентрации исследуемых онкомаркеров, вероятно обусловлена их принадлежностью к разным группам муцинов. Так, известно, что MUC16 (CA125) экспрессируется в слизистой оболочке носа человека и эпителиальных клетках роговицы [22-24], тогда как единственными местами синтеза MUC1 в полости рта являются протоки малых слюнных желез [25]. Поскольку фильтрация муцинов через гемато-саливарный барьер из-за их большой молекулярной массы (300-450 кДа) затруднена [26], мы предполагаем, что изменение их концентрации происходит на локальном уровне в слюне [27].

Нами была выявлена разница в содержании онкомаркеров в слюне в зависимости от экспрессии рецептора HER2 (табл.2). Известно, что аберрантная сверхэк-

спрессия MUC1 и рецептора HER2 часто наблюдается при РМЖ [28]. РМЖ с положительной экспрессией рецептора HER2 обладает агрессивным течением за счет активной пролиферации клеток через активацию сигнального пути МАРК [29,30], повреждения близлежащей к опухоли здоровой ткани, тем самым стимулируя иммунный ответ [31]. Кроме того, сами опухолевые клетки несут антигенные свойства, также вызывающие реакцию со стороны иммунной системы [32]. В нашем исследовании мы наблюдаем снижение содержания онкомаркеров CA15-3, CA27.29, MCA и повышение CA125 при HER2-положительном РМЖ. Известно, что муцины обладают противовоспалительным эффектом, тогда как опухоль-ассоциированные муцины в результате снижения содержания сиаловых кислот, уменьшения длины и плотности гликанов в экстрацеллюлярном домене, обнажают свои эпитопы, обладающие иммунореактивным эффектом [33-36]. Опухоль-ассоциированные муцины через активацию провоспалительных интерлейкинов могут подавлять синтез патологически неизмененных муцинов, в том числе в слюнных железах [37,38]. Мы предполагаем, что при наиболее агрессивном молекулярно-биологическом подтипе РМЖ количество опухоль-ассоциированных муцинов увеличивается, стимулируя выработку цитокинов. Увеличенное количество цитокинов с легкостью проходит гемато-саливарный барьер и уже здесь реализуется

классический тип регуляции экспрессии мукопротеинов на физиологически неизмененных нормальных клетках, при которых цитокины подавляют экспрессию мукопротеинов [39]. Информации об экспрессии MUC16 при РМЖ в настоящее время нет [40]. При этом известно, что MUC16 может играть ключевую роль в продвижении воспалительной сигнализации при раке и его концентрация в слюне будет расти при любом онкологическом заболевании, в том числе при РМЖ [41].

На следующем этапе мы проверили диагностическую чувствительность, специфичность и общую точность каждого онкомаркера для поиска оптимального решения в назначении и интерпретации изменения их содержания в слюне при РМЖ. Онкомаркеры CA125, CA15-3, CA27.29 и МСА обладают относительно высокой чувствительностью и низкой специфичностью. Высокий процент ложноположительных результатов связан биологическими особенностями данных маркеров. Например, CA125 в основном экспрессируется опухолевыми клетками яичников. При этом в норме этот маркер экспрессируется эпителиальными клетками эндометрия, брюшины, плевры, перикарда, яичек, желудочно-кишечного тракта, в том числе и эпителиальными клетками ротовой полости [42]. CA125 может повышаться при таких физиологических состояниях как период менструации, первый триместр беременности, послеродовой период, при фибромиомах и эндометриозе [43]. Высокое содержание CA125 в слюне может быть косвенным образом связано с РМЖ за счет общих изменений, протекающих в организме при данной патологии и не являться специфичным.

Важной задачей является повышение диагностической специфичности и общей точности при первичной диагностике пациентов на наличие РМЖ, улучшение прогнозирования течения и исходов, оптимизированный подход при назначении лечения и мониторинг ответа на терапевтическое и хирургическое вмешательство. Для решения этой задачи мы использовали математическую модель с подбором вариантов дерева решений. В данной модели поочередно осуществляется анализ каждого онкомаркера в отдельности и всех возможных комбинаций между ними с поиском максимального процента правильно классифицированных групп по наличию или отсутствию РМЖ, а также на правильное определение группы пациентов с наличием или отсутствием экспрессии рецептора HER2. Интересно отметить, что комбинация онкомаркеров CA125, CA15-3, CA27.29 и МСА сохраняет относительно высокую чувствительность 92,73% и повышает процент специфичности до 83,64%, тем самым уменьшая вероятность ложноположительных результатов. Общая точность комбинации составила 89,70%. Интересным образом изменяется диагностическая точность при использовании маркеров CA125 и МСА, обладающих низкой специфичностью. При их комбинации специфичность повышается с 58,18% до 81,82% в совокупности. Общая точность при этом составляет 82,42%. При сравнении процента верно классифицированных пациентов по статусу HER2(+) и HER2(-), комплексное применение онкомаркеров CA125, CA15-3, CA27.29 и МСА с высоким процентом в 90,91% верно классифицирует группу пациентов с положительной экспрессией HER2 рецептора.

Ограничения исследования. Приведенные деревья решений являются примерами и их структура на практике будет отличаться от предложенной, особенно при увеличении размера обучающей выборки. Пороговые значения для отдельных признаков также могут меняться в зависимости от используемой тест-системы, поэтому структура дерева (или другого метода машинного обучения) должна устанавливаться индивидуально и периодически корректироваться.

Заключение. Результаты нашего исследования показывают, что комбинация маркеров CA125, CA15-3, CA27.29 и МСА в слюне обладает наибольшей диагностической чувствительностью, специфичностью и общей точностью при сравнении контрольной группы с группой пациентов с РМЖ. Эта же комбинация позволяет с относительно высокой чувствительностью, специфичностью и общей точностью выявить группу с положительной экспрессией рецептора HER2. Назначение CA125, CA15-3, CA27.29 и МСА по отдельности показало свою неэффективность при первичной диагностике РМЖ за счет большой доли ложноположительных результатов. Однако измерение в слюне перечисленной комбинации маркеров может помочь оптимизировать их использование в рутинной диагностике пациентов с РМЖ и мониторинге за их состоянием.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 2-7, 9-42 СМ. REFER-ENCES)

1. Тюляндина С.А., Артамонова Е.В., Жигулов А.Н., Жукова Л.Г., Королева И.А., Пароконная А.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Практические рекомендации RUSSCO. *Злокачественные опухоли*. 2023; 13 (1): 157–200. DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200.
8. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Дашиян Г., Бессонов А., Палтуев Р., Семиглазова Т. М. и др. Опухолевые маркеры при раке молочной железы. *Врач*. 2011; 12: 2-7.

REFERENCES

1. Tyulyandin S.A., Artamonova E.V., Zhigulev A.N., Zhukova L.G., Koroleva I.A., Parokonnaya A.A. Practical recommendations for drug treatment of breast cancer. Practical recommendations RUSSCO. *Zlokachestvennye opukholi*. 2023; 13 (1): 157–200. DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200. (in Russian)
2. Heylen J., Punie K., Smeets A., Neven P., Weltens C., Laenen A., Wildiers H. Elevated CA 15.3 in Newly Diagnosed Breast Cancer: A Retrospective Study. *Clin. Breast Cancer*. 2022; 22 (6): 579-87. DOI: 10.1016/j.clbc.2022.04.007.
3. Di Gioia D., Blankenburg I., Nagel D., Heinemann V., Stieber P. Tumor markers in the early detection of tumor recurrence in breast cancer patients: CA 125, CYFRA 21-1, HER2 shed antigen, LDH and CRP in combination with CEA and CA 15-3. *Clin. Chim. Acta*. 2016; 461: 1-7. DOI: 10.1016/j.cca.2016.07.014.
4. Rack B., Schindlbeck C., Jückstock J., Genss E.M., Hepp P., Lorenz R., Tesch H., Schneeweiss A., Beckmann M.W., Lichtenegger W., Sommer H., Friese K., Janni W. SUCCESS Study Group. Prevalence of CA 27.29 in primary breast cancer patients before the start of systemic treatment. *Anticancer Res*. 2010; 30 (5): 1837-41. DOI: 10.21873/anticanres.11034.
5. Beveridge R. A. Review of clinical studies of CA 27.29 in breast cancer management. *Int. J. Biol. Markers*. 1999; 14: 36-9. DOI: 10.1177/172460089901400107.
6. Aspeslet L., Ballok J., Mansbach L., Maimonis P. J. A technical and clinical evaluation of 3 commercial MUC-1 breast cancer marker assays. *Tumor Biology*. 1998; 19: 13.

7. Nicolini A., Tartarelli G., Carpi A., Metelli M. R., Ferrari P., Anselmi L., Conte M., Berti P., Miccoli P. Intensive post-operative follow-up of breast cancer patients with tumour markers: CEA, TPA or CA15.3 vs MCA and MCA-CA15.3 vs CEA-TPA-CA15.3 panel in the early detection of distant metastases. *BMC Cancer.* 2006; 6: 269. DOI: 10.1186/1471-2407-6-269.
8. Semiglazov V.F., Semiglazov V.V., Dashyan G., Bessonov A., Paltuev R., Semiglazova T. et al. Tumor markers in breast cancer. *Vrach.* 2011; 12: 2-7. (in Russian)
9. Dai X., Zhang X., Lu P. Toward a holistic view of multiscale breast cancer molecular biomarkers. *Biomark.* 2019; 13 (17): 1509-33. DOI: 10.2217/bmm-2019-0143.
10. Lau C.S., Wong D.T. Breast cancer exosome-like microvesicles and salivary gland cells interplay alters salivary gland cell-derived exosome-like microvesicles in vitro. *PLoS One.* 2012; 7 (3): e33037. DOI: 10.1371/journal.pone.0033037.
11. Bishop J.A. Unmasking MASC: bringing to light the unique morphologic, immunohistochemical and genetic features of the newly recognized mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands. *Head. Neck. Pathol.* 2013; 7 (1): 35-9. DOI: 10.1007/s12105-013-0429-0.
12. Balatti V., Oghumu S., Bottoni A., Maharry K., Cascione L., Fadda P., Parwani A., Croce C., Iwenofu O.H. MicroRNA profiling of salivary duct carcinoma versus Her2/Neu overexpressing breast carcinoma identify miR-10a as a putative breast related oncogene. *Head. Neck. Pathol.* 2019; 13 (3): 344-54. DOI: 10.1007/s12105-013-0429-0.
13. Streckfus C.F., Bigler L. A catalogue of altered salivary proteins secondary to invasive ductal carcinoma: a novel *in vivo* paradigm to assess breast cancer progression. *Scientific Reports.* 2016; 6: 30800. DOI: 10.1038/srep30800.
14. López-Jornet P., Aznar C., Ceron J., Asta T. Salivary biomarkers in breast cancer: a cross-sectional study. *Support Care Cancer* 2021; 29 (2): 889-96. DOI: 10.1007/s00520-020-05561-3.
15. Pink R., Simek J., Vondrákova J., Faber E., Michl P., Pazdera J., Indrak K. Saliva as a diagnostic medium. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* 2009; 153 (2): 103-10. DOI: 10.5507/bp.2009.017.
16. Assad D.X., Mascarenhas E.C.P., Normando A.G.C., Chardin H., Barra G.B., Pratesi R. et al. Correlation between salivary and serum CA15-3 concentrations in patients with breast cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 2020; 13 (2): 155-61. DOI: 10.3892/mco.2020.2062.
17. Streckfus C. Salivary biomarkers to assess breast cancer diagnosis and progression: are we there yet? Saliva and salivary diagnostics. *IntechOpen.* 2019. Available at: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85762> (Accessed: 30 September 2024).
18. Gion M., Mione R., Leon A.E., Dittadi R. Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. *Clin. Chem.* 1999; 45: 630-7.
19. Houser S., Maimonis P. An analytical and clinical comparison of ACS:180® BR with two other breast tumor marker assays. *Clin. Chem.* 1997; 43:1477.
20. Leon A., Mione R., Gion M. ACS:180 BR Assay: Evaluation in primary breast cancer in comparison with CA 15.3. *Tumor Biology.* 1998; 19: 65.
21. Scholler N., Urban N. CA125 in ovarian cancer. *Biomark. Med.* 2007; 1(4): 513-23. DOI: 10.2217/17520363.1.4.513.
22. Teshima T.H., Ianez R.F., Coutinho-Camillo C.M., Buim M.E., Soares F.A., Lourenço S.V. Development of human minor salivary glands: expression of mucins according to stage of morphogenesis. *J. Anat.* 2011; 219(3): 410-7. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2011.01405.x.
23. Davies J.R., Kirkham S., Svitacheva N., Thornton D.J., Carlstedt I. MUC16 is produced in tracheal surface epithelium and submucosal glands and is present in secretions from normal human airway and cultured bronchial epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39 (10): 1943-54. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.05.013.
24. Woo H.J., Bae C.H., Song S.Y., Lee H.M., Kim Y.D. Expression of membrane-bound mucins in human nasal mucosa: different patterns for MUC4 and MUC16. *Arch. Otolaryngol. Head Neck. Surg.* 2010; 136(6): 603-9. DOI: 10.1001/archoto.2010.71.
25. Sengupta A., Valdramidou D., Huntley S., Hicks S.J., Carrington S.D., Corfield A.P. Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. *Arch. Oral. Biol.* 2001; 46(6): 529-38. DOI: 10.1016/s0003-9969(01)00010-3.
26. Yan W., Apweiler R., Balgley B.M., Boontheung P., Bundy J.L., Cargile B.J. et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics Clin. Appl.* 2009; 3(1): 116-34. DOI: 10.1002/prca.200800140.
27. Dyachenko E.I., Bel'skaya L.V. Salivary transmembrane mucins of the MUC1 family (CA 15-3, CA 27.29, MCA) in breast cancer: The effect of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). *Cancers.* 2024; 16(20): 3461. DOI: 10.3390/cancers16203461.
28. Pang Z., Dong X., Deng H., Wang C., Liao X., Liao C., Liao Y., Tian W., Cheng J., Chen G., Yi H., Huang L. MUC1 triggers lineage plasticity of Her2 positive mammary tumors. *Oncogene.* 2022; 41(22): 3064-78. DOI: 10.1038/s41388-022-02320-y.
29. Kirouac D.C., Du J., Lahdenranta J., Onsum M.D., Nielsen U.B., Schoeberl B., McDonagh C.F. HER2+ cancer cell dependence on PI3K vs. MAPK signaling Axes Is determined by expression of EGFR, ERBB3 and CDKN1B. *PLoS Comput. Biol.* 2016; 12(4): e1004827. DOI: 10.1371/journal.pebi.1004827.
30. Pan L., Li J., Xu Q., Gao Z., Yang M., Wu X., Li X. HER2/PI3K/AKT pathway in HER2-positive breast cancer: A review. *Medicine (Baltimore).* 2024; 103(24): e38508. DOI: 10.1097/MD.00000000000038508.
31. van den Ende N.S., Smid M., Timmermans A., van Brakel J.B., Hansum T., Foekens R., Trapman A.M.A.C., Heemskerk-Gerritsen B.A.M., Jager A., Martens J.W.M., van Deurzen C.H.M. HER2-low breast cancer shows a lower immune response compared to HER2-negative cases. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 12974. DOI: 10.1038/s41598-022-16898-6.
32. Amens J.N., Bahçecioglu G., Zorlutuna P. Immune System Effects on Breast Cancer. *Cell Mol. Bioeng.* 2021; 14(4): 279-92. DOI: 10.1007/s12195-021-00679-8.
33. Nath S., Mukherjee P. MUC1: A multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol. Med.* 2014; 20: 332-42. DOI: 10.1016/j.molmed.2014.02.007.
34. Sheng Y. H., Triyana S., Wang R., Das I., Gerloff K., Florin T. H., Sutton P., McGuckin M. A. MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal. Immunol.* 2013; 6: 557-68. DOI: 10.1038/mi.2012.98.
35. Choi S., Park Y. S., Koga T., Treloar A., Kim K. C. TNF- α is a key regulator of MUC1, an anti-inflammatory molecule, during airway *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011; 44: 255-60. DOI: 10.1165/rccm.2009-0323OC.
36. Li Y., Dinwiddie D. L., Harrod K. S., Jiang Y., Kim K. C. Anti-inflammatory effect of MUC1 during respiratory syncytial virus infection of lung epithelial cells in vitro. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2010; 298: L558-563. DOI: 10.1152/ajplung.00225.2009.
37. Altschuler Y., Kinlough C. L., Poland P. A., Bruns J. B., Apodaca G., Weisz O. A., Hughey R. P. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol. Biol. Cell.* 2000; 11: 819-31. DOI: 10.1091/mbc.11.13.819.
38. Hollingsworth M. A., Swanson B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4: 45-60. DOI: 10.1038/nrc1251.
39. Sheng Y.H., Triyana S., Wang R., Das I., Gerloff K., Florin T.H., Sutton P., McGuckin M.A. MUC1 and MUC13 differentially regulate epithelial inflammation in response to inflammatory and infectious stimuli. *Mucosal. Immunol.* 2013; 6(3): 557-68. DOI: 10.1038/mi.2012.98.
40. Jonckheere N., Vincent A., Neve B., Van Seuningen I. Mucin expression, epigenetic regulation and patient survival: A toolkit of prognostic biomarkers in epithelial cancers. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2021; 1876(1): 188538. DOI: 10.1016/j.bbcan.2021.188538.
41. Wu Y.M., Nowack D.D., Omenn G.S., Haab B.B. Mucin glycosylation is altered by pro-inflammatory signaling in pancreatic-cancer cells. *J. Proteome Res.* 2009; 8(4): 1876-86. DOI: 10.1021/pr0800379.
42. Lou Y., Liao J., Shan W., Xu Z., Chen X., Guan J. Menopausal status combined with serum CA125 level significantly predicted concurrent endometrial cancer in women diagnosed with atypical endometrial hyperplasia before surgery †. *Diagnostics (Basel).* 2021; 12(1): 6. DOI: 10.3390/diagnostics12010006.
43. Huang X., Lin H., Zhao Y., Wang P., Ying H., Zhang S., Liu L. MUC16 can Predict the Pregnancy Outcomes in Human and Intraperitoneal Administration of MUC16 can Rescue Pregnancy Losses in Mouse Models. *Reprod. Sci.* 2024; 31(8): 2354-70. DOI: 10.1007/s43032-024-01550-7.

ГЕМАТОЛОГИЯ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Вареха Н.В.¹, Стуклов Н.И.¹, Гимадиев Р.Р.^{1,2,3}, Гордиенко К.В.³, Щеголев О.Б.²,
Макарчев А.И.³, Гуркина А.А.¹

<https://elibrary.ru/rfxkfc>

СОЗДАНИЕ И ОЦЕНКА ЗНАЧИМОСТИ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ФЕРРИТИНА СЫВОРОТКИ С ПОМОЩЬЮ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ В РАЗНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ГРУППАХ

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», 117198, Москва, Россия;

²ООО «ЛабХаб», 119002, Москва, Россия;

³ГНЦ РФ - ИМБП РАН, 123007, Москва, Россия

Изучение возможностей искусственного интеллекта (ИИ) является актуальной задачей с точки зрения разработки оптимальной скрининг стратегии, определения групп риска, использования менее дорогостоящих, более доступных лабораторных тестов для оценки статуса железа в организме.

Цель работы: изучить эффективность применения инструментов машинного обучения (МО) для оценки статуса железа по прогнозируемому уровню ферритина сыворотки (ФС) на основе демографических данных (пол и возраст), клинического анализа крови (КАК), содержания С-реактивного белка (СРБ) и известного уровня ФС. Для проведения МО с помощью ИИ использован набор данных 52 158 пациентов. Полученные данные представлены в виде Первой модели регрессии для определения предполагаемой концентрации ФС и Второй модели классификации групп пациентов в зависимости от различного статуса железа по уровню известного ФС: 0) <15,0; 1) 15,1-100,0; 2) 100,1-300,0; 3) >300,1 мкг/л. В результате Первой модели получила адекватную предсказательную способность ($R^2=0,717$), при этом ее качество тем лучше, чем ниже значение ФС (средняя абсолютная ошибка составила 2,4 мкг/л для класса пациентов с ФС <15,0 мкг/л) на тестовой выборке. Вторая модель показала ещё более высокую диагностическую возможность с точностью для разных клинических групп (показатель AUC-ROC: 0,914, 0,807, 0,812, 0,891 соответственно), что важно для определения тактики ведения пациентов. В результате проведённого исследования можно сделать заключение, что расчёт содержания ФС с помощью разработанных в работе моделей может использоваться в качестве точного и клинически значимого инструмента для оценки статуса железа в реальной врачебной практике.

Ключевые слова: дефицит железа; железодефицитная анемия; искусственный интеллект; машинное обучение; сывороточное железо; ферритин

Для цитирования: Вареха Н.В., Стуклов Н.И., Гимадиев Р.Р., Гордиенко К.В., Щеголев О.Б., Макарчев А.И., Гуркина А.А. Создание и оценка значимости прогностических моделей для определения уровня ферритина сыворотки с помощью машинного обучения в разных клинических группах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (3): 172-181.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-172-181>

EDN: RFXKFC

Для корреспонденции: Вареха Николай Вячеславович, аспирант каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и клинической лабораторной диагностики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»; e-mail: niki2187@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 15.09.2024

Принята к печати 18.12.2024

Опубликовано 25.02.2025

Varekha N.V.¹, Stuklov N.I.¹, Gimadiev R.R.^{1,2,3}, Gordienko K.V.³, Shchegolev O.B.², Makarchev A.I.³, Gorkina A.A.¹

DEVELOPMENT AND VALUE EVALUATION OF PREDICTIVE MODELS FOR DETERMINING BLOOD SERUM FERRITIN LEVELS IN DIFFERENT CLINICAL GROUPS USING MACHINE LEARNING

¹Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University), 117198, Moscow, Russia;

²LabHub LLC, 119002, Moscow, Russia;

³Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, 123007, Moscow, Russia

Studying the capabilities of artificial intelligence (AI) is important to develop an optimal screening strategy, identify risk groups, and create less expensive laboratory tests to assess the iron status. The aim of the study is to evaluate the effectiveness of using machine learning (ML) tools to assess the iron status by the predicted serum ferritin (SF) level based on demographic data (gender and age), complete blood count (CBC), C-reactive protein (CRP) content and the historic data on the SF level. To perform ML using AI, a dataset of 52,158 patients was used. The obtained data were presented in the form of the First regression model to determine the pre-

dicted SF concentration and the Second model for classifying patient groups depending on different iron status by the level of known SF: 0) <15.0 , 1) $15.1-100.0$, 2) $100.1-300.0$, 3) $>300.1 \mu\text{g/L}$. As a result, the First model demonstrated adequate predictive ability ($R^2=0.717$), and its quality is better, the lower the SF value (the average absolute error was $2.4 \mu\text{g/L}$ for the class of patients with SF $<15.0 \mu\text{g/L}$) in the test sample. The Second model showed an even higher diagnostic ability with accuracy for different clinical groups (AUC-ROC indicator: 0.914, 0.807, 0.812, 0.891, respectively), which is important for determining patient management tactics. As a result of the study, it can be concluded that the determination of SF content using the models developed can be used as an accurate and clinically significant tool for assessing iron status in clinical practice.

Key words: iron deficiency; iron-deficiency anemia; artificial intelligence; machine learning; iron level; ferritin

For citation: Varekha N.V., Stuklov N.I., Gimadiev R.R., Gordienko K.V., Shchegolev O.B., Makarchev A.I., Gurkina A.A. Development and value evaluation of predictive models for determining blood serum ferritin levels in different clinical groups using machine learning. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 172-181 (in Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-172-181>
EDN: RFXKFC

For correspondence: Varekha Nikolai Vyacheslavovich, Ph.D. student, Department of Therapy with the courses of endocrinology, hematology, and clinical laboratory diagnostic of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University); e-mail: niki2187@mail.ru

Information about authors:

Varekha N.V., <https://orcid.org/0009-0004-0969-6144>;
Stuklov N.I., <https://orcid.org/0000-0002-4546-1578>;
Gimadiev R.R., <https://orcid.org/0000-0002-9567-3317>;
Gordienko K.V., <https://orcid.org/0000-0002-5381-1013>;
Shchegolev O.B., <https://orcid.org/0000-0002-3493-1415>;
Makarchev A.I., <https://orcid.org/0009-0008-7840-2540>;
Gurkina A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4164-0058>.

Conflict of interests. The study had no sponsor support.

Acknowledgment. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 15.09.2024

Accepted 18.12.2024

Published 25.02.2025

Введение. Дефицит железа (ДЖ) у детей младшего возраста и на ранних этапах беременности является актуальной проблемой [1]. Он увеличивает восприимчивость к инфекциям, повышает уровень материнской смертности и увеличивает длительность периода нетрудоспособности больных [2], экономические издержки, связанные с лечением и ведением этого синдрома, создают нагрузку на систему общественного здравоохранения и национальную экономику [3].

Для выявления ДЖ в медицинской практике чаще всего применяется анализ содержания ФС, считающегося наиболее объективным показателем. Анализ ФС плохо гармонизирован, при определении референсных интервалов и интерпретации значений концентрации необходимо учитывать различия между методами лабораторных исследований и анализаторами [4]. Диагностика ДЖ осложнена выраженным влиянием воспаления и других патологических состояний на показатели ФС у конкретного пациента.

Лабораторное определение ФС повсеместно не проводится при оказании первичной медико-санитарной помощи, в связи с этим нет возможности точной интерпретации ранних изменений в рутинных общеклинических и биохимических лабораторных исследованиях обмена железа, что особенно актуально для групп риска по ДЖ, в которые входят все женщины репродуктивного возраста и беременные. В последние годы исследователи уделяли особенное внимание возможностям МО и системы поддержки принятия врачебных решений (СППВР) для диагностики железодефицитных состояний. Модели МО могут обучаться на основе данных лабораторных исследований, запоминать информацию

и делать прогнозы. СППВР активно развиваются, особенно в области диагностики, поскольку они быстрые, точные, экономичные. Создаваемые модели превосходят существующие алгоритмы в точности оценки различных железодефицитных состояний [5-9].

Современное развитие ИИ даёт новые возможности МО для создания высокоточных прогностических моделей по определению ФС. Разработка таких моделей поможет быстро и точно, тем более в рамках рутинного первичного обследования, давать необходимую информацию по статусу железа, что может значимо улучшить оказание медицинской помощи населению.

Материал и методы. Для решения поставленной цели из лабораторной информационной системы сетевых лабораторий составлена выборка из 52 158 обезличенных лабораторных отчётов по клиническому анализу крови (КАК), С-реактивному белку (СРБ), ФС, сведения о поле и возрасте пациента (36 052 пациенток женского и 16 106 пациентов мужского пола).

Лабораторные исследования. КАК выполнен на автоматических гематологических анализаторах УКАЗАТЬ в скобках страну!Sysmex, Beckman Coulter, Mindray (КНР); скорость оседания эритроцитов (СОЭ) определялась на анализаторах Alifax, Diesse, Beckman Coulter; уровень ФС и СРБ – на иммунохимических и биохимических анализаторах Roche, Beckman Coulter, Abbott.

Алгоритм машинного обучения. Поставленная цель работы состояла из двух задач.

1. Создание Первой модели по прогнозированию уровня ФС на основе демографических данных (пол и возраст), данных КАК, СРБ и известного ФС (задача регрессии).

2. С использованием тех же показателей создание Второй модели по определению клинических групп ДЖ – попаданию расчётного показателя ФС в определённый диапазон значений (задача классификации): группа 0 (абсолютный ДЖ) – известный уровень ФС $<15,0$ мкг/л (5745 лиц женского и 453 мужского пола); группа 1 (возможный ДЖ, особенно при наличии воспаления) - ФС от 15,1 до 100,0 мкг/л (23 351 и 5884 человека); группа 2 (без ДЖ) - ФС от 100,1 до 300,0 мкг/л (5763 и 6893 человек); группа 3 (назначение препаратов железа не рекомендуется – возможный избыток железа) - ФС $>300,1$ мкг/л (1193 и 2876 человек) [10-12].

Предобработанные результаты лабораторных измерений до построения моделей разделены на обучающую и тестовую выборки в соотношении 4:1 (41726 и 10432 пациентов).

Для решения задач регрессии уровня ФС и классификации клинических групп пациентов по уровню ФС использован фреймворк LightAutoML [13] – специализированное программное обеспечение на языке Python, позволяющее в автоматическом режиме оптимизировать гиперпараметры (настройки модели, оказывающие влияние на то, как модель будет обучаться, какие признаки будут учитываться, и какие ограничения будут наложены на процесс обучения) используемых алгоритмов и произвести их блендинг (композицию нескольких алгоритмов с различными параметрами). В задаче регрессии использована линейная регрессия и градиентный бустинг на решающих деревьях (GBDT). GBDT - ансамбль решающих алгоритмических деревьев, построенных последовательно таким образом, что каждое следующее уменьшает ошибку предыдущего. В задаче классификации использованы два ал-

горитма: логистическая регрессия [14] и GBDT [15]. Реализация линейных моделей (линейной и логистической регрессий) взята из библиотеки Pytorch [pytorch.org] с использованием алгоритма линейной оптимизации L-BFGS [16]. Реализация градиентного бустинга на решающих деревьях взята из библиотеки LightGBM [lightgbm.readthedocs.io]. Обучение производилось с использованием кросс-валидации на 5 частях (5-fold cross-validation) [17], то есть обучающий набор данных случайным образом разбит на 5 равных частей для более верной оценки качества моделей и выбора оптимальных гиперпараметров (рис. 1). В качестве метрик качества моделей использован коэффициент детерминации (R^2) и площадь под ROC-кривой (AUC ROC) для задачи регрессии и классификации, соответственно.

Статистическая обработка. Для анализа различий между группами использованы следующие статистические методы. Для проверки гомогенности дисперсий применён тест Брауна-Форсайта (Brown-Forsythe). В случае выявления неоднородности дисперсий использован метод анализа дисперсий Уэлша (Welsh ANOVA, однофакторный дисперсионный анализ). Для последующих множественных сравнений применена поправка Геймса-Хаузеля (Games-Howell). Помимо статистической значимости различий между группами оценена практическая значимость (размер эффекта) с помощью коэффициента Коэна (d). Корреляция между исследуемыми параметрами определена с помощью критерия Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ и практически значимыми при $d \geq 0,5$ [18]. Сравнение групп выполнено с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8, коэффициент Коэна рассчитан отдельно.

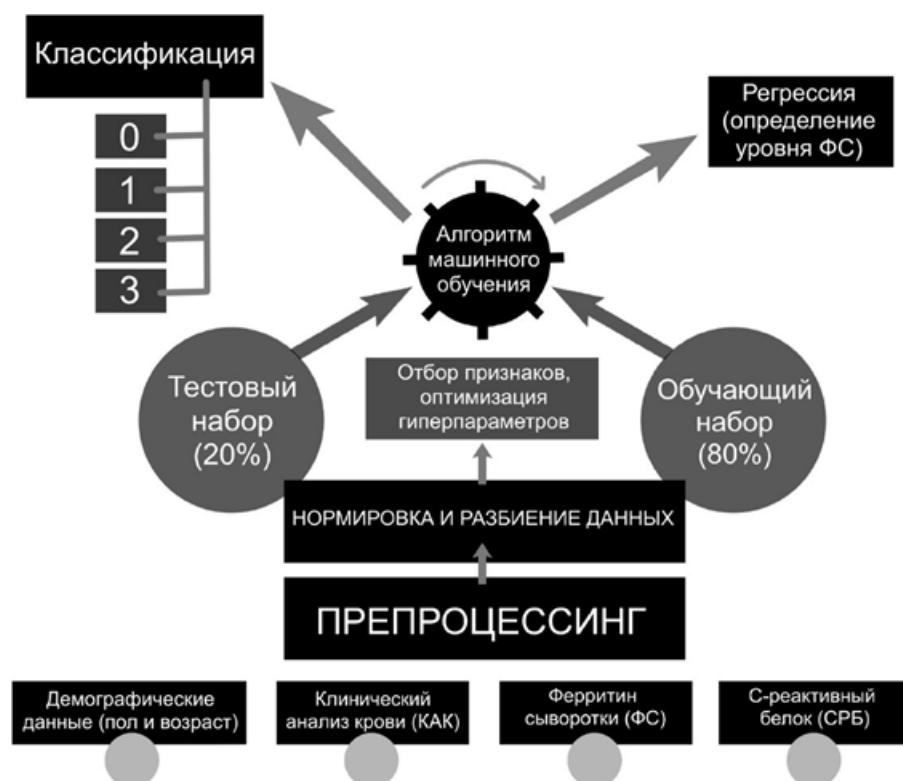


Рис. 1. Дизайн исследования, где классы пациентов распределены по уровню известного ФС: 0) $<15,0$; 1) 15,1-100,0; 2) 100,1-300,0; 3) $>300,1$ мкг/л.

Результаты. С целью определения наиболее значимых для разрабатываемых прогностических моделей параметров на первом этапе проведена оценка и взаимосвязь полученных лабораторных показателей и

демографических данных в общей когорте пациентов (Σ) и выборках с различными диапазонами ФС.

У лиц женского пола выявлена умеренная корреляционная связь между уровнем ФС и СРБ ($r=0,36$), рис. 2.

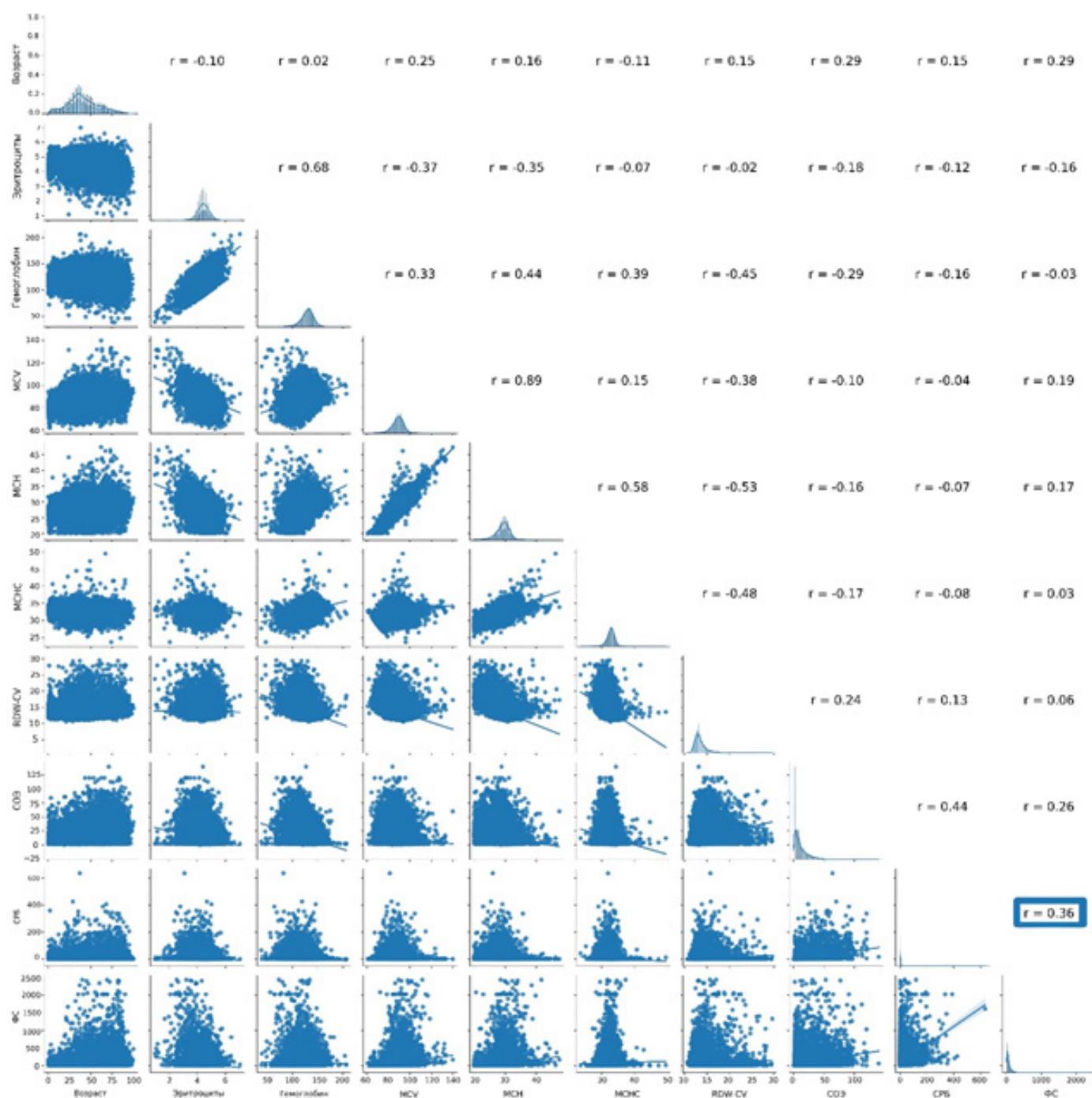


Рис. 2. Парный график исследуемых показателей у лиц женского пола.

У лиц мужского пола выявлена умеренная корреляционная связь между известным уровнем ФС и СРБ ($r=0,33$), ФС и возрастом ($r=0,30$) (рис. 3).

Как в общей когорте пациентов Σ , так и в выборках с различными диапазонами известных значений ФС выявлены статистически значимые отличия по-

казателей КАК, СРБ, ФС в зависимости от пола пациента ($p<0,05$; табл. 1), однако эффект практически незначим ($d<0,5$): исключение составило количество эритроцитов, половые различия по которому достигали величины в 1,4 стандартных отклонения (SD).

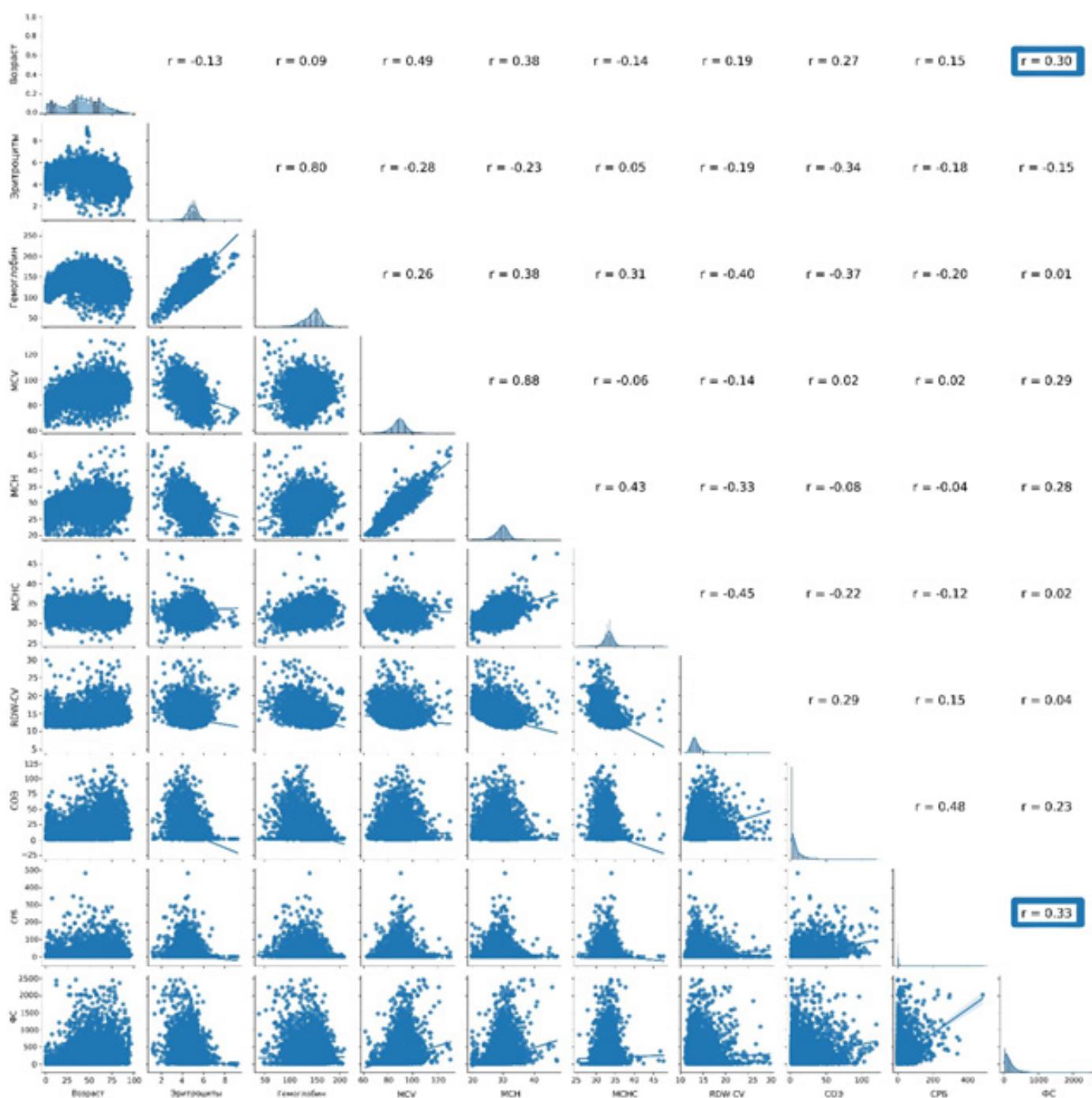


Рис. 3. Парный график исследуемых показателей у лиц мужского пола.

В разрезе диапазонов по уровню известных значений ФС выделенные интервалы демонстрировали прямо пропорциональную связь с возрастом: меньшей концентрации соответствовал меньший возраст. Практически значимым явилось отличие первой пары групп (пара групп 0 и 1, $\text{ФС} \leq 100$) от второй (пара групп 2 и 3, $\text{ФС} > 100,1$). Подобная картина сохранялась вне зависимости от пола. Возраст женщин в среднем был больше возраста мужчин, однако величина эффекта была средней ($d < 0,8$).

Высокая вариабельность СРБ и СОЭ существенно

снизила практическую значимость различий между исследуемыми группами по указанным показателям. Для женщин величина показателя позволяет выделить группу 3 с возможным избытком железа. Для мужчин подобная разница менее очевидна.

Уровень гемоглобина достоверно ниже у женщин по сравнению с мужчинами в исследованной выборке (что и должно быть в здоровой популяции), при этом эффект различия возрастает в зависимости от известного уровня ФС (прямо пропорционально).

Внутри половые различия по измеренному лабо-

раторно ФС между группами, односторонние для мужчин и женщин, следующие: при самом низком значении в группе 0, увеличении для 1-й и затем 2-й группы, наблюдается снижение показателя для группы 3, более выраженное для женщин. Концентрация ФС ожидаемо различалась между группами, поскольку выделение групп производилось по этому показателю. В рамках каждой группы значение показателя достоверно ниже для женщин, но эффект незначительный.

Для среднего содержания гемоглобина в эритроците (показателя MCH) статистически и практически значимым было отличие группы 0 от других групп вне зависимости от пола. В то же время для мужчин средний эффект обнаружен для различий между группой 1 и группами 2 и 3. Подобная ситуация наблюдалась и для средней концентрации гемоглобина в эритроцитах (MCHC), но значения эффектов менее выражены или отсутствуют вовсе.

В исследуемой когорте средний объём эритроцитов (MCV) у пациентов женского пола в среднем выше, чем у мужского, вне зависимости от группы по ФС, но со снижением размера эффекта при большей его концентрации. Как для мужчин, так и для женщин групп-

па 0 наиболее выражено отличается от других групп, при этом обособленность группы 1 более выражена для мужчин, нежели для женщин.

Абсолютное содержание эритроцитов вне зависимости от группы у пациентов женского пола ожидаемо отличалось от лиц мужского пола. При сравнении групп практически значимыми явились отличия группы 3 от других групп, но только для женщин.

Ширина распределения эритроцитов по объёму (RDW-CV) частично зависит от пола пациента: для женщин значения показателя для группы 0 и группы 3 более выражено, чем для групп 1 и 2; для мужчин группы 1, 2, 3 не имеют практически значимых отличий и значимо ниже по ширине распределения эритроцитов по сравнению с группой 0.

По исследованным характеристикам различных лабораторных и демографических показателей получены данные о значимой роли как КАК, так и содержания СРБ и известного ФС, их взаимосвязь в разных клинических и гендерных группах, что указывает на то, что все исследованные параметры должны в обязательном порядке быть включены в разработку прогностических моделей по определению содержания прогнозируемого ФС с помощью алгоритмов МО.

Таблица 1

Лабораторные показатели и демографические данные в общей когорте пациентов (Σ) и в выборках с различными диапазонами ФС в зависимости от пола

Показатель	Выборки	Женщины		Мужчины		Значимость
		M \pm SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)	M \pm SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)	
Ферритин, мкг/л	Σ	76,3 \pm 132,43	42,5 (21,3; 82,4)	194,8 \pm 222,27	132,5 (62,4; 244)	p <0,001 d =0,05
	0	9,7 \pm 3,21	10 (7,2; 12,4)	10,6 \pm 2,94	10,9 (8,5; 13)	p <0,001 d =0,27
	1	45,5 \pm 22,41	40,6 (26,8; 60,9)	54,4 \pm 24,55	52,2 (33; 75,8)	p <0,001 d =0,39
	2	158 \pm 49,8	143,2 (118; 187,2)	180,1 \pm 54,91	171 (132,9; 222,8)	p <0,001 d =0,42
	3	606,5 \pm 393,58	450 (352,4; 694)	546,5 \pm 313,55	435,5 (354; 603)	p <0,001 d =0,18
Возраст, годы	Σ	41,1 \pm 18,69	39 (29; 53)	40,6 \pm 22	41 (25; 57)	p =0,008 d =0,01
	0	35,3 \pm 13,81 ^{БВ}	35,1 (26; 44)	23,5 \pm 24,64 ^{БВ}	11 (4; 43)	p <0,001 d =0,79
	1	38,7 \pm 18,17 ^Д	37 (28; 49)	31 \pm 24,69 ^Д	25 (9; 53)	p <0,001 d =0,39
	2	52,8 \pm 17,89	55 (40; 65)	45,4 \pm 17,04	44 (33,1; 58)	p <0,001 d =0,42
	3	60,9 \pm 17,42	63 (49; 74)	51,3 \pm 16,41	49 (39; 62,3)	p <0,001 d =0,57
СРБ, мг/л	Σ	5,4 \pm 18,15	1,2 (0,4; 3,6)	6,5 \pm 20,16	1,3 (0,5; 3,6)	p <0,001 d =0,01
	0	2,1 \pm 3,97 ^В	0,8 (0,3; 2,2)	1,7 \pm 5,71	0,4 (0,2; 1,2)	p =0,875 d =0,09
	1	3,5 \pm 9,37 ^Д	1,1 (0,4; 3)	3 \pm 8,31 ^Д	0,8 (0,3; 2,3)	p =0,004 d =0,05
	2	10,4 \pm 26,81 ^С	2,5 (0,8; 7,6)	5,5 \pm 14,55	1,4 (0,6; 3,7)	p <0,001 d =0,23
	3	35 \pm 59,76	7,9 (2; 39,3)	16,6 \pm 38,61	2,6 (1; 11,7)	p <0,001 d =0,40

Показатель	Выборки	Женщины		Мужчины		Значимость
		M±SD	Ме (Q ₁ ; Q ₃)	M±SD	Ме (Q ₁ ; Q ₃)	
СОЭ, мм/час	Σ	12,5±12,73	8 (4; 17)	9,7±11,92	6 (2; 12)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,06
	0	12,3±11,39 ^Б	9 (4; 17)	8,7±10,29	5 (2; 11)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,32
	1	10,8±10,7 ^Д	7 (3; 14)	7,9±9,38 ^Д	5 (2; 9)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,27
	2	16,3±15,21 ^Е	12 (6; 22)	9,3±10,77	6 (2; 11)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,54
	3	28,2±23,15	22 (10; 40)	14,5±17,07	8 (3; 18)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,72
Гемоглобин, г/л	Σ	129,1±13,23	130 (122; 138)	144,9±17,65	148 (135; 157)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,25
	0	118,1±13,2 ^{АБ}	119 (110; 127)	124±17,09 ^{АБВ}	123 (113; 133)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,44
	1	131,2±10,88 ^Д	132 (125; 138)	140,5±16,78 ^Г	142 (129; 153)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,75
	2	132,9±13,63 ^Е	134 (126; 142)	149,9±14,4	151 (143; 159)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =1,21
	3	122,3±21,17	125 (109; 138)	145,2±21,4	150 (136; 159)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =1,07
MCH, пг	Σ	29,2±2,35	29,4 (28; 30,6)	29,6±2,24	29,8 (28,4; 30,9)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,11
	0	26,8±2,73 ^{АБВ}	27,2 (25,1; 28,7)	25,6±2,58 ^{АБВ}	26 (24,1; 27,2)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,45
	1	29,5±1,93	29,6 (28,4; 30,7)	28,7±2,17 ^Г	28,9 (27,4; 30,2)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,36
	2	30±1,94	30 (28,9; 31,1)	30,1±1,75	30,2 (29,2; 31,2)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,10
	3	30,1±2,78	30 (28,6; 31,4)	30,5±2,14	30,4 (29,3; 31,5)	<i>p</i> =0,003 <i>d</i> =0,15
MCHC, г/дл	Σ	32,8±1,23	32,9 (32,1; 33,6)	33,3±1,22	33,4 (32,6; 34,1)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,37
	0	32±1,42 ^А	32,1 (31,2; 32,9)	32,3±1,55 ^{АБВ}	32,3 (31,4; 33,3)	<i>p</i> =0,004 <i>d</i> =0,20
	1	33±1,11	33,1 (32,4; 33,7)	33,3±1,17	33,3 (32,6; 34)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,26
	2	32,9±1,14	33 (32,3; 33,6)	33,4±1,15	33,4 (32,8; 34,1)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,43
	3	32,7±1,36	32,7 (31,9; 33,5)	33,4±1,31	33,4 (32,6; 34,2)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,51
MCV, фл	Σ	88,8±5,97	89,2 (85,6; 92,5)	88,7±6,14	89 (85,3; 92,3)	<i>p</i> =0,080 <i>d</i> =0,01
	0	83,8±6,49 ^{АБВ}	84,2 (79,6; 88,3)	79,3±6,67 ^{АБВ}	79,4 (74,7; 83)	<i>p</i> <0,001, <i>d</i> =0,69
	1	89,3±5,14 ^Д	89,6 (86,4; 92,5)	86,4±6,07 ^Г	86,7 (82,1; 90,5)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,55
	2	91±5,34	91 (88; 93,9)	90,2±4,84 ^Д	90 (87,2; 93)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,15
	3	92,1±7,54	91,4 (87,4; 95,5)	91,3±5,91	90,7 (87,8; 94,3)	<i>p</i> =0,024 <i>d</i> =0,12
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	Σ	4,4±0,43	4,4 (4,2; 4,7)	4,9±0,56	4,9 (4,6; 5,2)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =1,4
	0	4,4±0,41 ^Б	4,4 (4,2; 4,7)	4,8±0,61	4,8 (4,5; 5,1)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =1,03
	1	4,4±0,39 ^Д	4,4 (4,2; 4,7)	4,9±0,52	4,9 (4,6; 5,2)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =1,02
	2	4,4±0,47 ^Е	4,5 (4,2; 4,7)	5±0,5	5 (4,7; 5,3)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =1,09
	3	4,1±0,73	4,2 (3,6; 4,6)	4,8±0,74	4,9 (4,5; 5,3)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,96
RDW-CV, %	Σ	13,7±1,7	13,3 (12,7; 14,1)	13,5±1,49	13,2 (12,7; 13,9)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,1
	0	14,9±1,97 ^А	14,5 (13,4; 15,9)	15,2±2,17 ^{АБВ}	14,7 (13,6; 16,4)	<i>p</i> =0,028 <i>d</i> =0,17
	1	13,4±1,43	13,1 (12,6; 13,8)	13,6±1,54	13,3 (12,8; 14)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,16
	2	13,5±1,57 ^Д	13,2 (12,6; 13,9)	13,3±1,17	13,1 (12,6; 13,7)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,16
	3	14,6±2,61 ^Е	13,8 (13; 15,4)	13,6±1,69	13,2 (12,6; 14)	<i>p</i> <0,001 <i>d</i> =0,52

Примечание. А, Б, В, Г, Д, Е – статистически значимые отличия (*p*<0,05) между парами групп 0-1, 0-2, 0-3, 1-2, 1-3, 2-3, соответственно, при *d*≥0,8; а, б, в, г, д, е – то же при *d*≥0,5; М – среднее, SD – стандартное отклонение, Ме – медиана, Q₁ и Q₃ – первый и третий квартиль, соответственно.

Характеристики полученной регрессионной модели. Разрабатываемая Первая модель является моделью регрессии и предназначена для определения про-

гнозируемого количественного уровня ФС у конкретного пациента. Метрики точности для оценки качества модели в общей когорте представлены в табл. 2.

Таблица 2

Характеристики регрессионной модели

R²	MAE, мкг/л	MAPE, %	MSE, (мкг/л)²
0,717	37,6	49,6	8701,0

Примечание. R² - коэффициент детерминации; MAE - средняя абсолютная ошибка; MAPE - средняя абсолютная ошибка в процентах; MSE - среднеквадратичная ошибка.

Выявлена сильная взаимосвязь между известным и прогнозируемым уровнем ФС ($r=0,888$, $p<0,05$). Модель обладает умеренной предсказательной способностью. Показатель оценки эффективности R² является удовлетворительным ($>0,5$). MAE, как среднее абсолютных разностей между измеренным и предсказанным значениями, составила 37,6 мкг/л. Ошибка (MAPE) составила 49,6% от фактического (измененного) значения ФС. MSE отражает влияние больших ошибок на качество модели и составляет 8701,0 (мкг/л)² RMSE (корень из среднеквадратичной ошиб-

ки в абсолютном значении) составляет 93,3 мкг/л. Перечисленные показатели качества разработанной модели рассчитаны на всём диапазоне измерения известных концентраций ФС, где на этапе машинного обучения преобладали, в том числе и экстремально высокие значения.

Характеристики разработанной классификационной модели. Вторая классификационная модель, разрабатываемая для наглядной оценки средней абсолютной ошибки в разных клинических группах, показала следующие характеристики (табл. 3).

Таблица 3

Характеристики регрессионной модели в разрезе диапазонов уровней ФС

Клиническая группа	MAE, мкг/л	MAPE, %	MSE, (мкг/л) ²
0	2,4	30,1	11,7
1	16,5	41,3	451,8
2	41,9	24,0	2827,1
3	197,0	29,1	110333,2

Примечание. MAE - средняя абсолютная ошибка; MAPE - средняя абсолютная ошибка в процентах; MSE - среднеквадратичная ошибка.

В качестве основной метрики модели используется показатель площади под кривой AUC ROC-анализа [19] (рис. 4).

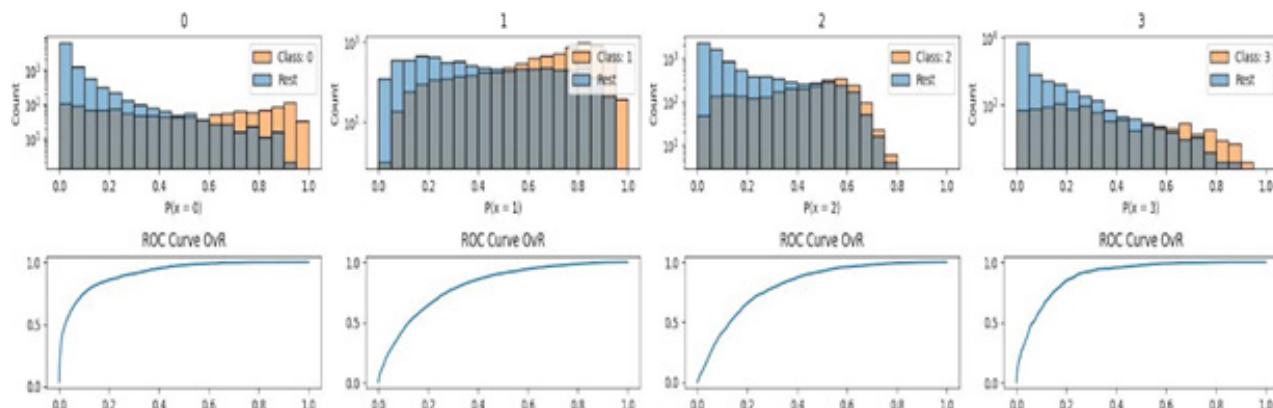


Рис. 4. ROC-кривые для 4 классов модели, рассчитанные по методу One-vs-Rest (OvR).

В табл. 4 представлена диагностическая точность классификационной модели в зависимости от пола пациентов.

Характеристики классификационной модели в разрезе пола пациентов

Параметры	Группа 0		Группа 1		Группа 2		Группа 3	
	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М
Пол	Ж	М	Ж	М	Ж	М	Ж	М
ROC AUC (OvR)*	0,896	0,919	0,755	0,808	0,787	0,726	0,886	0,776
Чувствительность, %	52,5	26,7	92,5	56,6	16,0	82,7	26,2	22,1
Специфичность, %	96,5	99,2	37,9	87,8	96,7	52,1	99,2	95,9

Примечание. AUC ROC - площадь под ROC-кривой, рассчитанная по методу One-vs-Rest (OvR); М – мужчины; Ж - женщины; * - $p < 0,05$.

Показана достаточно высокая точность прогнозирования уровня ФС в разных клинических группах: AUC ROC составила 0,755-0,896 для лиц женского пола, 0,726-0,919 – для лиц мужского пола (AUC \geq 0,7) [20].

Обсуждение. ДЖ является одним из самых распространенных патологических состояний в мире, но до сих пор остаётся часто недиагностированным. Это связано как с нехваткой средств на проведение детального исследования статуса железа, так и с отсутствием возможности повсеместного использования точных лабораторных методов и их интерпретации, большой зависимостью полученных показателей от клинического статуса конкретного пациента (тем более, что само определение ФС не стандартизовано, и в лабораториях используют разные референсные интервалы). В это же время, когда медицинские данные в электронной карте пациента становятся все более структурированными, расширяются возможности МО и инструментов СППВР, особенно в области лабораторной медицины, поскольку они быстрые, точные и дешевые. Всё большее значение приобретают новые прогностические модели по определению статуса железа. Существует много алгоритмов предсказания содержания ФС с использованием как одного лабораторного параметра, так и множества (до 20), как лабораторных, так и демографических и клинических показателей.

При анализе лабораторных и демографических данных в общей выборке и подгруппах с различными диапазонами измеренного ФС стала понятна связь данного показателя с уровнем СРБ и возрастом (для мужского пола), что подтвердило необходимость обязательного включения указанных критериев как в регрессионную, так и тем более, в классификационную прогностическую модель по определению статуса железа. В результате первого этапа исследования получены данные, что все параметры статистически значимо отличаются между пациентами женского и мужского пола, что свидетельствует о разном уровне гендерной значимости проблемы и о необходимости дифференцированной разработки описываемых прогностических моделей.

Модель регрессии на тестовой выборке показала обнадеживающие результаты: $R^2=0,717$, $MAE=2,4$ мкг/л (для пациентов с ФС $<15,0$ мкг/л). Выявлена сильная корреляция между измеренным и прогнозируемым уровнем ФС ($r=0,888$), что согласуется с данными У. Luo и соавт. ($r=0,732$) [6].

Результаты классификационной модели также показали высокую диагностическую точность (показатель ROC AUC от 0,726 до 0,919), что важно для определения тактики ведения больных. В связи с этим данная модель представляет существенный клинический интерес и может быть внедрена в медицинскую лабораторию.

Так, например, по результатам схожего исследования в нескольких регионах Нидерландов появилась услуга «рефлексного» тестирования. Специалисты лабораторной медицины могут вносить дополнительные тесты (ФС по результатам КАК и СРБ) в список необходимых для той или иной пробы по результатам предсказания алгоритма. Это экономит время врачей и сокращает количество повторных венепункций [8].

В нашем исследовании представлены результаты разработки двух прогностических моделей с высокой достоверностью предсказания концентрации ФС, полученных с помощью МО по анализу демографических данных, результатов КАК, СРБ и известных показателей ФС. Алгоритм, разработанный в этом исследовании, может быть использован как часть СППВР для выявления случаев дефицита железа в реальной клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1, 3 - 18 СМ. REFERENCES)

1. <https://www.who.int/health-topics/anaemia>.
2. Polyakova O.A., Klepikova M.V., Litvinova S.N., Isaakyan Yu.A., Ostroumova O.D. Iron deficiency anemia in general medical practice. *Profilakticheskaya meditsina*. 2022; 25(12):127-34. (in Russian)
3. Blank P., Tomonaga Y., D. Szucs T., Schwenkglenks M. Economic burden of symptomatic iron deficiency – a survey among Swiss women. *BMC Womens Health*. 2019. 19: 39.
4. Hoofnagle A.N. Harmonization of blood-based indicators of iron status: making the hard work matter. *Am. J. Clin. Nutr.* 2017; 106:1615S-1619S.
5. Azarkhish I., Raoufy M.R., Gharibzadeh S. Artificial intelligence models for predicting iron deficiency anemia and iron serum level based on accessible laboratory data. *J. Med. Syst.* 2012; 36(3):2057-61.
6. Luo Y., Szolovits P., Digne A.S., Baron J.M. Using machine learning to predict laboratory test results. *Am. J. Clin. Pathol.* 2016; 145(6):778-88..
7. Pullakhandam S., McRoy S. Classification and explanation of iron deficiency anemia from complete blood count data using machine learning. *BioMedInformatics*. 2024; 4(1):661-72.
8. Kurstjens S., de Bel T., van der Horst A., Kusters R., Krabbe J., van Balveren J. Automated prediction of low ferritin concentrations using a machine learning algorithm. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2022; 60(12):1921-8.
9. McDermott M., Digne A.S., Szolovits P., Luo Y., Baron J.M. Using machine learning to develop smart reflex testing protocols. *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 2023; 31(2):416-25.

10. WHO guideline on use of ferritin concentrations to assess iron status in individuals and populations. Geneva: World Health Organization; 2020.
11. Schop A., Stouten K., van Houten R., Riedl J., van Rosmalen J., Bindels P.J. et al. Diagnostics in anaemia of chronic disease in general practice: a real-world retrospective cohort study. *BJGP Open*. 2018; 2 (3):bjgpopen18X101597.
12. Weiss G., Goodnough L. Anemia of chronic disease. *New England Journal of Medicine*. 2005; 352(10):1011-23.
13. Vakhrushev A., Ryzhkov A., Savchenko M., Simakov D., Damdinov R., Tuzhilin A. Lightautoml: Automl solution for a large financial services ecosystem. *arXiv preprint arXiv*. 2021; 2109.01528.
14. Nick T.G., Campbell K.M. Logistic regression. *Methods Mol. Biol.* 2007; 404:273-301.
15. Ke G., Meng Q., Finley T., Wang T., Chen W., Ma W. et al. Lightgbm: A highly efficient gradient boosting decision tree. *Advances in neural information processing systems*. 2017; 30: 3149-57.
16. Moritz P., Nishihara R., Jordan M. A linearly-convergent stochastic L-BFGS algorithm. *Artificial Intelligence and Statistics*. 2016; 249-58.
17. Fushiki T. Estimation of prediction error by using K-fold cross-validation. *Statistics and Computing*. 2011; 21:137-46.
18. Diener M.J. Cohen's d. *The Corsini encyclopedia of psychology*. 2010; 1-1.
19. Yang Z., Xu Q., Bao S., Cao X., Huang Q. Learning with multiclass AUC: Theory and algorithms. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. 2021; 44 (11): 7747-63.
20. Swets J. A., Dawes R. M., Monahan J. Better decisions through science. *Scientific American*. 2000; 283(4):82-7.



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

<https://elibrary.ru/ylnvrq>

Кузьмич Е.В.¹, Павлова И.Е.¹, Кудинова Э.Е.², Егорова А.Н.¹, Бубнова Л.Н.¹

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА С ПОМОЩЬЮ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

¹ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», 191024, Санкт-Петербург, Россия;

²ГБУ Ростовской области «Станция переливания крови», 344037, Ростов-на-Дону, Россия

Введение. Секвенирование нового поколения эффективно применяется для изучения полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости (HLA гены). Метод позволяет получать большие объемы данных аллельного уровня разрешения, необходимые для проведения исследований в области медицины, фармакогенетики, антропологии, для анализа *in silico* при разработке вакцин на основе прогнозирования epitопов.

Цель – сравнительный анализ полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости I и II классов с помощью метода секвенирования нового поколения.

Материал и методы. В исследование включены индивидуумы русской нации, (восточнославянский народ, далее русские), проживающие на территории Ростовской области – 241 человек. HLA типирование генов HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 выполнено методом секвенирования нового поколения с использованием наборов NGsigo и программного обеспечения NGSengine (GenDx, Нидерланды). Частоты HLA-аллелей и гаплотипов рассчитаны методом максимального правдоподобия с помощью EM-алгоритма с применением программы Arlequin версия 3.5.

Результаты. У обследованных русских определено 228 HLA аллелей, из них 156 аллелей I класса и 72 аллеля II класса. Максимальное количество аллельных вариантов установлено при типировании гена HLA-B (62 аллеля), далее следуют HLA-A (48 аллелей), -C (46 аллелей), -DRB1 (40 аллелей), -DQB1 (32 аллеля). Наиболее распространённые аллели каждого HLA гена: A*02:01:01:01 (26,97%), B*07:02:01:01 (9,54%), C*12:03:01:01 (10,79%), DRB1*07:01:01:01 (13,90%), DQB1*03:01:01:02 (13,28%). У русских-ростовчан установлено 355 HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 гаплотипов, девять из них имеют частоту более 1%. Наиболее распространённым HLA гаплотипом является A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01:01 (2,07%), далее следуют A*01:01:01:01-B*08:01:01:01-C*07:01:01:01-DRB1*03:01:01:01-DQB1*02:01:01:01 (1,94%), A*02:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01 (1,66%), A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02:01:01 (1,66%). Сравнительный анализ иммуногенетических характеристик русских Ростовской области и Нижнего Новгорода показал, что аллели A*29:02:01:01, B*44:03:01:01:01, гаплотип A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01 является характерным для русских-ростовчан.

Заключение. С помощью метода секвенирования нового поколения изучены частоты HLA аллелей и гаплотипов в популяции русских Ростовской области. Установленные иммуногенетические характеристики могут быть использованы для проведения медицинских, фармакогенетических, антропологических исследований.

Ключевые слова: главный комплекс гистосовместимости; секвенирование нового поколения; русские популяции; HLA аллели; HLA гены; HLA гаплотипы

Для цитирования: Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Кудинова Э.Е., Егорова А.Н., Бубнова Л.Н. Изучение полиморфизма генов иммунного ответа с помощью секвенирования нового поколения. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (3): 182-189.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-182-189>

EDN: YLNVRQ

Для корреспонденции: Кузьмич Елена Витальевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА», e-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 30.10.2024

Принята к печати 06.12.2024

Опубликована 25.02.2025

Kuzmich E.V.¹, Pavlova I.E.¹, Kudinova E.E.², Egorova A.N.¹, Bubnova L.N.¹

STUDY OF IMMUNE RESPONSE GENE POLYMORPHISMS USING NEXT-GENERATION SEQUENCING

¹Russian Research Institute of Haematology and Transfusion, Federal Medical and Biological Agency, 191024, St. Petersburg, Russia;

²Blood Transfusion Station of Rostov Region, 344037, Rostov-on-Don, Russia

Background. Next-generation sequencing is effectively applied to study the polymorphisms of major histocompatibility complex

genes (HLA genes). The method provides large amounts of allele-resolution data, which are useful for medical, pharmacogenetic, anthropological studies, as well as *in silico* analyses for vaccine development based on epitope prediction.

Aim. Comparative analysis of class I and class II major histocompatibility complex genes polymorphism using new generation sequencing.

Material and methods. The study included 241 Russians (The East Slavic people) living in the Rostov region. HLA typing of HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 genes was performed by new generation sequencing using NGSgo kits and NGSengine software (GenDx, the Netherlands). The HLA alleles and haplotypes frequencies were calculated by the maximum likelihood method using the EM algorithm with the Arlequin version 3.5 program.

Results. In the examined Russians 228 HLA alleles were determined, including 156 class I alleles and 72 class II alleles. The maximum number of alleles was found for HLA-B gene (62 alleles), followed by HLA-A (48 alleles), -C (46 alleles), -DRB1 (40 alleles), -DQB1 (32 alleles). The most common alleles of each HLA gene were A*02:01:01:01 (26,97%), B*07:02:01:01 (9,54%), C*12:03:01:01 (10,79%), DRB1*07:01:01:01 (13,90%), DQB1*03:01:01:02 (13,28%). 355 HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 haplotypes were identified, nine of them had a frequency of more than 1%. The most common HLA haplotype was A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01:01-DQB1*06:02:01:01 (2,07%), followed by A*01:01:01:01-B*08:01:01:01-C*07:01:01:01-DRB1*03:01:01:01-DQB1*02:01:01:01 (1,94%), A*02:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01 (1,66%), A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01 (1,66%). The comparative analysis of immunogenetic characteristics of Russians of Rostov region and Nizhny Novgorod demonstrated that alleles A*29:02:01:01, B*44:03:01:01, haplotype A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01 are characteristic for Russians of Rostov region.

Conclusion. The frequencies of HLA alleles and haplotypes in the Russian population of Rostov region have been studied using new generation sequencing. The established immunogenetic characteristics can be used for medical, pharmacogenetic and anthropological researches.

Key words: major histocompatibility complex; next generation sequencing; Russian population; HLA alleles; HLA genes; HLA haplotypes

For citation: Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Kudinova E.E., Egorova A.N., Bubnova L.N. Study of immune response gene polymorphisms using next-generation sequencing. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2025; 70 (3): 182-189 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-182-189>

EDN: YLNVRQ

For correspondence: Kuzmich E.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology FMBA; e-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Information about authors:

Kuzmich E.V., <https://orcid.org/0000-0003-0489-1763>;
Pavlova I.E., <https://orcid.org/0000-0001-7756-4902>;
Kudinova E.E., <https://orcid.org/0000-0001-7407-9864>;
Egorova A.N., <https://orcid.org/0009-0008-0553-565X>;
Bubnova L.N., <https://orcid.org/0000-0002-6690-3742>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.10.2024

Accepted 06.12.2024

Published 25.02.2025

Введение. Гены главного комплекса гистосовместимости (HLA гены) обеспечивают эффективный иммунный ответ на патогены благодаря их уникальному аллельному и популяционному полиморфизму, что необходимо для сохранения человека как биологического вида в изменяющихся, зачастую неблагоприятных условиях окружающей среды [1].

Изучение полиморфизма генов HLA системы начато в середине 60-х годов XX века. С помощью серологических методов открыты различные HLA специфичности, изучена их распространённость в пределах ряда популяций, продемонстрирована вариабельность частот встречаемости различных HLA специфичностей на этническом и расовом уровне. Разработка молекулярно-генетических методов исследования, включая непрямое секвенирование по Сэнгеру, способствовала прогрессу в области популяционной иммуногенетики и значительно расширила представления о полиморфизме HLA генов [2]. Наиболее информативным методом HLA типирования является секвенирование нового поколения (Next generation sequencing, NGS) [3], позволяющее получать большие объемы данных аллельного уровня разрешения, что необходимо для проведения со-

временных исследований в области медицины, фармакогенетики, антропологии, для анализа *in silico* при разработке вакцин на основе прогнозирования epitопов [4].

Необходимость HLA типирования аллельного разрешения для современных медицинских исследований демонстрирует изучение факторов, ассоциированных с развитием ревматоидного артрита. При ревматоидном артрите важным генетическим фактором риска являются аллели гена HLA-DRB1, кодирующие так называемые «общие epitопы» (shared epitopes, SE) – аминокислотные последовательности из пяти общих аминокислот (QKRAA, QRRAA, RRRAA) в позициях 70-74 HLA-DR β цепи [5]. Наличие HLA-DRB1 аллелей, кодирующих SE, не только увеличивает риск развития ревматоидного артрита, но повышает вероятность раннего начала заболевания, более тяжёлого поражения костной ткани и выработку антител к циклическому цитруллинированному пептиду [6]. Среди европейских пациентов с ревматоидным артритом основными аллелями, кодирующими SE, являются DRB1*04:01, *04:04, *01:01, *10:01; у пациентов из Восточной Азии наиболее распространённым SE-кодирующим аллелем является DRB1*04:05. Среди ин-

Таблица 1

Частоты аллелей HLA класса I у русских Ростовской области

Аллель	Частота, доля	Аллель	Частота, доля	Аллель	Частота, доля
<i>A*01:01:01:01</i>	0,1079	<i>B*08:01:01:02</i>	0,0083	<i>B*55:01:01:01</i>	0,0104
<i>A*01:01:01:03</i>	0,0041	<i>B*13:01:01:01</i>	0,0021	<i>B*56:01:01:03</i>	0,0124
<i>A*01:02:01:01</i>	0,0021	<i>B*13:02:01:01</i>	0,0436	<i>B*57:01:01:01</i>	0,0228
<i>A*01:03:01:02</i>	0,0021	<i>B*14:01:01:01</i>	0,0021	<i>B*57:02:01:01</i>	0,0062
<i>A*02:01:01:01</i>	0,2697	<i>B*14:02:01:01</i>	0,0166	<i>B*58:01:01:01</i>	0,0083
<i>A*02:01:01:02</i>	0,0021	<i>B*15:01:01:01</i>	0,0373	<i>B*73:01:01:01</i>	0,0041
<i>A*02:01:01:05</i>	0,0021	<i>B*15:01:01:04</i>	0,0104	<i>C*01:02:01:01</i>	0,0539
<i>A*02:01:01:08</i>	0,0083	<i>B*15:01:01:06</i>	0,0021	<i>C*01:02:01:28</i>	0,0021
<i>A*02:01:01:73</i>	0,0021	<i>B*15:01:01:21</i>	0,0021	<i>C*01:02:01:56</i>	0,0021
<i>A*02:01:01:226</i>	0,0021	<i>B*15:08:01:01</i>	0,0021	<i>C*02:02:02:01</i>	0,0456
<i>A*02:01:04</i>	0,0021	<i>B*15:09:01</i>	0,0021	<i>C*02:02:02:03</i>	0,0124
<i>A*02:02:01:01</i>	0,0021	<i>B*15:17:01:01</i>	0,0083	<i>C*03:02:02:01</i>	0,0062
<i>A*02:05:01:01</i>	0,0041	<i>B*15:18:01:02</i>	0,0062	<i>C*03:03:01:01</i>	0,0353
<i>A*02:06:01:01</i>	0,0021	<i>B*15:24:01</i>	0,0021	<i>C*03:04:01:01</i>	0,0498
<i>A*02:06:01:04</i>	0,0021	<i>B*18:01:01:01</i>	0,0021	<i>C*03:04:01:02</i>	0,0104
<i>A*02:07:01:01</i>	0,0041	<i>B*18:01:01:02</i>	0,0913	<i>C*04:01:01:01</i>	0,0934
<i>A*02:08:01</i>	0,0021	<i>B*27:02:01:01</i>	0,0145	<i>C*04:01:01:06</i>	0,0290
<i>A*02:17:02:01</i>	0,0041	<i>B*27:05:02:01</i>	0,0373	<i>C*04:03:01:01</i>	0,0021
<i>A*03:01:01:01</i>	0,1058	<i>B*27:05:03</i>	0,0021	<i>C*05:01:01:01</i>	0,0021
<i>A*03:01:01:05</i>	0,0021	<i>B*27:12:01:02</i>	0,0021	<i>C*05:01:01:02</i>	0,0436
<i>A*03:02:01:01</i>	0,0041	<i>B*27:14</i>	0,0021	<i>C*06:02:01:01</i>	0,0871
<i>A*11:01:01</i>	0,0062	<i>B*35:01:01:02</i>	0,0353	<i>C*06:02:01:02</i>	0,0083
<i>A*11:01:01:01</i>	0,0373	<i>B*35:01:01:51</i>	0,0021	<i>C*07:01:01</i>	0,0021
<i>A*23:01:01:01</i>	0,0373	<i>B*35:01:01:60</i>	0,0021	<i>C*07:01:01:01</i>	0,1017
<i>A*24:02:01:01</i>	0,0851	<i>B*35:02:01:01</i>	0,0083	<i>C*07:01:01:09</i>	0,0021
<i>A*24:02:01:04</i>	0,0041	<i>B*35:03:01:01</i>	0,0270	<i>C*07:01:02:01</i>	0,0083
<i>A*24:02:01:05</i>	0,0062	<i>B*35:08:01:01</i>	0,0104	<i>C*07:02:01:01</i>	0,0249
<i>A*25:01:01:01</i>	0,0602	<i>B*37:01:01:01</i>	0,0145	<i>C*07:02:01:03</i>	0,0913
<i>A*26:01:01:01</i>	0,0373	<i>B*38:01:01:01</i>	0,0311	<i>C*07:02:01:10</i>	0,0021
<i>A*26:08:01:01</i>	0,0021	<i>B*39:01:01:03</i>	0,0228	<i>C*07:04:01:01</i>	0,0332
<i>A*29:01:01:01</i>	0,0021	<i>B*39:06:02:01</i>	0,0041	<i>C*07:07</i>	0,0021
<i>A*29:02:01:01</i>	0,0207	<i>B*40:01:02:01</i>	0,0394	<i>C*08:01:01:01</i>	0,0021
<i>A*29:02:01:08</i>	0,0021	<i>B*40:02:01:01</i>	0,0207	<i>C*08:02:01:01</i>	0,0166
<i>A*30:01:01:01</i>	0,0270	<i>B*40:06:04:01</i>	0,0021	<i>C*08:02:01:02</i>	0,0021
<i>A*30:02:01:01</i>	0,0021	<i>B*41:01:01:01</i>	0,0166	<i>C*08:03:01:01</i>	0,0021
<i>A*31:01:02:01</i>	0,0270	<i>B*41:02:01:01</i>	0,0104	<i>C*12:02:02:01</i>	0,0187
<i>A*31:01:02:04</i>	0,0021	<i>B*44:02:01:01</i>	0,0415	<i>C*12:03:01:01</i>	0,1079
<i>A*32:01:01:01</i>	0,0270	<i>B*44:02:01:03</i>	0,0124	<i>C*14:02:01:01</i>	0,0145
<i>A*33:01:01:01</i>	0,0104	<i>B*44:03:01:01</i>	0,0519	<i>C*14:03:01:01</i>	0,0021
<i>A*33:03:01:01</i>	0,0041	<i>B*44:05:01:01</i>	0,0062	<i>C*15:02:01:01</i>	0,0124
<i>A*34:02:01:01</i>	0,0021	<i>B*44:27:01:01</i>	0,0124	<i>C*15:02:01:03</i>	0,0021
<i>A*66:01:01:01</i>	0,0021	<i>B*44:29</i>	0,0021	<i>C*15:04:01:01</i>	0,0021
<i>A*68:01:01:02</i>	0,0124	<i>B*46:01:01:01</i>	0,0041	<i>C*15:05:01:01</i>	0,0041
<i>A*68:01:02:01</i>	0,0062	<i>B*48:01:01:01</i>	0,0062	<i>C*15:05:02:01</i>	0,0041
<i>A*68:01:02:02</i>	0,0207	<i>B*49:01:01:01</i>	0,0166	<i>C*15:13:01:01</i>	0,0021
<i>A*68:02:01:01</i>	0,0124	<i>B*50:01:01:01</i>	0,0083	<i>C*16:01:01:01</i>	0,0187
<i>A*68:24</i>	0,0041	<i>B*51:01:01:01</i>	0,0415	<i>C*16:02:01:01</i>	0,0041
<i>A*69:01:01:01</i>	0,0021	<i>B*51:01:01:03</i>	0,0083	<i>C*16:04:01:01</i>	0,0062
<i>B*07:02:01:01</i>	0,0954	<i>B*51:07:01</i>	0,0041	<i>C*17:01:01:05</i>	0,0104
<i>B*07:02:01:02</i>	0,0021	<i>B*52:01:01:01</i>	0,0021	<i>C*17:03:01:01</i>	0,0083
<i>B*07:05:01:01</i>	0,0041	<i>B*52:01:01:02</i>	0,0187	<i>C*17:03:01:03</i>	0,0021
<i>B*08:01:01:01</i>	0,0498	<i>B*53:01:01:01</i>	0,0041	<i>C*18:02:01:01</i>	0,0062

дайцев некоторых племен генетическим фактором риска развития тяжёлой формы заболевания является аллель *DRB1*14:02*, кодирующий SE. Аллели *DRB1*01:03*, *DRB1*13:01*, *DRB1*13:02*, *DRB1*04:02*, как установлено

но, являются протективными в отношении развития ревматоидного артрита [6]. Важность этнической принадлежности для оценки ассоциации между риском развития ревматоидного артрита и вариантами *HLA-DRB1*04*

и *HLA-DRB1*13* подтверждены результатами метаанализа данных, полученных при обследовании представителей 24 популяций [7].

Цель исследования – сравнительный анализ полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости I и II классов с помощью метода секвенирования нового поколения.

Материал и методы. В исследование включена группа здоровых индивидуумов – 241 человек, русские (восточнославянский народ), проживающие в Ростовской области. Идентификация этнической принадлежности осуществлена на основании анкетных данных. Геномная ДНК выделена из ядроодержащих клеток периферической крови с помощью наборов PROTRANS AGATHA Automated (Protrans, Германия) согласно инструкции производителя. Гены *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* секвенированы методом NGS на платформе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора NGSeq (GenDx, Нидерланды). Полученные последовательности проанализированы с помощью программного обеспечения NGSeqine версия 3.1.2

(GenDx, Нидерланды) и базы данных IPD-IMGT/HLA версия 3.53. Частоты HLA-аллелей и гаплотипов рассчитаны методом максимального правдоподобия с помощью EM-алгоритма с применением программы Arlequin версия 3.5 [8]. Сравнительный анализ частот HLA гаплотипов в популяциях выполнен с помощью точного теста Фишера и критерия χ^2 -квадрат Пирсона с применением программного обеспечения СТАТИСТИКА 10.

Результаты. В ходе исследования у русских Ростовской области выявлено 228 HLA аллелей, из них 156 аллелей I класса, 72 аллеля II класса. Максимальное количество аллельных вариантов определено при типировании гена *HLA-B* (62 аллеля), далее следуют *HLA-A* (48 аллелей), *-C* (46 аллелей), *-DRB1* (40 аллелей), *-DQB1* (32 аллеля). Наиболее распространённые аллели каждого HLA гена: *A*02:01:01:01* (26,97%), *B*07:02:01:01* (9,54%), *C*12:03:01:01* (10,79%), *DRB1*07:01:01:01* (13,90%), *DQB1*03:01:01:02* (13,28%). Частоты аллелей HLA класса I представлены в табл. 1, аллелей HLA класса II – в табл. 2.

Таблица 2

Частоты аллелей HLA класса II у русских Ростовской области

Аллель	Частота, доля	Аллель	Частота, доля
<i>DRB1*01:01:01:01</i>	0,1120	<i>DRB1*15:02:01:02</i>	0,0187
<i>DRB1*01:02:01:01</i>	0,0104	<i>DRB1*15:02:02:01</i>	0,0021
<i>DRB1*03:01:01:01</i>	0,0560	<i>DRB1*15:03:01:01</i>	0,0041
<i>DRB1*04:01:01</i>	0,0021	<i>DRB1*16:01:01:01</i>	0,0394
<i>DRB1*04:01:01:01</i>	0,0436	<i>DQB1*02:01:01</i>	0,0021
<i>DRB1*04:02:01</i>	0,0166	<i>DQB1*02:01:01:01</i>	0,0560
<i>DRB1*04:03:01:01</i>	0,0062	<i>DQB1*02:02</i>	0,0041
<i>DRB1*04:04:01:02</i>	0,0187	<i>DQB1*02:02:01:01</i>	0,0975
<i>DRB1*04:05:01:01</i>	0,0104	<i>DQB1*02:02:01:02</i>	0,0083
<i>DRB1*04:07:01:01</i>	0,0021	<i>DQB1*02:02:01:03</i>	0,0021
<i>DRB1*04:08:01:01</i>	0,0083	<i>DQB1*03:01:01</i>	0,0062
<i>DRB1*07:01:01</i>	0,0041	<i>DQB1*03:01:01:01</i>	0,0270
<i>DRB1*07:01:01:01</i>	0,1390	<i>DQB1*03:01:01:02</i>	0,1328
<i>DRB1*08:01:01:01</i>	0,0498	<i>DQB1*03:01:01:05</i>	0,0166
<i>DRB1*08:03:02:01</i>	0,0021	<i>DQB1*03:01:01:06</i>	0,0187
<i>DRB1*08:04:01:01</i>	0,0062	<i>DQB1*03:01:01:19</i>	0,0021
<i>DRB1*09:01:02:01</i>	0,0145	<i>DQB1*03:02:01</i>	0,0041
<i>DRB1*10:01:01:01</i>	0,0145	<i>DQB1*03:02:01:01</i>	0,0726
<i>DRB1*11:01:01</i>	0,0021	<i>DQB1*03:02:01:11</i>	0,0021
<i>DRB1*11:01:01:01</i>	0,0622	<i>DQB1*03:03:02:01</i>	0,0311
<i>DRB1*11:03:01</i>	0,0062	<i>DQB1*03:03:02:02</i>	0,0124
<i>DRB1*11:04:01:01</i>	0,0519	<i>DQB1*03:04:01:02</i>	0,0041
<i>DRB1*12:01:01:01</i>	0,0207	<i>DQB1*04:02:01:01</i>	0,0498
<i>DRB1*13:01:01:01</i>	0,0705	<i>DQB1*04:02:01:06</i>	0,0062
<i>DRB1*13:02:01:01</i>	0,0083	<i>DQB1*05:01:01:01</i>	0,0104
<i>DRB1*13:02:01:02</i>	0,0332	<i>DQB1*05:01:01:02</i>	0,1120
<i>DRB1*13:03:01:01</i>	0,0332	<i>DQB1*05:01:01:05</i>	0,0166
<i>DRB1*13:05:01:01</i>	0,0021	<i>DQB1*05:02:01:01</i>	0,0436
<i>DRB1*13:15</i>	0,0021	<i>DQB1*05:03:01:01</i>	0,0228
<i>DRB1*14:01:01:01</i>	0,0083	<i>DQB1*06:01:01:01</i>	0,0228
<i>DRB1*14:04:01:01</i>	0,0021	<i>DQB1*06:02:01:01</i>	0,1037
<i>DRB1*14:05:01:01</i>	0,0021	<i>DQB1*06:02:01:31</i>	0,0041
<i>DRB1*14:07:01</i>	0,0021	<i>DQB1*06:03:01:01</i>	0,0685
<i>DRB1*14:12:01</i>	0,0021	<i>DQB1*06:03:01:16</i>	0,0021
<i>DRB1*14:54:01:01</i>	0,0083	<i>DQB1*06:04:01:01</i>	0,0290
<i>DRB1*15:01:01:01</i>	0,1017	<i>DQB1*06:09:01:01</i>	0,0083

Частоты гетерозигот в различных HLA локусах, наблюдаемые в обследованной популяции, сопоставлены с ожидаемыми (рассчитанными согласно закону Харди-Вайнберга) частотами. Наблюдаемые и ожи-

даемые величины не имели достоверных различий ($p>0,05$), что свидетельствует о соответствии распределения гетерозигот во всех локусах закону Харди-Вайнберга (табл. 3).

Таблица 3
 Анализ соответствия распределения гетерозигот закону Харди-Вайнберга

Локус	Гетерозиготность		<i>p</i>	Стандартное отклонение
	Наблюдаемая частота	Ожидаемая частота		
HLA-A	0,88797	0,88735	0,08566	0,00009
HLA-B	0,92946	0,96205	0,18889	0,00009
HLA-C	0,92116	0,94000	0,29133	0,00016
HLA-DRB1	0,92531	0,93440	0,19571	0,00010
HLA-DQB1	0,89627	0,92895	0,13770	0,00015

В результате анализа у русских Ростовской области определены 355 HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 гаплотипов, девять из которых имели частоту более 1,0%. Наиболее распространённым гаплотипом являлся *A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01:01-DQB1*06:02:01:01* (2,07%), далее следовали *A*01:01:01:01-B*08:01:01-01-*

*C*07:01:01:01-DRB1*03:01:01:01-DQB1*02:01:01:01* (1,94%), *A*02:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01*, *A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01* (1,66% каждый). HLA гаплотипы, наиболее часто встречающиеся в обследованной популяции (частота от 0,75% до 2,07%), представлены в табл. 4.

Таблица 4
 Наиболее распространенные HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 гаплотипы у русских Ростовской области

№ п/п	Гаплотип	Частота гаплотипа, доля	Стандартное отклонение
1	<i>A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01:01-DQB1*06:02:01:01</i>	0,0207	0,0065
2	<i>A*01:01:01:01-B*08:01:01:01-C*07:01:01:01-DRB1*03:01:01:01-DQB1*02:01:01:01</i>	0,0194	0,0062
3	<i>A*02:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	0,0166	0,0064
4	<i>A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	0,0166	0,0056
5	<i>A*02:01:01:01-B*44:27:01:01-C*07:04:01:01-DRB1*16:01:01:01-DQB1*05:02:01:01</i>	0,0124	0,0053
6	<i>A*23:01:01:01-B*44:03:01:01-C*04:01:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	0,0124	0,0048
7	<i>A*02:01:01:01-B*18:01:01:02-C*07:01:01:01-DRB1*11:04:01:01-DQB1*03:01:01:02</i>	0,0104	0,0053
8	<i>A*30:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	0,0104	0,0052
9	<i>A*02:01:01:01-B*40:01:02:01-C*03:04:01:01-DRB1*08:01:01:01-DQB1*04:02:01:01</i>	0,0104	0,0048
10	<i>A*02:01:01:01-B*52:01:01:02-C*12:02:02:01:01-DRB1*15:02:01:02-DQB1*06:01:01:01</i>	0,0083	0,0050
11	<i>A*02:01:01:01-B*18:01:01:02-C*12:03:01:01:01-DRB1*15:01:01:01-DQB1*06:02:01:01</i>	0,0083	0,0049
12	<i>A*03:01:01:01-B*35:03:01:01-C*04:01:01:01-DRB1*01:01:01:01-DQB1*05:01:01:02</i>	0,0083	0,0046
13	<i>A*25:01:01:01-B*18:01:01:02-C*12:03:01:01:01-DRB1*04:01:01:01-DQB1*03:02:01:01</i>	0,0083	0,0046
14	<i>A*26:01:01:01-B*38:01:01:01-C*12:03:01:01:01-DRB1*04:02:01:01-DQB1*03:02:01:01</i>	0,0083	0,0038
15	<i>A*02:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*01:01:01:01-DQB1*05:01:01:02</i>	0,0076	0,0049
16	<i>A*03:01:01:01-B*08:01:01:01-C*07:01:01:01-DRB1*03:01:01:01-DQB1*02:01:01:01</i>	0,0075	0,0050

В связи с ограниченным количеством публикаций, отражающих частоты *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1* гаплотипов на уровне аллельного разрешения в русских популяциях, для проведения сравнительного анализа использованы данные исследования, посвященного иммуногенети-

ческим характеристикам русских Нижнего Новгорода [9-11]. Результаты сравнительного анализа частот гаплотипов, принадлежащих к числу наиболее распространенных (частота более 1%) у русских Ростовской области и/или русских Нижнего Новгорода представлены в табл. 5.

Таблица 5

Сравнительный анализ частот *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1* гаплотипов в двух русских популяциях

Гаплотип	Частота гаплотипа, %		<i>p</i>
	Русские-ростовчане, <i>n</i> =241	Русские-нижегородцы, <i>n</i> =1510	
<i>A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01:01</i>	2,07	2,51	0,82
<i>A*01:01:01:01-B*08:01:01:01-C*07:01:01:01-DRB1*03:01:01-DQB1*02:01:01</i>	1,94	4,53	0,08
<i>A*02:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	1,66	1,55	0,78
<i>A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	1,66	0,298	0,016
<i>A*02:01:01:01-B*44:27:01:01-C*07:04:01:01-DRB1*16:01:01-DQB1*05:02:01:01</i>	1,24	0,76	0,43
<i>A*23:01:01:01-B*44:03:01:01-C*04:01:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	1,24	0,82	0,45
<i>A*02:01:01:01-B*18:01:01:02-C*07:01:01:01-DRB1*11:04:01:01-DQB1*03:01:01:02</i>	1,04	0,70	0,43
<i>A*02:01:01:01-B*40:01:02:01:01-C*03:04:01:01-DRB1*08:01:01-DQB1*04:02:01:01</i>	1,04	0,26	0,06
<i>A*30:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02:01:01</i>	1,04	1,02	0,73
<i>A*02:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01</i>	0,41	2,93	0,015
<i>A*03:01:01:01-B*35:01:01:05-C*04:01:01:11-DRB1*01:01:01-DQB1*05:01</i>	0	2,39	-
<i>A*25:01:01:01-B*18:01:01:02/05-C*12:03:01:01-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01</i>	0	1,18	-
<i>A*02:01:01:01-B*41:02:01:01/02-C*17:03:01:01-DRB1*13:03:01-DQB1*03:01/03:276N</i>	0,41	1,13	0,50

Примечание. -расчет значения *p* не производился в связи с отсутствием гаплотипа в одной из сравниваемых групп.

Установлено, что гаплотип *A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01:01-DRB1*07:01:01:01-DQB1*02:02:01:01* значительно чаще встречается у русских-ростовчан; гаплотип *A*02:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01* более распространён у русских-нижегородцев. Гаплотип *A*03:01:01:01-B*35:01:01:05-C*04:01:01:11-DQB1*05:01* определён только у русских-нижегородцев; у русских-ростовчан встречается гаплотип *A*03:01:01:01-B*35:01:01:02-C*04:01:01:01-DRB1*01:01:01:01-DQB1*05:01:02* (частота 0,62%). Аллели генов *HLA-B* и *HLA-C*, определяющие различия этих двух гаплотипов, отличаются нуклеотидными заменами в инtronах. Гаплотип *A*25:01:01:01-B*18:01:01:02/05-C*12:03:01:01-DRB1*15:01:01-DQB1*06:02:01*, распространенный у русских Нижнего Новгорода, не выявлен у обследованных русских-ростовчан.

Обсуждение. На территории Ростовской области проживает более 150 этнических групп, среди которых наиболее многочисленными являются русские (91,69%

населения), армяне (2,19%), турки (1,03%) [12]. Многонациональный состав населения, наличие русской этносословной группы казаков, поддерживавшей межэтнические браки из-за специфики образа жизни и бытового уклада, оказали влияние на формирование популяции русских Ростовской области [13]. Как показало исследование, выполненное нами ранее на основании данных HLA типирования низкого уровня разрешения, генетические дистанции между русскими-петербуржцами и русскими-ростовчанами несколько больше дистанций между русскими-петербуржцами и русскими-нижегородцами или русскими-москвичами [14]. Результаты работы подтверждают наличие иммуногенетических особенностей у русских Ростовской области. В частности, гаплотип *A*29:02:01:01-B*44:03:01:01-C*16:01:01:01-DRB1*07:01:01-DQB1*02:02:01:01* характерен для русских-ростовчан и очень редко встречается у русских Нижнего Новгорода (1,66% против 0,298%; *p*=0,016). Из аллелей, составляющих этот гаплотип, *A*29:02:01:01* и *B*44:03:01:01* имеют значимо большее распространение у русских Ростовской области. Частота аллеля *A*29:02:01:01* у русских-ростов-

чен составляет 2,07% против 0,53% у русских-нижегородцев ($p=0,02$). Частота аллеля $B^{*}44:03:01:01$ насчитывает 5,19% против 0,63% у русских-нижегородцев ($p<0,0001$). Полученные данные имеют значение не только для изучения этногенеза, но и для медицинских исследований.

Исследователями из Ростовской области отмечена корреляция между аллельной группой $DRB1*04$ и повышенным риском развития ревматоидного артрита, протективный эффект аллельной группы $HLA-DRB1*13$ [15]. Поскольку указанные группы объединяют различные HLA аллели, для более точного выделения генетических факторов риска и их использования в качестве критериев дифференциальной диагностики необходимо выполнить HLA типирование аллельного уровня разрешения группы больных ревматоидным артритом. Определение иммуногенетических факторов риска развития заболеваний базируется на сравнении частот HLA аллелей и гаплотипов в здоровой популяции и в группе пациентов с верифицированным диагнозом, принадлежащих к одной этнической группе. Полученные данные отражают иммуногенетический профиль здоровых лиц русской национальности проживающих в Ростовской области и могут быть использованы в качестве контрольных значений.

Заключение. С помощью метода секвенирования нового поколения впервые изучены частоты HLA аллелей и гаплотипов в популяции русских Ростовской области. Установленные иммуногенетические характеристики могут быть использованы для проведения медицинских, фармакогенетических, антропологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Хайтов Р.М., Алексеев Л.П., Болдырева М.Н., Сароянц Л.В. Полиморфизм генов иммунного ответа и его роль в противоинфекционной защите. *Иммунология*. 2013; 3: 32-144.
- Robinson J., Barker D., Marsh S.G.E. 25 years of the IPD-IMGT/HLA Database. *HLA*. 2024; 103 (6): e15549. DOI: 10.1111/tan.15549.
- Павлова И.Е., Кузьмич Е.В., Хамаганова Е.Г., Рудик Д.В., Кузьминова Е.П., Абдрахимова А.Р. Сравнительный анализ результатов типирования HLA-генов методом NGS с использованием различных платформ. *Медицинская иммунология*. 2024; 26(4): 217-26. DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-16916.
- Gonzalez-Galarza F.F., McCabe A., Melo dos Santos E.J., James Jones J., Takeshita L., Ortega-Rivera N.D. et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Research*. 2020; 48(D1): D783-D788. DOI: 10.1093/nar/gkz1029.
- Furukawa H., Oka S., Shimada K., Hashimoto A., Tohma S. Human leukocyte antigen polymorphisms and personalized medicine for rheumatoid arthritis. *J. Hum. Genet.* 2015; 60(11): 691-6. DOI: 10.1038/jhg.2015.36.
- Liu B., Shao J., Fu R. Current research status of HLA in immune-related diseases. *Immun. Inflamm. Dis.* 2021; 9: 340-50. DOI: 10.1002/iid3.416.
- Kuranov A.B., Boldyreva M.N., Momynaliev K.T. A meta-analysis of associations of HLA-DRB1 with rheumatoid arthritis. *Immunologiya*. 2017; 38(3): 140-3. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-140-143. (in Russian)
- Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis, ver. 3.5.2.2. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.
- Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA diversity in Russians revealed by next generation sequencing. *HLA*. 2021; 97(4): 326-7. DOI: 10.1111/tan.14227.
- Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA diversity in Russians revealed by next generation sequencing. *HLA*. 2021; 97(4): 326-7. DOI: 10.1111/tan.14227.
- Куранов А.Б., Болдырева М.Н., Момыналиев К.Т. Метаанализ ассоциаций HLA-DRB1 с ревматоидным артритом. *Иммунология*. 2017; 38(3): 140-3. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-140-143.
- Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis, ver. 3.5.2.2. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.
- Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA diversity in Russians revealed by next generation sequencing. *HLA*. 2021; 97(4): 326-7. DOI: 10.1111/tan.14227.
- Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA diversity in Russians revealed by next generation sequencing. *HLA*. 2021; 97(4): 326-7. DOI: 10.1111/tan.14227.
- С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA-гаплотипы потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, исследованных методом секвенирования следующего поколения. *Трансфузиология*. 2021; 22(3): 196-211.
- HLA haplotype freq search. Allele Frequency Net Database. Available at: <https://www.allelefrequencies.net/hla6003a.asp>.
- Итоги Всероссийской переписи населения 2020 года. Т. 5. Национальный состав и владение языками. 2. Национальный состав населения Ростовской области. Доступно на: <https://61.rosstat.gov.ru/folder/57001>.
- Кропачев С.А. Локальные группы русского этноса в конце XIX - первой четверти XX века: историко-демографическое исследование. *Известия Кomi научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Серия «Историческая демография»*. 2023; 8(6): 34-9. DOI: 10.19110/1994-5655-2023-8-34-39.
- Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Бубнова Л.Н. Генетические дистанции между русскими различных регионов России и другими популяциями. *Медицинская иммунология*. 2024. Available at: <https://www.mimmun.ru/mimmun/article/view/2886>.
- Ханов А.Г., Палухин С.И., Ищенкова И.В., Кудинова Э.Е., Труфанова Т.И., Савченко О.А. и соавт. Типирование антигенов HLA-A, -B и гена DRB1 в клинической практике у пациентов ростовской популяции для ранней диагностики ревматоидного артрита. *Южно-Российский журнал терапевтической практики*. 2022; 3(4): 61-9. DOI: 10.21886/2712-8156-2022-3-4-61-69.

REFERENCES

1. Khaitov R.M., Alexeev L.P., Boldyreva M.N., Saroyants L.V. Polymorphism of immune response genes and its protective role against infections. *Immunologiya*. 2013; 3: 32-144. (in Russian)
2. Robinson J., Barker D., Marsh S.G.E. 25 years of the IPD-IMGT/HLA Database. *HLA*. 2024; 103 (6): e15549. DOI: 10.1111/tan.15549.
3. Pavlova I.E., Kuz'mich E.V., Khamaganova E.G., Rudik D.V., Kuz'minova E.P., Abdrahimova A.R. Comparative analyses of the results of HLA genes typing by NGS method using different platforms. *Meditinskaya immunologiya*. 2024; 26(4): 217-26. DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-16916. (in Russian)
4. Gonzalez-Galarza F.F., McCabe A., Melo dos Santos E.J., James Jones J., Takeshita L., Ortega-Rivera N.D. et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Research*. 2020; 48(D1): D783-D788. DOI: 10.1093/nar/gkz1029.
5. Furukawa H., Oka S., Shimada K., Hashimoto A., Tohma S. Human leukocyte antigen polymorphisms and personalized medicine for rheumatoid arthritis. *J. Hum. Genet.* 2015; 60(11): 691-6. DOI: 10.1038/jhg.2015.36.
6. Liu B., Shao J., Fu R. Current research status of HLA in immune-related diseases. *Immun. Inflamm. Dis.* 2021; 9: 340-50. DOI: 10.1002/iid3.416.
7. Kuranov A.B., Boldyreva M.N., Momynaliev K.T. A meta-analysis of associations of HLA-DRB1 with rheumatoid arthritis. *Immunologiya*. 2017; 38(3): 140-3. DOI: 10.18821/0206-4952-2017-38-3-140-143. (in Russian)
8. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis, ver. 3.5.2.2. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.
9. Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrahimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA diversity in Russians revealed by next generation sequencing. *HLA*. 2021; 97(4): 326-7. DOI: 10.1111/tan.14227.
10. Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrahimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA-haplotypes in potential hematopoietic stem cell donors of National Research Center for Hematology. *Transfuziologiya*. 2021; 22(3): 196-211. (in Russian)
11. HLA haplotype freq search. Allele Frequency Net Database. Available at: <https://www.allelefrequencies.net/hla6003a.asp>.
12. Results of the All-Russian Population Census 2020. Т. 5. National composition and language proficiency. 2. National composition of the population of the Rostov region. Available at: <https://61.rosstat.gov.ru/folder/57001>.

- ru/folder/57001. (in Russian)
- 13. Kropachev S.A. Local groups of the Russian ethnos at the end of the XIX-first quarter of the XX centuries: historical and demographic research. *Izvestiya Komi nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya Rossийskoy Akademii Nauk. Seriya «Istoricheskaya demografiya»*. 2023; 8(66): 34-9. DOI: 10.19110/1994-5655-2023-8-34-39. (in Russian)
 - 14. Kuz'mich E.V., Pavlova I.E., Bubnova L.N. Genetic distances between Russians of different regions of Russia and other populations.
 - 15. Khanov A.G., Palukhin S.I., Ishchenkova I.V., Kudinova E.E., Trufanova T.I., Savchenko O.A. et al. Typing of HLA-A, -B and DRB1 antigens in clinical practice in patients of the Rostov population for early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Yuzhno-Rossiyskiy zhurnal terapevticheskoy praktiki*. 2022; 3(4): 61-9. DOI: 10.21886/2712-8156-2022-3-4-61-69. (in Russian)

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%).





ЭКОлаб

производитель диагностических
наборов и лекарственных
препараторов

ДИАГНОСТИКА ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА

«ИФА-Трийодтиронин общий»

«Тест- система иммуноферментная
для количественного определения общего трийодтиронина (T3)»

«ИФА-тиroxин-общий»

«Тест- система иммуноферментная
для количественного определения общего тироксина (T4)»

«ИФА-тиroxин-свободный»

«Тест-система иммуноферментная
для количественного определения свободного тироксина
в сыворотке (плазме) крови человека»

«ИФА-ТТГ»

«Тест- система иммуноферментная
для количественного определения тиреотропного гормона»

«ИФА-свободная β-ХГЧ»

«Тест- система иммуноферментная
для количественного определения свободной β-субъединицы
хорионического гонадотропина человека
в сыворотке крови человека»

www.ekolab.ru

142530, Российская Федерация, Московская область,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1
тел. 8-800-333-33-47
e-mail: ekolab-sbyt@mail.ru



ЭКОлаб

производитель диагностических
наборов и лекарственных
препаратов

ДИАГНОСТИКА ГЕРПЕТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ

«ИФА-ВПГ-1+2-IgM»

«Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу простого герпеса I и II типа»

«ИФА-ВПГ-1-IgG»

«Тест-система иммуноферментная для выявления антител класса G к вирусу простого герпеса I типа»

«ИФА-ВПГ-2-IgG»

«Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса II типа»

«ИФА-ВПГ-1+2-IgG»

«Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса I и II типов»

«ИФА-антиВПГ-1+2-IgG-авидность»

«Тест-система иммуноферментная для определения индекса авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса простого I и II типов»

«ИФА-ВГЧ6-IgG»

«Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса человека VI типа»

«ИФА-ВГЧ8-IgG»

«Тест-система иммуноферментная для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса человека VIII типа»

www.ekolab.ru

142530, Российская Федерация, Московская область,
г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1
тел. 8-800-333-33-47
e-mail: ekolab-sbyt@mail.ru



ЭКОлаб

производитель диагностических наборов и лекарственных препаратов

ИХА-АФП

Набор реагентов предназначен для качественного выявления альфа-фетопротеина (АФП) для обследования лиц всех возрастов с целью первичной диагностики рака яичников и печени. Увеличение уровня белка может быть связано с развитием рака печени, рака яичек у мужчин, наличием метастазов в печень, хронических гепатитов, цирроза печени



Все расходные материалы в комплекте



Быстрый результат через 10 минут



Срок годности 25 месяцев

Аналитическая чувствительность

10 нг/мл

Комплектация

1 определение

20 определений

40 определений



Исследуемый образец

СЫВОРОТКА · ПЛАЗМА · КРОВЬ



2 капли крови



или 40 мкл сыворотки

Каталожный номер

89.01



г. Электрогорск
ул. Буденного, д.1



ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru
8-800-333-33-47



ЭКОлаб

производитель диагностических наборов и лекарственных препаратов

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ



Все расходные материалы в комплекте



Быстрый результат
через 10 минут



Срок годности
25 месяцев

ИХА-HBsAg

Качественное выявление
поверхностного антигена
вируса гепатита В



Исследуемый образец

СЫВОРОТКА · ПЛАЗМА · КРОВЬ



2 капли крови



или 40 мкл сыворотки

Кат. № 97.01

ИХА-антиВГС

Качественное определение
суммарных антител к антигенам
вируса гепатита С



Исследуемый образец

СЫВОРОТКА · ПЛАЗМА · КРОВЬ



1 капля крови



или 40 мкл сыворотки

Кат. № 94.01



г. Электрогорск
ул. Буденного, д.1



ekolab.ru



ekolab-sbyt@mail.ru
8-800-333-33-47

АНГИНА • ФАРИНГИТ • ЛАРИНГИТ



Для детей и взрослых

Быстрый результат
через 5-10 минут

Инфекции, вызванные
стрептококком гр. А



ekolab.ru



Работаем
с 1991 года



Покупайте на маркетплейсах
ozon.ru и wildberries.ru

ВОЗМОЖНЫ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ, ПРОКОНСУЛЬТИРУЙТЕСЬ СО СПЕЦИАЛИСТОМ

Не дайте ОРВИ шанса —
сделайте экспресс-тест!



Для детей до 1 года
и взрослых

Быстрый результат
через 5-10 минут

При первых
симптомах ОРВИ



ekolab.ru



Работаем
с 1991 года



Покупайте на маркетплейсах
ozon.ru и wildberries.ru

ВОЗМОЖНЫ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ, ПРОКОНСУЛЬТИРУЙТЕСЬ СО СПЕЦИАЛИСТОМ

МИКРОБИОЛОГИЯ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Борисова О.Ю.^{1,3}, Чагина И.А.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Андриевская И.Ю.¹,
Миронов А.Ю.^{1,4}, Полосенко О.В.², Подопригора И.В.³, Сидорова Н.А.⁵

<https://elibrary.ru/rokqgh>

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДЫ ГИССА С КРАХМАЛОМ И ИНДИКАТОРА АНДРЕДЕДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НА ДИФТЕРИЙНУЮ ИНФЕКЦИЮ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Московская область, п. Оболенск, Россия;

³ФГАОУ ВО Российской университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, 117198, г. Москва, Россия;

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, г. Москва, Россия

⁵ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора, 129626, г. Москва, Россия

Дифтерия продолжает оставаться актуальным заболеванием даже в странах с многолетней массовой вакцинопрофилактикой. Наибольшее опасение вызывает ситуация в Африканском регионе, где с начала 2023 года продолжается рост случаев заболеваний и смерти от дифтерии. В Российской Федерации случаев заболевания дифтерией и бактерионосительства в 2023 году не зарегистрировано. Сохраняется риск завозных случаев дифтерии на территорию нашей страны. С целью сохранения благополучной ситуации по дифтерии необходимо поддерживать качественный уровень бактериологической диагностики с проведением всех регламентированных нормативными документами тестов, включая определение токсигенности и биовара возбудителя.

Цель: модификация рецепта приготовления индикатора Андреде и дифференциально-диагностической среды Гисса с крахмалом для определения биовара *Corynebacterium diphtheriae*.

Материал и методы. Использованы контрольные токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *titis* № 6765, токсигенные штаммы *C. ulcerans* №№ 675 и 7819, *C. pseudodiphtheriticum* «Соколов», штамм *Staphylococcus aureus* 25923, дикие токсигенные штаммы *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*. Культивирование штаммов проводили согласно МУ 4.2.3065-13 и 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Результаты и обсуждение. Проведены исследования по разработке модернизированного рецепта приготовления индикатора Андреде для определения ферментации крахмала при идентификации биовара возбудителя дифтерийной инфекции. Представлены результаты сравнительных исследований с индикатором Андреде, приготовленным по ранее предложенному рецепту и модернизированному варианту с использованием химического реактива – крахмал четырёх отечественных производителей. Определены сроки хранения готовой среды Гисса с индикатором Андреде в лаборатории.

Заключение. Модернизированный рецепт индикатора Андреде и приготовления среды Гисса с крахмалом позволит повысить эффективность и исключить ошибки при идентификации биовара у *C. diphtheriae*.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; бактериологическая диагностика; сахаролитическая активность; крахмал; среда Гисса; индикатор Андреде

Для цитирования: Борисова О.Ю., Чагина И.А., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Андриевская И.Ю., Миронов А.Ю., Полосенко О.В., Подопригора И.В., Сидорова Н.А. Совершенствование среды Гисса с крахмалом и индикатора Андреде для бактериологического исследования на дифтерийную инфекцию. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70(3): 190-195.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-190-195>

EDN: ROKQGH

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций; e-mail: olgborisova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 25.11.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликовано 25.02.2025

Borisova O. Yu.^{1,3}, Chagina I.A.¹, Gadua N.T.¹, Pimenova A.S.¹, Andrievskaya I.Yu.¹, Mironov A.Yu.^{1,4}, Polosenko O.V.², Podoprigora I.V.³, Sidorova N.A.⁵

IMPROVEMENT OF GISSA MEDIUM WITH STARCH AND ANDREDE INDICATOR FOR BACTERIOLOGICAL EXAMINATION FOR DIPHTHERIA INFECTION

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

²FBIS State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology Rospotrebnadzor, 142279, Moscow Region, Obolensk,

Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Russia, 117198, Moscow, Russia;

⁴Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia;

⁵FBUZ Center for Hygiene and Epidemiology in Moscow Rospotrebnadzor, 129626, Moscow, Russia

Diphtheria continues to be relevant diseases even in countries with many years of mass vaccine prevention. The greatest concern is the situation in the African region, where the increase in cases and deaths from diphtheria has continued since the beginning of 2023. In the Russian Federation, no cases of diphtheria and bacterial carriers were registered in 2023. In this regard, the risk of imported cases of diphtheria to the territory of our country remains. Therefore, in order to maintain a favorable situation for diphtheria, it is necessary to maintain a qualitative level of bacteriological diagnostics with all tests by regulatory documents, including the determination of toxigenicity and biovar of the pathogen.

Purpose. Modification of the recipe for the preparation of the Andrede indicator and Gissa medium with starch to determine the biovar *C. diphtheriae*.

Material and methods. Control toxigenic strains of *C. diphtheriae* biovar *gravis* № 665, toxigenic strain of *C. diphtheriae* biovar *mitis* № 6765, toxigenic strains of *C. ulcerans* № 675 and 7819, *C. pseudodiphtheriticum* Sokolov, strain *Staphylococcus aureus* were used 25923, as well as wild toxigenic strains of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans*. The strains were cultured in accordance with MU 4.2.3065-13 and 4.2.3852-23 «Laboratory Diagnostics of Diphtheria Infection».

Results and discussion. Studies were carried out to develop a modernized recipe for preparing the Andrede indicator for determining starch fermentation in the identification of biovar of the causative agent of diphtheria infection. The results of comparative studies with the Andrede indicator prepared according to the previously proposed recipe and an upgraded version using a chemical reagent - starch from four manufacturers are presented. The shelf life of the finished Gissa medium with the Andrede indicator in the laboratory was determined.

Conclusion. The modernized recipe for the Andrede indicator and the preparation of Gissa medium with starch will increase the efficiency and eliminate errors in the identification of biovar in *C. diphtheriae*.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; bacteriological diagnostics; saccharolytic activity; starch; Gissa medium; Andrede indicator

For citation: Borisova O.Yu., Chagina I.A., Gadua N.T., Pimenova A.S., Andrievskaya I.Yu., Mironov A.Yu., Polosenko O.V., Podoprigora I.V., Sidorova N.A. Improvement of Gissa medium with starch and Andrede indicator for bacteriological examination for diphtheria infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 190-195 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-190-195>

EDN: ROKQGH

For correspondence: Borisova Olga Yurievna, Dr. Sci. Med., Professor, Head of laboratory for the diagnosis of diphtheria and pertussis infections G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology; e-mail: olgborisova@mail.ru

Information about authors:

Borisova O.Yu.,	https://orcid.org/0000-0001-6316-5046 ;
Chagina I.A.,	https://orcid.org/0000-0003-2867-9548 ;
Gadua N.T.,	https://orcid.org/0000-0001-6247-6176 ;
Pimenova A.S.,	https://orcid.org/0000-0002-6914-3531 ;
Andrievskaya I.Yu.,	https://orcid.org/0000-0003-2997-942X ;
Mironov A.Yu.,	https://orcid.org/0000-0002-8544-5230 ;
Polosenko O.V.,	https://orcid.org/0000-0001-5961-9041 ;
Podoprigora I.V.,	https://orcid.org/0000-0003-4099-2967 ;
Sidorova N.A.,	https://orcid.org/0009-0000-9868-7805 .

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

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the sectoral program of Rospotrebnadzor.

Received 25.11.2024

Accepted 30.01.2025

Published 25.02.2025

Введение. Дифтерия продолжает оставаться актуальным заболеванием даже в странах с многолетней массовой вакцинопрофилактикой. В Чехии в 2024 году зарегистрировано 6 случаев дифтерии, в Великобритании - 86 случаев дифтерии. Наибольшее опасение вызывает ситуация в Африканском регионе, где с начала 2023 года продолжается рост случаев заболеваний и смерти от дифтерии. Всего в Нигерии, Гвинеи, Мавритании и Южной Африке зарегистрировано более 27 991 случая заболевания дифтерией и более 828 случаев смерти. В Российской Федерации случаев заболевания дифтерией и бактерионосительства в 2023 году не за-

регистрировано (<https://www.rosotrebnadzor.ru/>) [1]. Сохраняется риск завозных случаев дифтерии на территорию нашей страны. С целью сохранения благополучной ситуации по дифтерии и недопущения распространения инфекции необходимо поддерживать качественный уровень бактериологической диагностики с проведением всех регламентированных нормативными документами тестов, включая определение токсигенности и биовара возбудителя.

История открытия индикаторов связана с экспериментами, которые проводил с различными растениями Р. Бойль (1627-1691 гг.) еще в XVII веке. Индикаторы,

меняющие свой цвет при изменении рН среды, используют не только для определения реакции среды. Их вводят в состав специальных дифференциально-диагностических питательных сред, служащих для выявления биохимических свойств микроорганизмов. Изменение цвета дифференциально-диагностической питательной среды указывает на образование кислоты или щелочи при ферментативной деятельности микроорганизмов. Известны индикаторы, приобретающие ту или иную окраску лишь при щелочной или кислой реакции среды; вне этой реакции они бесцветны. Более удобны двухцветные индикаторы, имеющие разную окраску в кислой и щелочной средах. Лакмусовая настойка, например, при кислой реакции приобретает розовую окраску, при щелочной – синюю. Часто применяют розовую кислоту, в кислой среде – до рН 6,2-6,5 - имеющую жёлтую окраску, а начиная от рН 6,5 приобретающую бледно-розовый цвет, переходящий в интенсивно розовый при щелочной реакции (начиная от рН 7,2) [2]. В настоящее время известно большое количество индикаторов.

При лабораторной диагностике дифтерийной инфекции при проведении бактериологических исследований используется реактив Андресе. Индикатор Андресе является фуксинсодержащим реактивом, который добавляется в дифференциально-диагностические питательные среды с углеводами для определения сахаролитической активности бактерий - разложения глюкозы, сахарозы и крахмала; при сдвиге рН в кислую сторону, питательная среда приобретает красный цвет. Способность разлагать крахмал является дифференциально-диагностическим признаком определения биоваров *Corynebacterium diphtheriae* - *gravis*, *mitis*, *intermedius* и *belfanti* [16].

Рецепт приготовления индикатора Андресе, предложенный в 1950 и 1967 году [2, 3], заключается в следующем: 1 г кислого фуксина растворяют в 400 мл дистиллированной воды, для обесцвечивания добавляют 64,0 мл нормального раствора едкого натра (NaOH). После приготовления сутки выдерживают в термостате, двое суток – на свету. Индикатор предлагалось хранить в тёмной бутыли – *in vitro nego*.

В бактериологической диагностике дифтерийной инфекции с 1967 г. до 2023 г. в нормативных документах предлагался следующий рецепт индикатора Андресе [4 - 6]: в 100 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 г кислого фуксина и 16,4 мл 4% раствора NaOH; раствор на сутки оставляют при 37 °C, периодически встряхивая, двое суток выдерживают на свету и затем убирают в тёмное место. В нормативных документах по лабораторной диагностике дифтерии 1998 г. и 2013 г. к ранее предложенному рецепту сделано дополнение, что при интенсивно-розовой окраске раствора в процессе приготовления индикатора Андресе, необходимо добавить 1,6 мл 4% раствора NaOH [7, 8].

В ранее проведённых в Референс-центре по мониторингу за коклюшем и дифтерией Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского исследованиях по оценке эффективности бактериологической диагностики дифтерии на территории Российской Федерации установлено, что лаборатории допускают ошибки при определении биовара возбудителя дифтерии, связанные с неправильным приготовле-

нием реактива и подготовкой лабораторной посуды, что приводит к недостаточно выраженной цветной реакции и неправильной биохимической идентификации биовара [9, 10]. При проведении внешнего контроля качества бактериологической диагностики дифтерии в рамках работы Референс-центра по мониторингу за коклюшем и дифтерией ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора лаборатории субъектов РФ в 2020-2023 годах осуществляли правильную идентификацию контрольных образцов в 45,8%-82,4% случаев. Среди ошибок, допускаемых лабораториями, наряду с неправильным определением токсигенности у возбудителя дифтерии, допускаются ошибки при идентификации биовара [11 - 15].

Цель: модификация рецепта приготовления индикатора Андресе и дифференциально-диагностической среды Гисса с крахмалом для определения биовара *C. diphtheriae*.

Материал и методы. В исследовании использованы контрольные токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765, токсигенные штаммы *C. ulcerans* №№ 675 и 7819, *C. pseudodiphtheriticum* «Соколов», штамм *Staphylococcus aureus* 25923 (из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»), дикие штаммы - токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* №№ 1-18, 30-15, токсигенные штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis* №№ 89-18, 57-18, 55-18, токсигенные штаммы *C. ulcerans* №№ 258-03, 85-18 (из рабочей коллекции лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора). Культивирование штаммов проводили согласно МУ 4.2.3065-13 и 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Исследуемый материал засевали на кровяно-теллуритовую среду (КТА) на основе 2% агара (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (НПО «Лейтран», Москва) и теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и Коринебакагар (КБА) согласно инструкции производителя (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Культуры термостатировали в течение 24-48 часов при температуре 37 °C. Далее культуры культивировали на сывороточном агаре на основе 2% агара (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением с 20% сыворотки крупного рогатого скота (НПО «Лейтран», Москва). Приготовление дифференциально-диагностических сред Гисса проводили согласно МУ 4.2.3065-13. Для исследований использовали химический реактив крахмал четырёх отечественных производителей – крахмал растворимый (Химприбор-СПб, Россия), крахмал-индикатор (Лаверна, Россия), крахмал растворимый (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Россия), крахмал-индикатор (ДиаЭм, Россия).

Результаты и обсуждение. С целью повышения эффективности постановки теста на ферментацию крахмала с индикатором Андресе при определении сахаролитической активности возбудителя дифтерии разработан модернизированный рецепт этого индикатора: фуксин кислый - 0,5 г, натрий гидроокись (1N NaOH) - 20,0 мл, дистиллированная вода - 100 мл. Приготовление индикатора: кислый фуксин растворяют в дистиллированной воде и добавляют раствор 1N NaOH (4

г NaOH, 100 мл дистиллированной воды), перемешивают и выдерживают на свету при комнатной температуре 48 ч, периодически встряхивая, затем убирают в тёмное место в тёмной посуде. Приготовление дифференциально-диагностической среды Гисса с крахмалом проводят следующим образом: к 100 мл дистиллированной воды добавляют 1 г пептона, 0,5 г крахмала, 0,5 г NaCl, 1 мл индикатора Андреде и 1 каплю 20% раствора NaOH; доводят приготовленный раствор до кипения, дают остить и добавляют 0,5 г растворимого крахмала. Далее разливают по 2-3 мл в химически чистые сухие пробирки и стерилизуют автоклавированием при температуре плюс (112±1) °C в течение 20 мин, или текучим паром в течение 3 дней по 30 мин, или при 0,5 атм. 30 минут. В готовом виде дифференциально-диагностическая среда Гисса с крахмалом с индикатором Андреде - бесцветная или имеет соломенный оттенок.

Для сравнительной оценки проведены серии экспериментов по постановке пробы на ферментацию крах-

мала с индикатором Андреде согласно [8] и по модернизированному рецепту. Каждый штамм тестирулся пять раз (с интервалом 14 дней) в трёх повторах на каждой среде Гисса (крахмал) с четырьмя различными химическими реактивами – крахмал и двумя видами индикаторов (согласно [8] и модернизированный рецепт) с двух питательных сред первичного посева (КТА и КБА), всего по 3120 постановок в каждом учреждении.

В экспериментах использован химический реагент крахмал четырёх производителей: 1) крахмал растворимый (Химприбор-СПб, Россия); 2) крахмал-индикатор (Лаверна, Россия); 3) крахмал растворимый (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Россия); 4) крахмал-индикатор (ДиаЕм, Россия). Проведённые эксперименты показали, что при использовании модернизированного рецепта индикатора Андреде получается более выраженная положительная цветовая реакция при сохранении стойкого отрицательного результата в незасеянной пробирке (рис. 1, 2).

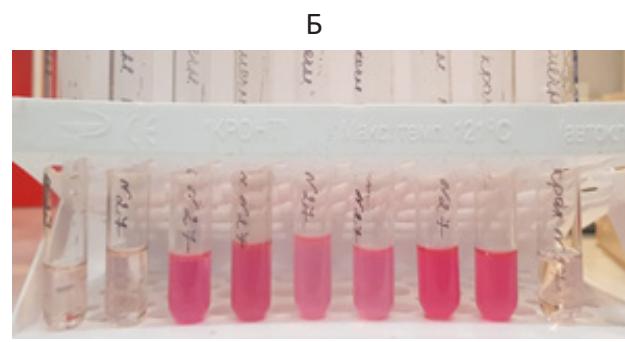
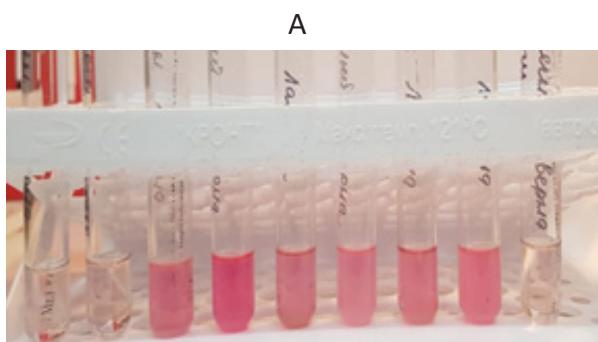


Рис. 1. Определение ферментации крахмала с использованием химического реагента крахмал растворимый (Химприбор-СПб, Россия) (А), крахмал-индикатор (Лаверна, Россия) (Б) и индикатора Андреде согласно [8]. Здесь и на рис. 2: слева направо - токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765 (2 пробирки), *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (3 пробирки), токсигенный штамм *C. ulcerans* № 675 (3 пробирки), отрицательный контроль (незасеянная пробирка).

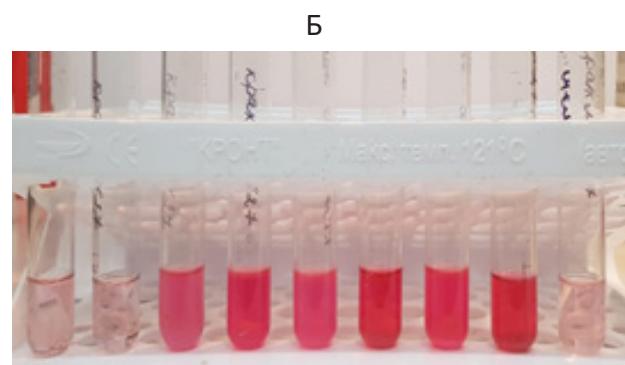
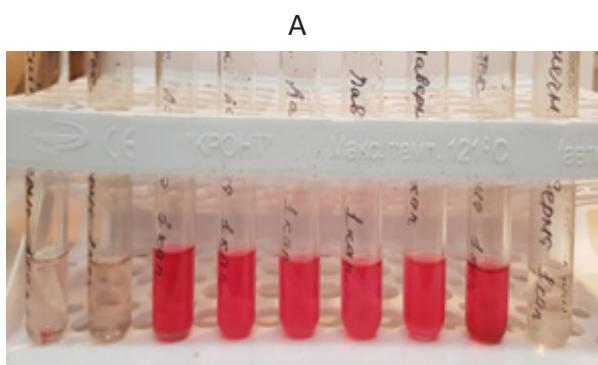


Рис. 2. Определение ферментации крахмала с использованием химического реагента крахмал растворимый (Химприбор-СПб, Россия) (А), крахмал-индикатор (Лаверна, Россия) (Б) и модернизированного рецепта индикатора Андреде.

Результаты идентификации биовара у *C. diphtheriae* при использовании всех химических реактивов – крахмал четырёх отечественных производителей сопоставимы. Использование для культивирования штаммов коринебактерий двух разных питательных сред первичного посева - КТА и КБА не влияло на результаты идентификации биовара.

Оценена возможность начала формирования положительного результата при определении сахароли-

тической активности (ферментация глюкозы, сахара-зы и крахмала) у *C. diphtheriae* биовара *gravis* и *C. diphtheriae* биовара *mitis*. Оказалось, что положительный результат реакции ферментации глюкозы у штаммов *C. diphtheriae* биовара *gravis* и *C. diphtheriae* биовара *mitis* и положительный результат ферментации крахмала у штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* стал формироваться через два часа от момента постановки реакции (рис. 3, А, Б).



Рис. 3. Определение ферментации глюкозы, сахарозы и крахмала с использованием химического реактива крахмал-индикатор (Лаверна, Россия) и модернизированного рецепта индикатора Андреде у *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (А) и *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765 (Б). Слева направо – глюкоза, сахароза и крахмал.

Проведены исследования по оценке сроков хранения дифференциально-диагностической среды Гисса с модернизированным индикатором Андреде. В эксперименте оценена интенсивность цветовой реакции при положительном результате и отсутствие цветовой реакции при отрицательном результате в течение 7 и 14 дней. Каждый штамм тестировался три раза (с интервалом 14 дней) в трёх повторах на каждой дифферен-

циально-диагностической среде Гисса (крахмал) с четырьмя различными химическими реактивами – крахмал с двух сред первичного посева (КТА и КБА), всего по 936 постановок в двух учреждениях. В результате эксперимента установлено, что готовую дифференциально-диагностическую среду можно хранить при температуре плюс (2-8) °С в защищённом от света месте в течение 14 дней (рис. 4, А, Б).



Рис. 4. Определение ферментации крахмала с использованием химического реактива крахмал-индикатор (Лаверна, Россия) и модернизированного рецепта индикатора Андреде через 7 (А) и 14 (Б) дней от момента приготовления среды Гисса.
Слева направо - *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765 (3 пробирки), токсигенный штамм *C. ulcerans* № 675, отрицательный контроль (незасеянная пробирка).

Для поддержания эффективности теста на ферментацию крахмала необходимо проводить внутрилабораторный контроль качества, осуществляемый с каждой новой серией реактива (крахмала), а также периодический – при каждой постановке с использованием необходимого набора контрольных штаммов. В нормативном методическом документе определён перечень контрольных штаммов для оценки наличия ферментации крахмала – у контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665 (положительный контроль); отсутствие ферментации крахмала у контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *mitis* № 6765 (отрицательный контроль); наличие ферментации сахарозы у контрольного штамма *S. aureus* ATCC 25923 (положительный контроль); отсутствие признака в среде без посева культуры (отрицательный контроль).

Заключение. Модернизированный рецепт индикатора Андреде и приготовления дифференциальнно-

диагностической среды Гисса с крахмалом позволит повысить эффективность и исключить ошибки при идентификации биовара у *C. diphtheriae*. Данный модернизированный рецепт индикатора и приготовления дифференциально-диагностической среды представлены в методических указаниях 4.2.3852-23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

ЛИТЕРАТУРА

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2024.
2. Лебедева М.Н. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Медгиз; 1950.
3. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.О. Биргер ред. М.: Медицина; 1967.
4. Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию

- от 02.09.1967 г. № 690-67. Минздрав СССР; 1967.
5. Инструкция по бактериологическому исследованию на дифтерию (Приложение 4 к Приказу Минздрава СССР № 580 от 26.06.1974 г.). М.: Минздрав СССР; 1974.
 6. Инструкция по бактериологической и серологической индикации возбудителя дифтерии и его токсина (Приложение 5 к Приказу Минздрава СССР № 450 от 02.04.1986 г.). М.: Минздрав СССР; 1986.
 7. Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 09.01.1998 г. МУК 4.2.698-98. Минздрав России. М.: «Интерсэн»; 1998. ISBN 5-89834-02-3.
 8. Методические указания «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» от 14.07.2013 г. МУК 4.2.3065-13. Роспотребнадзор; 2013. ISBN 978-5-7508-1195-3.
 9. Борисова О.Ю., Гадуя Н.Т., Пименова А.С., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Миронов А.Ю. и др. Состояние и проблемы бактериологической диагностики дифтерийной инфекции в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11):717-23. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-717-723.
 10. Борисова О.Ю., Гадуя Н.Т., Пименова А.С., Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Миронов А.Ю. и др. Внешний контроль качества проведения бактериологического исследования при выделении *Corynebacterium diphtheriae*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(8): 509-12. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-8-509-512.
 11. О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и серологической диагностике дифтерии в Российской Федерации в 2020 году. Информационное письмо № 02/23440-2020-27 от 16.11.2020 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).
 12. О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и серологической диагностике дифтерии в Российской Федерации в 2021 году. Информационное письмо № 02/20615-2021-27 от 12.10.2021 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).
 13. О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и серологической диагностике дифтерии в Российской Федерации в 2022 году. Информационное письмо № 02/20896-2022-27 ДСП от 21.10.2022 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).
 14. О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по бактериологической диагностике дифтерии и коклюша и серологической диагностике дифтерии в Российской Федерации в 2023 году. Информационное письмо № 02/17141-2030-27 от 09.10.2023 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).
 15. Борисова О.Ю., Пименова А.С., Гадуя Н.Т., Чагина И.А., Донских Е.Е., Кафарская Л.И. Ошибки, допущенные лабораториями при выполнении внешнего контроля качества по лабораторной диагностике дифтерии. *Проблемы медицинской микологии*. 2023; 25(2): 92.
 16. Харссеева Г.Г., Тюкавкина С.Ю., Миронов А.Ю. Дифтерия: характеристика возбудителя и лабораторная диагностика (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 699-706. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706.

REFERENCES

1. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the

- population in the Russian Federation in 2023: State report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; 2024. (in Russian)
2. Lebedeva M.N. Microbiology Practice Guide [Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam]. Moscow: Medgiz; 1950. (in Russian)
 3. Handbook of Microbiological and Virological Research Methods [Spravochnik po mikrobiologicheskim I virusologicheskim metodam issledovaniya]. M.O. Birger, ed. Moscow: Meditsina; 1967. (in Russian)
 4. Instructions for Bacteriological Examination for Diphtheria № 690-67 dated 02.09.1967. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya SSSR; 1967. (in Russian)
 5. Instructions for bacteriological examination for diphtheria (Appendix 4 to Order of the USSR Ministry of Health № 580 of 26.06.1974). Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya SSSR; 1974. (in Russian)
 6. Instructions for bacteriological and serological indication of the diphtheria pathogen and its toxin (Appendix 5 to Order of the USSR Ministry of Health № 450 of 02.04.1986). Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya SSSR; 1986. (in Russian)
 7. Methodological Guidelines «Laboratory Diagnostics of Diphtheria Infection» dated 09.01.1998, MUK 4.2.698-98. Minzdrav RF. Moscow: Intersen; 1998. ISBN 5-89834-02-3. (in Russian)
 8. Methodological Guidelines «Laboratory Diagnostics of Diphtheria Infection» dated 14.07.2013, MUK 4.2.3065-13. Rospotrebnadzor; 2013. ISBN 978-5-7508-1195-3. (in Russian)
 9. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Afanasyev S.S., Afanasyev M.S., Mironov A.Yu. et al. Condition and problems of bacteriological diagnosis of diphtheria infection in the Russian Federation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(11): 717-23. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-717-723. (in Russian)
 10. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Shepelin A.P., Domotenko L.V., Mironov A.Yu. et al. External quality control of bacteriological study during isolation of *Corynebacterium diphtheriae*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(8): 509-12. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-8-509-512. (in Russian)
 11. On the results of external quality control of studies on bacteriological diagnostics of diphtheria and pertussis and serological diagnostics of diphtheria in the Russian Federation in 2020. Information letter № 02/23440-2020-27 dated 16.11.2020. Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor). (in Russian)
 12. On the results of external quality control of studies on bacteriological diagnostics of diphtheria and pertussis and serological diagnostics of diphtheria in the Russian Federation in 2021. Information letter № 02/20615-2021-27 dated 12.10.2021. Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor). (in Russian)
 13. On the results of external quality control of studies on bacteriological diagnostics of diphtheria and pertussis and serological diagnostics of diphtheria in the Russian Federation in 2022. Information letter № 02/20896-2022-27 Chipboard dated 21.10.2022. Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor). (in Russian)
 14. On the results of external quality control of studies on bacteriological diagnostics of diphtheria and pertussis and serological diagnostics of diphtheria in the Russian Federation in 2023. Information letter № 02/17141-2030-27 dated 09.10.2023. Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor). (in Russian)
 15. Borisova O.Yu., Pimenova A.S., Gadua N.T., Chagina I.A., Donskikh E.E., Kafarskaya L.I. Errors made by laboratories when performing external quality control on laboratory diagnostics of diphtheria. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2023; 25(2): 92. (in Russian)
 16. Kharseeva G.G., Tyukavkina S.Yu., Mironov A.Yu. Diphtheria: characteristics of the causative agent and laboratory diagnostics (lecture). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(11): 699-706. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-11-699-706. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Домотенко Л.В.¹, Косилова И.С.¹, Миронов А.Ю.^{2,3}, Подкопаев Я.В.¹,
Мицевич И.П.¹, Храмов М.В.¹



<https://elibrary.ru/oqwgth>

АЛГОРИТМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОТУЛИЗМА

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

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

³Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, Москва, Россия

Один из этапов расследования вспышки ботулизма летом 2024 года заключался в выделении возбудителя инфекции с использованием питательных сред. В Российской Федерации отсутствует промышленный выпуск специальных сред данного назначения.

Цель - оценка возможности использования коммерческих отечественных питательных сред, предназначенных для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостридий, при выделении *Clostridium botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов.

Материал и методы. Исследовано 440 образцов биологического материала человека, пищевой продукции, упаковочного материала с использованием отечественных питательных сред Китта-Тароцци, тиогликоловой среды, сульфитного агара с добавлением желточной эмульсии и D-циклосерина, импортных питательных сред специального назначения в качестве контрольных.

Результаты. Выделение возбудителя проведено из необработанных и обработанных образцов для уничтожения вегетативных бактерий и извлечения спор бактерий, высеивая одновременно на все питательные среды неселективные среды обогащения и селективные плотные среды. Показано, что отечественная среда Китта-Тароцци по своей специфической активности не уступает импортному бульону с печенью. На сульфитном агаре с добавлением желточной эмульсии и циклосерина и на *Clostridium botulinum Isolation Agar Base* с желточной эмульсией и специальной селективной добавкой для *C. botulinum* выделены штаммы возбудителя ботулизма из одних и тех же образцов. Всего в 25 из 440 поступивших образцов обнаружены и выделены штаммы *C. botulinum*, подтвержденные микроскопией мазков, окрашенных по Граму и фазово-контрастной микроскопией, с наличием продукции ботулотоксинов типа A и B биологическим и молекулярно-генетическим методами.

Заключение. Показана возможность использования отечественных питательных сред при выделении возбудителя ботулизма из клинического материала и пищевых продуктов и необходимость промышленного выпуска отечественной специальной питательной среды для выделения *C. botulinum*.

Ключевые слова: ботулизм; *C. botulinum*; питательные среды; сульфитный агар; среда Китта-Тароцци; селективная добавка; желточная эмульсия; циклосерин

Для цитирования: Домотенко Л.В., Косилова И.С., Миронов А.Ю., Подкопаев Я.В., Мицевич И.П., Храмов М.В. Алгоритм использования отечественных питательных сред для выделения возбудителя ботулизма. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (3): 196-203.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-196-203>

EDN: OQWGTH

Для корреспонденции: Косилова Ирина Сергеевна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. разработки питательных сред; e-mail: kosilova.irina@gmail.com

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 09.10.2024

Принята к печати 26.12.2024

Опубликовано 25.02.2025

Domotenko L.V.¹, Kosilova I.S.¹, Mironov A.Yu.^{2,3}, Podkopaev Ya.V.¹, Mitzevich I.P.¹, Kramov M.V.¹

THE ALGORITHM OF USING RUSSIA-MADE NUTRIENT MEDIA TO ISOLATE THE CAUSATIVE AGENT OF BOTULISM

¹Federal Budgetary Institution of Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, 142279, Obolensk sel., Serpukhov distr., Moscow region, Russia;

²Federal Budgetary Institution of Science G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, Rosпотребнадзор, 125212, Moscow, Russia;

³Federal research and clinical center of specialized medical care and medical technologies FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

One of the stages of the investigation of the botulism outbreak this summer was to isolate the infectious agent using nutrient media. There is currently no industrial production of special media for this purpose in the Russian Federation.

Objective. To evaluate the possibility of using commercial national nutrient media for anaerobic microorganisms and sulfite-reducing clostridia when isolating *C. botulinum* from clinical samples and food products.

Material and methods. The work examined 440 samples of human biological material, food products and packaging material using domestic Kitt-Tarozzi media, thioglycollate medium and sulfite agar with the addition of yolk emulsion and D-cycloserine, as well as imported special-purpose media as controls.

Results. The pathogen was isolated from untreated and treated samples to destroy vegetative bacteria and extract bacterial spores, seeding simultaneously on all media: non-selective enrichment media and selective agar media. It was shown that the domestic Kitt-Tarozzi medium is not inferior in its specific activity to foreign liver broth, and strains of the causative agent of botulism were isolated from the same samples on sulfite agar (with the addition of yolk emulsion and cycloserine) and on *Clostridium botulinum* Isolation Agar Base with yolk emulsion and a special selective supplement for botulism clostridia. In total, *C. botulinum* strains were detected and isolated in 25 of the 440 samples received, confirmed by Gram staining of smears and phase-contrast microscopy, as well as the presence of production of botulinum toxins of types A and B by biological and molecular genetic methods.

Conclusion. The possibility of using Russia-made media for isolating the causative agent of botulism from clinical material and food products and the need for industrial production of a special nutrient medium for isolating *C. botulinum* are shown.

Key words: botulism; *C. botulinum*; nutrient media; sulfite agar; Kitt-Tarozzi; selective additive; yolk emulsion; cycloserine

For citation: Domotenko L.V., Kosilova I.S., Mironov A.Yu., Podkopaev Ya.V., Mitzevich I.P., Khramov M.V. Algorithm for using domestic nutrient media to isolate the causative agent of botulism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 196-203 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-196-203>

EDN: OQWGTH

For correspondence: Kosilova Irina Sergeevna, PhD (Biol.), Researcher Nutrient Medium Development Laboratory; e-mail: kosi-lova.irina@gmail.com

Information about authors:

Domotenko L.V., <https://orcid.org/0000-0002-4785-6418>;

Kosilova I.S., <https://orcid.org/0000-0003-4020-0894>;

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

Podkopaev Y.V., <https://orcid.org/0000-0002-3420-3661>;

Mitzevich I.P., <https://orcid.org/0000-0003-2324-502X>;

Khramov M.V., <https://orcid.org/0000-0002-4553-3826>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 09.10.2024

Accepted 26.12.2024

Published 25.02.2025

Ботулизм – острое токсико-инфекционное заболевание, возникающее в результате употребления в пищу продуктов, контаминированных спорами *Clostridium botulinum* и, в редких случаях, штаммами близкородственных видов (*C. barattii* и *C. butyricum*) [1, 14]. Споры этих микроорганизмов распространены повсеместно в окружающей среде, способны неограниченно долго выживать в большинстве естественных условий, при кипячении и других обычных способах приготовления пищи [14].

Возбудитель ботулизма *C. botulinum* – грамположительные палочковидные анаэробные спорообразующие подвижные бактерии рода *Clostridium*. Таксономическим признаком этих бактерий является их способность синтезировать ботулинический нейротоксин (ботулотоксин), вызывающий у человека и животных ботулизм [2, 3, 14]. *C. botulinum* продуцирует восемь типов ботулотоксинов: A, B, C, D, E, F, G, H [14]. В зависимости от типов и субтипов ботулотоксинов, культуральных, ферментативных и генетических свойств, особенностей экологии *C. botulinum* подразделяются на шесть фенотипических групп, существенно отличающихся друг от друга. Клостридии группы I, II, IV, V и VI вызывают ботулизм у человека, группы III – у животных [4].

Поскольку ботулизм является смертельно опасным для человека заболеванием, ранний и точный диагноз имеет решающее значение при назначении больному схемы лечения [5, 6]. Сложность диагностики бо-

тулизма на ранней стадии болезни связана с тем, что заболевание встречается относительно редко, поэтому врачи его часто не распознают или диагностируют неправильно, принимая за другие болезни с нервно-паралитическими симптомами или с симптомами пищевой токсионинфекции [7, 16].

Клиническая лабораторная диагностика ботулизма, проводимая для подтверждения клинически предполагаемых случаев, включает индикацию и идентификацию ботулотоксина при исследовании крови, фекалий, рвотных масс, промывных вод желудка или раневого отделяемого (при раневом ботулизме), выделение из них чистой культуры возбудителя [14]. Лабораторные исследования также выполняют при эпидемиологических расследованиях для выявления продукта питания – предполагаемого источника ботулотоксина [8, 14].

Детекцию и идентификацию ботулотоксина проводят в реакции нейтрализации ботулотоксинов антитоксическими сыворотками с биопробой на мышах, считающейся «золотым стандартом», и с помощью современных иммунохимических и молекулярно-генетических методов [9, 14].

Детекция ботулотоксина биологическим методом требует наличия лабораторных белых мышей и опытных специалистов, поэтому биопробу проводят только в специализированных микробиологических лабораториях. Более доступны диагностические тесты, способные быстро и точно идентифицировать ботулотоксин

в клиническом материале и продуктах питания: иммуноферментный анализ, иммуно-ПЦР, хемилюминесцентный иммунный блот, иммунохроматография, эндоопептидазный тест, масс-спектрометрический метод (Endopep-MS), ПЦР-тест-системы как в классическом режиме, так и в режиме реального времени [4, 14]. Преимущественно, все эти тесты импортного производства. На сайте Росздравнадзора удалось найти только одно отечественное зарегистрированное медицинское изделие – набор реагентов для определения ботулинического нейротоксина типа А методом иммуно-ПЦР (Тест-система «IPCR-BoNT/A») (регистрационное удостоверение РЗН 2014/1424) [10].

Для селективного выделения возбудителя ботулизма в России отсутствуют специальные отечественные питательные среды [15, 18]. Такая ситуация объясняется, во-первых, редкостью появления ботулизма и, во-вторых, отсутствием современных стандартов по клинической лабораторной диагностике болезни и алгоритмов проведения эпидемиологического расследования, в которых имелись бы рекомендации по схеме исследований и выбору диагностических тест-систем и питательных сред. В утверждённых в 2021 году клинических рекомендациях «Ботулизм у детей» в разделе по специфической лабораторной диагностике ботулизма указано, что за данной информацией следует обращаться к научным публикациям¹, а действующий ГОСТ 10444.7-86², регламентирующий методы выявления ботулинических токсинов и *C. botulinum*, уже давно устарел и ориентируется только на питательные среды лабораторного изготовления. В руководстве по диагностике и лечению ботулизма Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC) также не приводятся рекомендации по выбору питательных сред [7, 8].

Перечень питательных сред, выпускаемых зарубежными фирмами-производителями питательных сред, включает *Clostridium botulinum* isolation agar (CBI агар), содержащий желточную эмульсию для дифференциации на основе липазной активности ботулинических токсинов типов А, В, F и специальную селективную добавку; Reinforced clostridial agar (улучшенный клостродиальный агар) для культивирования и учёта клостродий, других анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в пищевых продуктах и других объектах в комплекте со специальной селективной добавкой; Агар для клостродий M497, используемый для селективного выделения *Clostridium* spp. из смешанных культур в клиническом или другом материале, бульона с говяжьей печенью (Chopped Liver Broth), сульфит полимиксин сульфадиазин агар (SPS agar - sulfite polymyxin sulfadiazine agar), триптозо-декстрозный агар с циклосерином (Tryptose Cycloserine Dextrose Agar) и др. [7, 9, 15].

В ходе проведения эпидемиологического расследования массовых случаев ботулизма в России в июне 2024 года, вызванных употреблением пищевой продукции, приготовленной с нарушением правил и технологий, в испытательный лабораторный центр ФБУН ГНЦ ПМБ поступило большое количество образцов пищевой продукции и биологического материала. Все посту-

пившие образцы отправлены на бактериологическое исследование с целью обнаружения в них *C. botulinum* и изучения фенотипических и молекулярно-генетических свойств клинических изолятов для оценки эпидемиологической ситуации, прогноза её развития на будущие периоды, для разработки профилактических противоэпидемических мероприятий.

В исследовании использованы коммерческие питательные среды для выделения *C. botulinum* зарубежных производителей и отечественные питательные среды для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостродий.

Цель исследования: оценка возможности использования коммерческих отечественных питательных сред, предназначенных для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостродий, при выделении *C. botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов.

Материал и методы. Исследованы 440 образцов, подозрительных на наличие *C. botulinum*, из которых 275 образцов биологического материала человека (фекалии, промывные воды желудка, рвотные массы, кровь, аутопсийный материал), 163 образца пищевой продукции (салат в закрытой упаковке, остатки салата, отобранных в домашних очагах пострадавших, фасоль и др.), 2 образца упаковочного материала.

В работе использованы референс-штаммы *C. botulinum* ATCC 19397 (продуцирующий ботулотоксин типа А) и *C. botulinum* NCTC 7273 (продуцирующий ботулотоксин типа В), полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ-Оболенск) в лиофилизированном виде.

Отбор и подготовка образцов пищевых продуктов и упаковочного материала проведены в соответствии с требованиями ГОСТ 10444.7-86², подготовка биологического материала - в соответствии с зарубежными рекомендациями [8, 9].

В работе использованы питательные среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ: питательная среда для культивирования облигатно-анаэробных микроорганизмов - среда Китта-Тароцци (кат. № О230, годна до 05.2026); питательная среда для контроля стерильности сухая ((Тиогликоловая среда (ТГС), кат. № 0-56-К-309, годна до 07.2026)); питательная среда для выявления клостродий по сульфитредуцирующему признаку сухая «Сульфитный агар» модификации 3 (кат. № 0-79-К-17, годна до 03.2026); сульфитный агар модификации 3 (кат. № 0-79-К-17, годен до 03.2026) с добавлением 50,0 мл/л желточной эмульсии лабораторного приготовления по ГОСТ Р 52815-2007³ и 0,4 г/л D-циклосерина (NeoFroxx, кат. № 2377GR005, годен до 05.2027).

В качестве питательных сред сравнения (контрольных питательных сред) использован бульон с печенью для выделения и культивирования анаэробных микроорганизмов *Clostridium botulinum* из продуктов (HiMedia, кат. № M 606, годен до 08.2025); *Clostridium botulinum* Isolation Agar Base (CBI-agar, HiMedia, кат. № M 911, годен до 04.2027) с добавлением эмульсии яичного желтка (HiMedia, кат. FD045, годен до 11.2024) и селективной добавки для клостродий ботулизма (HiMedia, кат. № FD049, годен до 10.2024); RCA-agar (Merck, кат. № 105410, годен до 08.2025) с 7% дефибринированной

¹ Клинические рекомендации «Ботулизм у детей - 2021-2022-2023 (09.11.2021). Утверждены Министерством здравоохранения РФ».

² ГОСТ 10444.7-86 «Продукты пищевые: методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*». М.: Стандартинформ; 2010.

³ ГОСТ Р 52815-2007 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*». М.: Стандартинформ; 2010.

бараньей крови (ООО ГЕМ, кат. № 620100) и селективной добавкой для клоstrидий ботулизма (HiMedia, кат. № FD049, годен до 10.2024). Все посевы инкубировали в анаэробисте АЭ-01 (ТУ 9443-005-04699534-2010) с газогенерирующими анаэробными пакетами с индикатором GasPak (BD, кат № 260001).

Результаты обработаны статистически при помощи пакета программ MS-Excel. Достоверность различных средних величин оценена с использованием t-критерия Стьюдента. В сравнительном анализе использован двусторонний критерий Фишера. Уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты. Культивирование референс-штаммов *C. botulinum*. Перед началом исследования изучено поведение референс-штаммов *C. botulinum* ATCC 19397 тип А и *C. botulinum* NCTC 7273 тип В на сульфитном агаре, предназначенном для выявления клоstrидий по сульфитредуцирующему признаку, ранее не используемому для работы с *C. botulinum*. Референс-штаммы восстановлены из лиофилизированного состояния инкубацией на среде Китта-Тароцци при температуре (36±1) °C в течение 24 часов. Оба референс-штамма демонстрировали типичный рост для анаэробов на данной питательной среде в виде диффузного помутнения

с прозоной в верхней части столбика среды.

Восстановленные штаммы пересевали на сульфитный агар модификации 3 глубинным способом и на сульфитный агар той же модификации с желточной эмульсией и циклосерином поверхностным способом. Посевы инкубировали при температуре (36±1) °C. Через 24 часа инкубации на сульфитном агаре при глубинном посеве в пробирках отмечен рост референс-штаммов в виде диффузного покрывающего столбика питательной среды с прозоной в верхней части. Покрывающее происходит за счёт восстановления *C. botulinum* сульфит-иона, входящего в состав питательной среды, до сульфид-иона, вступающего в реакцию с ионами железа, образуя чёрный осадок.

На сульфитном агаре с желточной эмульсией и циклосерином наблюдали рост выпуклых шероховатых, немного расплывчатых колоний с неровными краями, окруженных узкой, около 1-2 мм «жемчужной» зоной, повторяющей контур колоний (рис. 1). Проявление на данных питательных средах радиальной окраски («жемчужной» зоны) вокруг колоний, является характерным признаком для *C. botulinum*, обладающих липазной активностью.

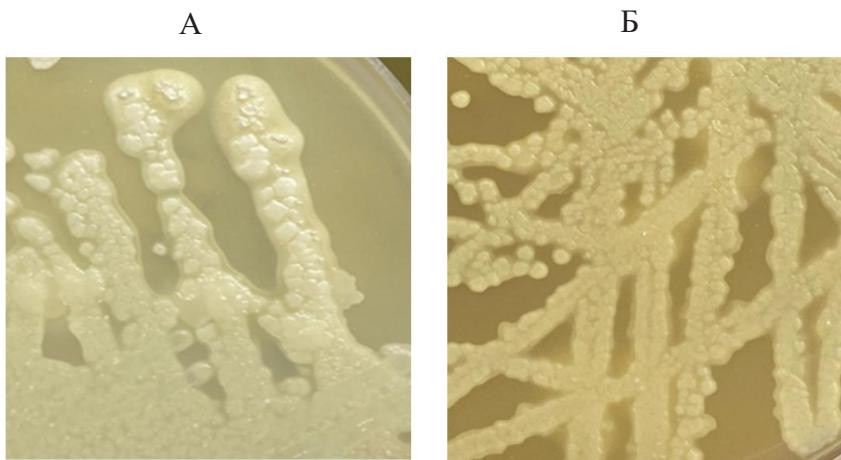


Рис. 1. Рост референс-штаммов на сульфитном агаре с желточной эмульсией и циклосерином: А – *C. botulinum* ATCC 19397; Б – *C. botulinum* NCTC 7273.

В некоторых публикациях проявление липазной активности в виде «жемчужной» или «перламутровой» зоны вокруг колоний *C. botulinum* на поверхности питательной среды ошибочно описывают как зоны лецитиназной активности. При наличии фермента лецитиназы у бактерий наблюдается образование непрозрачного ореола вокруг колоний, а для большинства типов *C. botulinum* характерно образование липазы, и лишь некоторые штаммы образуют лецитиназу [9-12, 14].

Выделение *C. botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов. Поступившие в лабораторию образцы распределены в зависимости от физического состояния по категориям: 1) твёрдые образцы (автопсийный материал, салаты, остатки салатов, фасоль); 2) полутвёрдые образцы (фекалии, промывные воды, рвотные массы); 3) жидкые образцы (кровь). Подготовка образцов для анализа проведена в асептических условиях с использованием стерильной посуды и стерильного 0,9% раствора натрия хлорида (NaCl). Твёрдые и полутвёрдые образцы в количестве от 2 до 25 г (в

зависимости от объёмов, поступивших на анализ) переносили в ёмкость и с помощью блендера измельчали до однородного состояния. Измельчённый образец переносили в колбу с раствором NaCl в равных объёмных соотношениях. Жидкие образцы в количестве 20-25 мл переносили в колбу, добавляли равный объём раствора NaCl и осторожно перемешивали. Все подготовленные исследуемые образцы выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Измельченные образцы делили на три равные навески. Первую навеску использовали без обработки, вторую – обрабатывали 96% этиловым спиртом в равных объёмных соотношениях, выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа и периодически встряхивали, третью навеску прогревали при температуре 80 °C в течение 15 минут, проводя таким образом селективное выделение спор из исследуемых образцов.

Каждую навеску высевали по 0,1-0,2 мл на плотные питательные среды и на среды обогащения (в соотношении 1:9). Количество засеянных питательных сред

всех наименований рассчитывали с учётом инкубации в анаэробных условиях при двух температурах (30 ± 1) °C и (36 ± 1) °C. Как правило, на всех питательных средах рост исследуемых образцов при температуре инкубирования (36 ± 1) °C интенсивнее.

При первичном посеве в случае появления через 24–48 ч инкубации роста микроорганизмов на средах обогащения, засеянных обработанными образцами, производили высевы с них на плотные питательные среды. При одновременном появлении роста из тех же образцов на плотных средах их вторичный посев не производили.

Через 24–48 часов инкубации практически все необработанные образцы показали рост микроорганизмов на средах обогащения в виде помутнения разной степени интенсивности (некоторые – с признаками газообразования): по 433 образца на бульоне с печенью и среде Китта-Тароцци, и 419 – на ТГС (см. таблицу).

Из обработанных образцов рост микроорганизмов на тех же питательных средах получен в меньшем количестве, поскольку в этих условиях обычно погибают аэробные микроорганизмы и вегетативные формы анаэробов, но сохраняются споры *C. botulinum*. Сущ-

ственному снижению интенсивности роста микроорганизмов из исследуемых образцов способствовала их обработка нагреванием в течение 15 мин при температуре 80 °C. При обработке 96% этиловым спиртом рост микроорганизмов наблюдали на бульоне с печенью, среде Китта-Тароцци, ТГС из 108, 109 и 95 образцов, соответственно; при обработке нагреванием рост микроорганизмов отмечен на тех же питательных средах из 42, 42 и 35 образцов, соответственно.

При первичном посеве на плотные питательные среды обработанных и необработанных образцов рост микроорганизмов появлялся, как правило, через 48–72 ч и наблюдался в меньшем количестве случаев (при мерно на 70–75% меньше, чем на неселективных средах обогащения). На количество проб с видимым ростом микроорганизмов оказывали влияние анаэробные условия инкубации посевов, наличие селективных добавок в питательных средах, содержащих циклосерин или комбинацию циклосерина, триметопrima и сульфометаксозола. При отсутствии признаков роста посевы продолжали инкубировать до 5 суток и на средах обогащения, и на плотных питательных средах.

Аналит, из которого получен рост микроорганизмов на питательных средах

Питательные среды	Условия обработки исследуемых образцов					
	Без обработки (исходный образец)	96% этиловый спирт		Нагрев 80 °C 15 минут		
		Всего образцов с ростом	Образцы с типичным ростом для <i>C. botulinum</i>	Всего образцов с ростом	Образцы с типичным ростом <i>C. botulinum</i>	
Среды обогащения						
Бульон с печенью	433	108	-*	42	-	
Среда Китта-Тароцци	433	109	-	42	-	
ТГС	419	95	-	35	-	
Плотные среды						
CBI-agar с ЖЭ и СД	109	31	25	27	24	
Сульфитный агар с ЖЭ и циклосерином	110	34	25	31	25	

Примечание. * – Признак нельзя идентифицировать; ЖЭ – желточная эмульсия; СД – селективная добавка.

Использование селективных питательных сред позволило значительно снизить количество большинства сопутствующих микроорганизмов в исследованных образцах, которые росли на питательных средах, в основном, в виде небольших или точечных колоний, которые легко можно отличить от липазоположительных колоний *C. botulinum*. Благодаря высоким селективным

свойствам плотных питательных сред рост микроорганизмов на них наблюдался только из 27–34 обработанных образцов. Только из 20–25 образцов, в зависимости от условий обработки, на питательных средах с желточной эмульсией обнаружены колонии липазоположительных *C. botulinum* (рис. 2). По морфологии колонии, выделенные из пищевых продуктов и материала чело-

А



Б



В



Рис. 2. Рост клинических изолятов *C. botulinum*: А – на контрольной питательной среде *Clostridium botulinum* Isolation Agar Base; Б и В – на сульфитном агаре с желточной эмульсией и циклосерином.

века, не отличались между собой.

Обработка исследуемых образцов спиртом или нагреванием может приводить к гибели спор клоストрийд (особенно при небольшом количестве в образцах) или к потере проявления липазной активности [13]. Возможно поэтому при первичном посеве одного исследуемого образца рост единичных колоний *C. botulinum* получен только на сульфитном агаре с добавками, а на импортном аналоге из этого же образца наблюдали рост лишь при вторичном высеве из среды обогащения.

На кровяном агаре RCA-agar *C. botulinum* формировали серые колонии с неровными краями, полу-прозрачные или непрозрачные; чаще с узкой зоной β -гемолиза, проявление которого зависело от температуры инкубации.

Результаты испытаний по выделению *C. botulinum*

на питательных средах с желточной эмульсией представлены в таблице.

Предполагаемые колонии *C. botulinum*, выросшие на плотных питательных средах, отобраны для окраски по Граму и микроскопического исследования, и для детекции ботулотоксина биологическим и молекулярно-генетическим методами.

Бактериоскопия мазков, окрашенных по Граму выявила крупные грамположительные палочки с закрученными концами. В мазках, сделанных из колоний, хранившихся на воздухе при комнатной температуре в течение 6-8 ч, и в препаратах «раздавленная капля», хранившихся в течение суток, наблюдали клетки с терминально расположенными спорами овальной формы в виде «теннисной ракетки», характерные для *C. botulinum* (рис. 3).

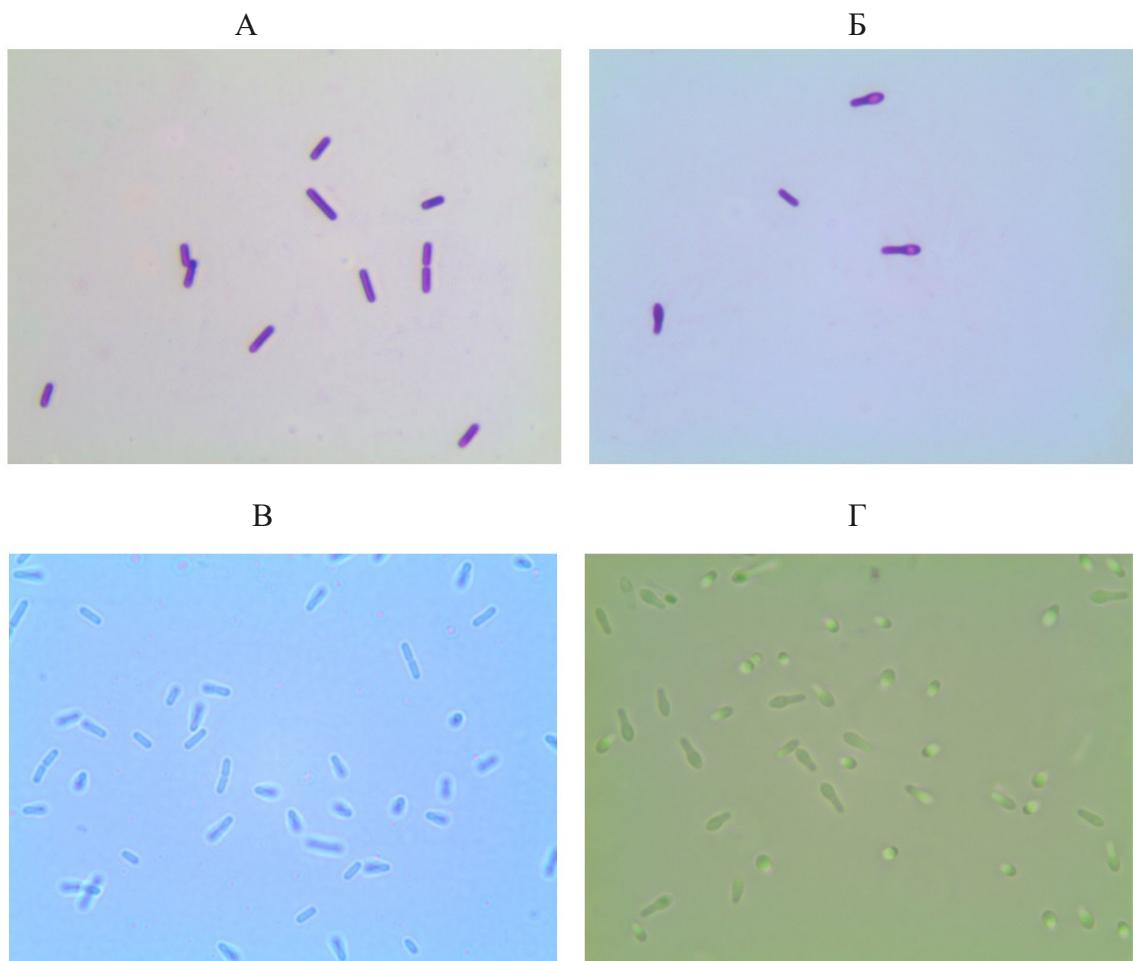


Рис. 3. *C. botulinum* (Ув. $\times 1000$). Световая микроскопия мазка по Граму: А – свежеприготовленный препарат; Б – препарат из колоний, хранившихся при комнатной температуре в аэробных условиях в течение 8 часов. Фазово-контрастная микроскопия препаратов «раздавленная капля»: В – свежеприготовленный препарат; Г – препарат, хранившийся в течение суток.

При исследовании выделенных культур *C. botulinum* биологическим и молекулярно-генетическим методами выявлены ботулотоксины А и В.

Обсуждение. В ходе исследования 440 образцов пищевой продукции и клинического материала от больных с подозрением на ботулизм из 25 образцов выделен возбудитель инфекции – *C. botulinum* с использованием специальных питательных сред импортного производ-

ства и отечественных питательных сред, предназначенные для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостродий. Количество выделенных культур на импортных и отечественных питательных средах одинаково.

Показано, что сульфитный агар с желточной эмульсией позволяет выявлять липазоположительные штаммы *C. botulinum*, производящие ботулотоксины типа

A и типа B.

При сравнении ингибирующих свойств питательных сред необходимо отметить более высокую эффективность CBI agar и RCA agar, в состав которых входит селективная добавка, содержащая комбинацию из трёх антимикробных препаратов – циклосерина, сульфаметоксазола, триметопrima, в отличие от сульфитного агара, содержащего только циклосерин. При использовании сульфитного агара с добавкой циклосерина, сульфаметоксазола и триметопrima отмечено улучшение его ингибирующих свойств.

Для обогащения роста исследуемых образцов отечественная коммерческая питательная среда Китта-Тароцци по своей специфической активности не уступает импортному бульону с печенью. ТГС также может быть использована для накопления роста клостродий.

Заключение. Селективное выделение *C. botulinum* с использованием специально предназначенных для этих целей питательных сред является неотъемлемой частью лабораторной диагностики ботулизма и санитарно-бактериологического исследования источника инфекции, направленное на выявление *C. botulinum* в объектах окружающей среды. В Российской Федерации отсутствует промышленный выпуск таких питательных сред. Во время расследования вспышки ботулизма летом 2024 года возникла необходимость использования среды Китта-Тароцци и сульфитного агара, предназначенных для анаэробных микроорганизмов и сульфитредуцирующих клостродий, соответственно.

Полученные положительные результаты исследования показали, что отечественная среда Китта-Тароцци и сульфитный агар в модификации 3 с добавлением желточной эмульсии и циклосерина при выделении *C. botulinum* из клинических образцов и пищевых продуктов не уступают специальным средам зарубежных производителей. Потребность обязательного внесения в сульфитный агар добавок показывает необходимость разработки и промышленного выпуска специальной отечественной питательной среды для выделения *C. botulinum* с дифференцирующей (в виде желточной эмульсии) и селективной добавки, содержащей циклосерин, триметопrim и сульфаметоксазол. Решение данной задачи является особенно актуальным в рамках программы импортозамещения [17, 18].

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 2, 3, 5-13 СМ. REFERENCES)

1. Шерхова Д.З. Ботулизм: клиника, диагностика, лечение (обзор литературы). *Молодой ученый*. 2020; 50(340): 389-91.
2. Ерусланов Б.В., Светоч Э.А., Мицевич И.П., Фурсова Н.К., Дятлов И.А. Ботулизм: характеристика возбудителя и лабораторные методы его диагностики. *Бактериология*. 2018; 3(4): 47-59. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59.
3. Миронов А.Ю., Шепелин И.А., Шепелин К.А. Патогенные клостродии: Справочник бактериолога. М.: Типография Копирайтинг; 2019. ISBN 978-5-9905485-0-3.
4. Миронов А.Ю., Шепелин И.А., Иванов А.В. Питательные среды: Справочник микробиолога. М.: Эпидбиомед-диагностика; 2024. ISBN 978-5-600-04208-7.
5. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Миронов А.Ю. О готовности медицинских организаций к предупреждению заноса и распространения опасных инфекционных заболеваний. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2022; 27(1): 60-70. DOI: 10.17816/EID108391.
6. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63-5.
7. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.
8. Sherkhova D.Z. Botulism: clinical features, diagnostics, treatment (literature review). *Molodoy uchenyi*. 2020; 50(340): 389-91. (in Russian)
9. Maslanka S.E., Luquez C., Dykes J.K., Tepp W.H., Pier C.L., Pellettet S. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. *J. Infect. Dis.* 2016; 213(3): 379-85. DOI: 10.1093/infdis/jiv327.
10. Akbulut D., Grant K.A., McLauchlin J. Improvement in laboratory diagnosis of wound botulism and tetanus among injecting illicit-drug users by use of real-time PCR assays for neurotoxin gene fragments. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(9): 4342-50. DOI: 10.1128/JCM.43.9.4342-4348.2005.
11. Eruslanov B.V., Svetoch E.A., Mitzevich IP, Fursova N.K., Dyatlov I.A. Botulism: characteristics of the pathogen and laboratory methods of its diagnosis. *Bakteriologiya*. 2018; 3(4): 47-59. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-4-47-59. (in Russian)
12. Lonati D., Schicchi A., Crevani M., Buscaglia E., Scaravaggi G., Maida F. et al. Foodborne botulism: clinical diagnosis and medical treatment. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(8): 1-17. DOI: 10.3390/toxins12080509.
13. Brunt J., Vliet A., Stringer S., Carter A.T., Lindström M., Peck M.W. Pan-genomic analysis of *Clostridium botulinum* group II (Non-Proteolytic *C. botulinum*) associated with foodborne botulism and isolated from the environment. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(5): 1-19. DOI: 10.3390/toxins12050306.
14. Rao A.K., Sobel J., Chatham-Stephens K., Luquez C. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of botulism, 2021. *MMWR Recomm. Rep.* 2021; 70(2): 1-30. DOI: 10.15585/mmwr.rr7002a1.
15. Centers for disease control and prevention, National Center for Infectious Diseases, Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Botulism in the United States, 1899-1996; handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. USA: Atlanta GA; 1998.
16. Maslanka S.E., Solomon H.M., Sharma S., Johnson E. Clostridium botulinum and its toxins. In: American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 32. USA: APHA Press; 2013. DOI: 10.2105/MBEF.0222.037.
17. Auricchio B., Anniballi F., Fiore A., Skiby J.E., Medici D.D. Evaluation of DNA extraction methods suitable for PCR-based detection and genotyping of *Clostridium botulinum*. *Biosecur. Bioterror.* 2013; 11: 200-6. DOI: 10.1089/bsp.2012.0082.
18. Barash J.R., Arnon S.S. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(2): 183-91. DOI: 10.1093/infdis/jit449.
19. Gullmar B., Molin N. Effect of nutrients on physiological properties of *Clostridium botulinum* type E. *J. Bacteriol.* 1967; 94(6): 1924-9. DOI: 10.1128/jb.94.6.1924-1929.1967.
20. Dezfulian M., McCroskey L.M., Hatheway C.L., Dowell V.R. Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human feces. *Journal of Clinical Microbiology*. 1981; 13(3): 526-31.
21. Mironov A.Yu., Shepelin I.A., Shepelin K.A. Pathogenic clostridia: Handbook of bacteriologist. Moscow: Tipografiya Kopiring; 2019. ISBN 978-5-9905485-0-3. (in Russian)
22. Mironov A.Yu., Shepelin I.A., Ivanov A.V. Nutritious environments: A Microbiologist's Handbook. Moscow: Epidbiomed-diagnostika; 2024. ISBN 978-5-600-04208-7. (in Russian)
23. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Mironov A.Yu. On the readiness of medical organizations to prevent the introduction and spread of dangerous infectious diseases. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni*. 2022; 27(1): 60-70. DOI: 10.17816/EID108391. (in Russian)
24. Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Alyoshkin V.A. Modern approaches to the problem of import substitution in

IMMUNOLOGY

the field of production of nutrient media. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian)
18. Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Shepelin A.P., Alyoshkin V.A. Status and

trends in the development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Щербатая О.С., Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Воронина Н.А., Киселева А.А.

О ВЫДЕЛЕНИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ НЕДИФТЕРИННЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ В АССОЦИАЦИИ С УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ


<https://elibrary.ru/ndiewk>

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

Цель исследования - сравнительный анализ частоты выделения чувствительных и резистентных к антибиотикам препаратам (AMP) клинических штаммов *Corynebacterium spp.* в ассоциации с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) у детей и взрослых без наличия инфекционной патологии.

Материал и методы. Клинические изоляты *Corynebacterium spp.* (93 штамма) и штаммы УПМ-ассоциантов идентифицированы масс-спектрометрическим методом, определена их антибиотикочувствительность диско-диффузионным методом и с помощью бактериализатора VITEK 2 Compact.

Результаты и обсуждение. Установлено, что клинические изоляты *Corynebacterium spp.* от детей чаще ($p \leq 0,05$) выделяли в ассоциации с одним УПМ (52,7±7,6%), реже – в монокультуре (25,6±6,6%) и в ассоциации с двумя УПМ (20,9±6,2%). Штаммы *Corynebacterium spp.* от взрослых изолированы с одинаковой частотой в монокультуре (40,0±6,9%) и в ассоциации с одним УПМ (42,0±7,0%). Недифтерийные коринебактерии чаще выделены от детей и взрослых без инфекционной патологии в ассоциации со стафилококками (*S. aureus*, *S. epidermidis*). Штаммы *Corynebacterium spp.* в ассоциации с *Moraxellaceae*, *H. influenzae*, *K. aerogenes* изолированы в количестве 10^6 КОЕ/мл только от детей.

Заключение. Формирование множественной лекарственной устойчивости у штаммов недифтерийных коринебактерий сопровождается выделением их с *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* в большом количестве (10^6 - 10^7 КОЕ/мл), тогда как клинические изоляты, чувствительные ко всем AMP, изолированы в ассоциации с УПМ в незначительном количестве (10^4 КОЕ/мл и менее).

Ключевые слова: *Corynebacterium spp.*; условно-патогенные микроорганизмы; антибиотикорезистентные штаммы; ассоциации микроорганизмов; дети; взрослые

Для цитирования: Щербатая О.С., Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Воронина Н.А., Киселева А.А. О выделении антибиотикорезистентных штаммов недифтерийных коринебактерий в ассоциации с условно-патогенными микроорганизмами. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (3): 204-209.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-204-209>

EDN: NDIEWK

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.01.2025

Принята к печати 11.02.2025

Опубликовано 25.02.2025

Shcherbataya O.S., Kharseeva G.G., Alutina E.L., Voronina N.A., Kiseleva A.A.

ON THE ISOLATION OF ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS OF NON-DIPHTHERINE CORINEBACTERIA IN ASSOCIATION WITH OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

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

The aim of the study was to comparatively analyze the frequency of isolation of AMP-sensitive and -resistant clinical strains of *Corynebacterium spp.* in association with numerically pathogenic microorganisms in children and adults without infectious pathology. Clinical isolates of *Corynebacterium spp.* (93 strains) and strains of associated microorganisms were identified by mass spectrometry, their antibiotic sensitivity was determined by the disk diffusion method and using a VITEK 2 Compact bacteriologist. It was found that clinical isolates of *Corynebacterium spp.* from children were more often ($p \leq 0,05$) isolated in association with one numerically pathogenic microorganism (52,7±7,6%), less often - in monoculture (25,6±6,6%) and in association with two numerically pathogenic microorganisms (20,9±6,2%). Strains of *Corynebacterium spp.* from adults were isolated with the same frequency in monoculture (40,0±6,9%) and in association with one numerically pathogenic microorganism (42,0±7,0%). Non-diphtheria corynebacteria were more often isolated from children and adults without infectious pathology in association with staphylococci (*S. aureus*, *S. epidermidis*). Strains of *Corynebacterium spp.* in association with *Moraxellaceae*, *H. influenzae*, *K. aerogenes* were isolated in an amount of 10^6 CFU/ml only from children. The formation of multiple drug resistance in strains of non-diphtheria corynebacteria was accompanied by their isolation with *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* in large quantities (10^6 - 10^7 CFU/ml), while isolates sensitive to all AMPs were isolated in association with UMP in small quantities (10^4 CFU/ml or less).

Key words: *Corynebacterium spp.*; opportunistic microorganisms; antibiotic-resistant strains; microorganism associations; children; adults

For correspondence: Kharseeva Galina G., Dr. Sci. (medical), Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru.

For citation: Shcherbataya O.S., Kharseeva G.G., Alutina E.L., Voronina N.A., Kiseleva A.A. On the isolation of antibiotic-resistant strains of non-diphtherine corynebacteria in association with opportunistic microorganisms. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 204-209 (in Russ.)
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-204-209>
EDN: NDIEWK

Information about authors:

Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Alutina E.L., <https://orcid.org/0000-0001-6968-0583>;
Balakhnova V.V., <https://orcid.org/0000-0001-8832-7419>;
Voronina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-9655-6876>;
Киселева А.А., <https://orcid.org/0009-0009-1609-1190>.

Funding. The study had no sponsor support.

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

Received 10.01.2025

Accepted 11.02.2025

Published 25.02.2025

Введение. Недифтерийные коринебактерии составляют значительную часть микробиоты различных биотопов организма человека [1]. До недавнего времени исследованию их роли в патологии не отводилось должного внимания. Однако в последние годы, в связи с развитием и совершенствованием молекулярно-генетических методов клинической лабораторной диагностики, представления об этих микроорганизмах существенно расширились. Это позволило с помощью секвенирования гена *groB* идентифицировать новые виды коринебактерий, значение которых ещё предстоит исследовать [2, 3]. Имеющиеся данные о фено- и генотипических проявлениях свойств *Corynebacterium* spp. указывают на их далеко не однозначную роль в микробиоте организма человека. Имеется обширный массив данных о связи недифтерийных коринебактерий с развитием воспалительных заболеваний различной локализации [1, 2, 4, 5]. Особое значение исследователи придают в этой связи *Corynebacterium striatum* как возбудителю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), признанному облигатным патогеном [5]. Способность вызывать инфекционный процесс обусловлена у *Corynebacterium* spp. их высокой адгезивной, инвазивной, цитотоксической, биопленкообразующей активностью, продукцией ферментов агрессии – гемолизина и уреазы [1]. У клинических изолятов этих микроорганизмов установлена взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к antimикробным препаратам (АМП) [6-9]. Это позволяет рассматривать штаммы коринебактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) как патогенные для человека.

Известно, что межвидовые взаимодействия *Corynebacterium* spp. и других представителей микробиоты оказывают положительное воздействие на организм человека. Некоторые штаммы отдельных видов недифтерийных коринебактерий, обладая высокой antimикробной и антиоксидантной активностью, могут выступать в роли антиагонистов патогенных бактерий, изменяя их вирулентность и/или жизнеспособность. *C. accolens* и *C. amycolatum* подавляют рост *Streptococcus pneumoniae*; *C. aurimucosum*, *C. aquatimens* и *C. mucifaciens* – *Acinetobacter baumannii* [10, 11]. Обильная колонизация *Corynebacterium* spp. может предотвратить или задержать колонизацию слизистой оболочки дыхательных путей пневмококками [10]. *C. accolens* способствует вы свобождению свободных жирных кислот из эпителиальных клеток организма хозяина, что подавляет рост пневмококков [10]. *Corynebacterium* spp., особенно некоторые штаммы *C. accolens* и *C. propinquum*, входящие в состав микробиоты носоглотки, могут снижать индивидуальную восприимчивость людей к новой коронавирусной инфекции за счёт подавления экспрессии рецепторов ACE2, TMPRSS2, катепсина L и, как следствие, ослабления силы связывания белка-шипа SARS-CoV-2 и клеток человека [12]. Несомненный интерес представляют данные о том, что *Corynebacterium* spp. могут модулировать фенотип различных патогенов. *C. xerosis* предотвращает образование биоплёнки на абиотических поверхностях *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* [10, 11]. Вышеизложенное указывает на важность исследования межмикробных взаимодействий *Corynebacterium* spp. и других представителей микробиоты на поверхности слизистых оболочек различных биотопов человека.

Цель исследования – сравнительный анализ частоты выделения чувствительных и резистентных к АМП клинических штаммов *Corynebacterium* spp. в ассоциации с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ) у детей и взрослых без инфекционной патологии.

Материал и методы. Клинические штаммы *Corynebacterium* spp. (93 шт.) и УПМ-ассоцианты (*S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* (Group A), *Streptococcus viridans*, *S. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella nonliquef*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Psychrobacter faecalis*, *Klebsiella aerogenes*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas stutzeri*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia stabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*) выделены в 2020-2024 гг. из биоматериала (полость носа, ротоглотка, ухо, мокрота, задний свод влагалища, цервикальный канал) от детей (43 шт.) и взрослых (50 шт.), не имевших инфекционной патологии на момент обследования. Изолятами недифтерийных коринебактерий и УПМ-ассоцианты получены из лаборатории клинической бактериологии ГАУ РО «Областной клинико-диагностический центр» и идентифицированы масс-спектрометрическим методом (MALDI-ToF MS) на масс-спектрометре BioMerieux (Франция).

Определение чувствительности клинических изоля-

тов недифтерийных коринебактерий к АМП проводили диско-диффузионным методом и с помощью автоматизированного бактериологического анализатора VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция) к бензилпенициллину, ципрофлоксацину, моксифлоксацину, гентамицину, ванкомицину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, линезолиду, рифампицину в соответствии с Клиническими рекомендациями¹.

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы STATISTICA 12.0 (StatSoftInc, США) и MedCalc (версия 9.3.5.0).

Результаты. Все исследованные клинические изоляты недифтерийных коринебактерий от детей и взрослых выделены из различных биотопов организма в количестве 10^5 КОЕ/мл и менее. Штаммы коринебактерий, выделенные от детей, относились к 10 различным

видам, от взрослых – к 12 видам *Corynebacterium* spp. Наиболее часто ($p \leq 0,05$) от детей изолирован вид *C. pseudodiphtheriticum* ($52,7 \pm 7,6\%$ случаев), тогда как от взрослых – *C. pseudodiphtheriticum* и близкородственный ему вид *C. propinquum* ($22,0 \pm 5,9\%$ и $16,0 \pm 5,2\%$ соответственно), а также *C. amycolatum* ($20,0 \pm 5,65\%$).

Клинические изоляты недифтерийных коринебактерий от детей чаще ($p \leq 0,05$) выделяли в ассоциации с одним УПМ-ассоциантом ($52,7 \pm 7,6\%$ случаев), реже – в монокультуре ($25,6 \pm 6,6\%$) и в ассоциации с двумя УПМ-ассоциантами ($20,9 \pm 6,2\%$). Штаммы *Corynebacterium* spp. от взрослых изолировали с одинаковой частотой в монокультуре ($40,0 \pm 6,9\%$) и в ассоциации с одним УПМ-ассоциантом ($42,0 \pm 7,0\%$).

Стафилококки (*S. aureus*, *S. epidermidis*) как УПМ-ассоцианты недифтерийных коринебактерий наиболее

Частота выделения клинических изолятов *Corynebacterium* spp. у детей в ассоциации с УПМ

Виды коринебактерий	Биотоп	Количество штаммов	Ассоцианты	Количество штаммов	Обсемененность
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=22)	Полость носа	21	<i>S. epidermidis</i>	11	$<10^5$
			<i>S. aureus</i>	2	$<10^5$
			<i>A. baumannii</i>	1	$<10^5$
			<i>P. faecalis</i>	1	$<10^5$
			<i>S. viridans</i>	1	$<10^5$
			<i>S. pneumoniae</i>	2	$<10^5$
				3	$<10^5$
			<i>M. catarrhalis</i>	1	10^6
				1	10^7
			<i>H. influenzae</i>	1	$<10^5$
				1	10^6
			<i>M. nonliquef</i>	1	$<10^5$
			<i>S. pyogenes</i> (Group A)	1	$<10^5$
	Ротоглотка	1	-	-	-
<i>C. amycolatum</i> (n=4)	Полость носа	2	<i>K. aerogenes</i>	1	10^6
	Задний свод влагалища	1	<i>P. asaccharolyticus</i>	1	10^6
	Ротоглотка	1	-	-	-
<i>C. durum</i> (n=3)	Полость носа	3	<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$
			<i>S. epidermidis</i>	1	10^5
<i>C. propinquum</i> (n=3)	Полость носа	2	<i>S. epidermidis</i>	1	$<10^5$
	<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$		
	Ротоглотка	1	<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$
<i>C. otitidis</i> (n=3)	Ухо	3	<i>S. aureus</i>	1	10^7
			<i>E. faecalis</i>	1	10^1
<i>C. falsenii</i> (n=2)	Ротоглотка	2	<i>P. aeruginosa</i>	1	$<10^5$
			<i>K. pneumoniae</i>	1	$<10^5$
<i>C. accolens</i> (n=1)	Полость носа	1	<i>S. epidermidis</i>	1	10^5
			<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$
<i>C. argentorantense</i> (n=3)	Ротоглотка	3	-	-	-
<i>C. xerosis</i> (n=1)	Ротоглотка	1	-	-	-
<i>C. stationis</i> (n=1)	Полость носа	1	-	-	-
Всего		43		41	

Примечание. Здесь и в табл.2: жирным шрифтом выделен повышенный уровень обсемененности УПМ-ассоциантами биоматериала из различных биотопов организма.

¹Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации (EUCAST, 2024). URL: <https://www.antibiotic.ru/library/eucast-eucast-clinical-breakpoints-bacteria-13-0-rus/>.

часто ($p \leq 0,05$) выделяли как от детей ($54,5 \pm 2,4\%$), так и от взрослых ($52,1 \pm 7,2\%$). У всех обследованных пациентов стафилококки высеивали в количестве 10^5 КОЕ/мл и менее. Исключение составил один ребенок, у которо-

го из уха выделена *C. otitidis* в ассоциации с *S. aureus* в количестве 10^7 КОЕ/мл и один взрослый пациент, у которого из полости носа изолированы *C. prepinsu* и *S. epidermidis* в количестве 10^6 КОЕ/мл (табл. 1, 2).

Таблица 2

Частота выделения клинических изолятов *Corynebacterium* spp. у взрослых в ассоциации с УПМ

Виды коринебактерий	Биотоп	Количество штаммов	Ассоциианты	Количество штаммов	Обсемененность	
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=11)	Полость носа	9	<i>S. epidermidis</i>	4	$<10^5$	
			<i>K. pneumoniae</i>	1	$<10^5$	
	Цервикальный канал	1	<i>S. epidermidis</i>	1	$<10^5$	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	1	$<10^5$	
<i>C. amycolatum</i> (n=10)	Мокрота	1	-	-	-	
	Ухо	4	<i>S. epidermidis</i>	2	$<10^5$	
			<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$	
			<i>P. stutzeri</i>	1	$<10^5$	
	Ротоглотка	3	<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$	
			<i>K. aerogenes</i>	1	$<10^5$	
	Мокрота	2	-	-	-	
<i>C. propinquum</i> (n=8)	Полость носа	1	<i>S. epidermidis</i>	1	$<10^5$	
	Полость носа	6	<i>S. epidermidis</i>	2	$<10^5$	
			<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$	
			<i>A. baumannii</i>	1	$<10^5$	
			<i>S. maltophilia</i>	1	10^6	
	Ротоглотка		<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$	
			<i>K. aerogenes</i>	1	$<10^5$	
<i>C. otitidis</i> (n=6)	Ухо	5	<i>S. aureus</i>	2	$<10^5$	
	Полость носа	1	<i>P. stutzeri</i>	1	$<10^5$	
			<i>S. epidermidis</i>	1	$<10^5$	
			<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$	
<i>C. accolens</i> (n=5)	Полость носа	3	<i>S. epidermidis</i>	1	$<10^5$	
	Ротоглотка	1	<i>S. aureus</i>	1	$<10^5$	
	Рана	1	<i>E. coli</i>	1	$<10^5$	
<i>C. durum</i> (n=2)	Полость носа	1	<i>S. epidermidis</i>	1	10^6	
	Мокрота	1	-	-	-	
<i>C. falsenii</i> (n=2)	Мокрота	2	-	-	-	
<i>Corynebacterium</i> spp. (n=2)	Ротоглотка	1	<i>S. aureus</i>	1	10^5	
			<i>S. marcescens</i>	1	10^7	
	Мокрота	1	<i>P. aeruginosa</i>	1	10^7	
			<i>P. aeruginosa</i>	1	$<10^5$	
<i>C. simulans</i> (n=1)	Задний свод влагалища	1	<i>S. viridans</i>	1	$<10^5$	
			<i>Lactobacillus</i> spp.	1	$<10^5$	
<i>C. jreneyi</i> (n=1)	Полость носа	1	<i>K. pneumoniae</i>	1	$<10^5$	
<i>C. tuberculostearicum</i> (n=1)	Полость носа	1	<i>S. epidermidis</i>	1	$<10^5$	
			<i>B. stabilis</i>	1	$<10^5$	
<i>C. xerosis</i> (n=1)	Полость носа	1	-	-	-	
Всего		50		39		

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) изолированы от $6,8 \pm 3,8\%$ детей и $18,7 \pm 5,6\%$ взрослых, что достоверных отличий не имеет. У одного взрослого обследованного пациента из ротоглотки выделен штамм *Corynebacterium* spp., который не удалось идентифицировать до вида с помощью масс-спектрометрического метода исследования, одномоментно с тремя УПМ-ассоцииантами: *S. aureus* (10^7 КОЕ/мл), *S. marcescens* (10^7 КОЕ/мл), *P. aeruginosa* (10^7

КОЕ/мл). Представители семейства *Moraxellaceae* в ассоциации с недифтерийными коринебактериями выделены только у детей, причем у двоих – из полости носа одномоментно с *C. pseudodiphtheriticum* в количестве 10^6 и 10^7 КОЕ/мл.

Энтеробактерии выделены у взрослых ($20,8 \pm 5,8\%$) чаще ($p \leq 0,05$), чем у детей ($4,5 \pm 3,1\%$), но в незначительном количестве (менее 10^5 КОЕ/мл). У одного ребёнка в ассоциации с *C. amycolatum* изолирована из по-

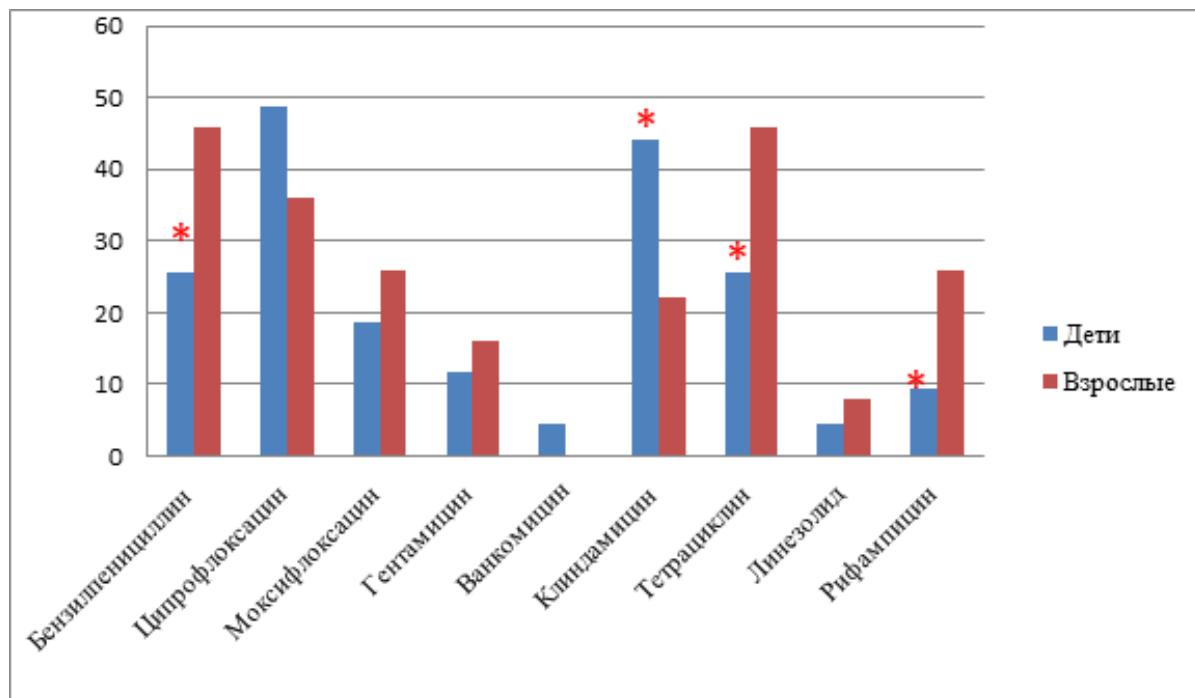
лости носа *K. aerogenes* в количестве 10^6 КОЕ/мл.

H. influenzae выделена в ассоциации с коринебактериями только у детей, причем у одного из них – из полости носа в количестве 10^6 КОЕ/мл одномоментно с *C. pseudodiphtheriticum*.

Представители семейства *Streptococcaceae* выделены у $11,4 \pm 4,8\%$ детей и $4,2 \pm 2,9\%$ взрослых, что достовер-

ных отличий не имело. У всех обследованных эти УПМ-ассоцианты изолированы в количестве 10^5 КОЕ/мл и менее.

При определении чувствительности клинических штаммов недифтерийных коринебактерий к АМП установлено, что среди детей реже ($p \leq 0,05$), чем среди взрослых регистрировалась резистентность к бензилпенициллину, тетрациклину, рифампицину (см. рисунок).



Количество резистентных к АМП клинических изолятов *Corynebacterium* spp. от детей и взрослых, не имевших неинфекционной патологии (абс./% \pm m).

* – достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между показателями у детей и взрослых.

Количество клинических изолятов с резистентностью к клиндамицину у детей составило $44,2 \pm 7,6\%$, что в два раза ниже, чем у взрослых ($22,0 \pm 5,8\%$). Показатели резистентности к другим АМП у детей и взрослых достоверных отличий не имели. Количество клинических штаммов *Corynebacterium* spp. с МЛУ, выделенных у детей, составило 10 (23,3%), у взрослых – 18 (36,0%). Чаще эти клинические изоляты выделяли в ассоциации с *S. aureus* и *S. epidermidis*. Все клинические штаммы недифтерийных коринебактерий с МЛУ от детей изолированы с одним УПМ-ассоциантом или в монокультуре, за исключением одного штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного с двумя УПМ-ассоциантами: *H. influenzae* (10^6 КОЕ/мл) и *M. catarrhalis* (10^7 КОЕ/мл). Клинические изоляты недифтерийных коринебактерий с МЛУ от взрослых выделяны, в основном, в монокультуре и с одним УПМ-ассоциантом, реже – с двумя. Исключение составил один штамм *Corynebacterium* spp., выделенный с тремя УПМ-ассоциантами: *S. marcescens* (10^7 КОЕ/мл), *P. aeruginosa* (10^7 КОЕ/мл), *S. aureus* (10^5 КОЕ/мл).

Количество клинических штаммов *Corynebacterium* spp., чувствительных ко всем АМП, составило у детей 5 (11,6%), у взрослых – 9 (18,0%), что не имело статистически значимых отличий. Эти клинические изоляты так-

же чаще выделяли в ассоциации с *S. epidermidis* и *S. aureus*. Все эти штаммы недифтерийных коринебактерий изолированы в монокультуре, с одним или двумя УПМ-ассоциантами, причем в количестве 10^4 КОЕ/мл и менее.

Обсуждение. Составляя значительную часть мицобиоты различных биотопов организма человека, недифтерийные коринебактерии вступают в сложные межвидовые трофические и метаболомные взаимодействия с другими УПМ, формируют партнерские межвидовые взаимоотношения, основанные на сходных трофических характеристиках – скорости утилизации углеводов и др. Нами проведён сравнительный анализ частоты выделения клинических штаммов *Corynebacterium* spp. в ассоциации с УПМ из различных биотопов организма детей и взрослых, не имевших на момент обследования инфекционной патологии. Ранее проведенные исследования показали, что у пациентов с воспалительными заболеваниями респираторного тракта популяция недифтерийных коринебактерий гетерогенна, причем большинство этих микроорганизмов изолированы из ротоглотки в количестве 10^6 КОЕ/мл и выше, что свидетельствует об их этиологической роли в развитии патологического процесса [4]. Все клинические изоляты *Corynebacterium* spp. от пациентов, не имевших инфекционной патологии, изолированы в количе-

стве 10^5 КОЕ/мл и менее, что указывает на отсутствие реализации их возможного патогенного потенциала.

Наиболее часто у детей и взрослых недифтерийные коринебактерии, большинство из которых относились к виду *C. pseudodiphtheriticum*, выявляли в ассоциации со стафилококками ($54,5\pm2,4\%$ и $52,1\pm7,2\%$ соответственно), изолированными количестве 10^5 КОЕ/мл и менее. *S. aureus* и *S. epidermidis* выделены в количестве 10^7 КОЕ/мл и 10^6 КОЕ/мл соответственно только у двух пациентов в ассоциации с *C. otitidis* и *C. prepinsu*. Это согласуется с данными о том, что некоторые штаммы *C. pseudodiphtheriticum* обладают антагонистической активностью по отношению к стафилококкам [11]. У лиц, не имеющих инфекционной патологии, баланс между различными представителями микробиоты организма не нарушен, вследствие чего не наблюдается усиленного размножения стафилококков, изолированных со всеми выделенными штаммами *C. pseudodiphtheriticum*. Это не коснулось видов – *C. otitidis* и *C. prepinsu*. УПМ-ассоцианты недифтерийных коринебактерий (*Moraxellaceae*, *H. Influenzae*, *K. aerogenes*) в количестве 10^6 КОЕ/мл и более изолированы от детей, но не от взрослых, что может свидетельствовать о недостаточно сбалансированных межмикробных взаимодействиях представителей микробиоты детского организма в силу физиологических причин.

При рассмотрении частоты выделения недифтерийных коринебактерий с различными представителями УПМ в зависимости от их чувствительности и резистентности к АМП обнаружено, что клинические изоляты, чувствительные ко всем АМП, изолированы в монокультуре с одним или двумя УПМ-ассоциантами, причем в количестве 10^4 КОЕ/мл и менее. Среди штаммов *Corynebacterium* spp. с МЛУ выявлены клинические изоляты в ассоциации с *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* в количестве 10^6 - 10^7 КОЕ/мл. Это может быть связано с тем, что формирование резистентности к АМП у недифтерийных коринебактерий приводит к изменению их биологических свойств и, как следствие, характера межмикробных взаимодействий с другими представителями микробиоты организма.

Заключение. Клинические изоляты *Corynebacterium* spp. чаще выделяли от детей и взрослых без инфекционной патологии в ассоциации со стафилококками (*S. aureus*, *S. epidermidis*). Недифтерийные коринебактерии изолированы в ассоциации с УПМ (*Moraxellaceae*, *H. influenzae*, *K. aerogenes*) в количестве 10^6 КОЕ/мл только у детей. Формирование МЛУ у штаммов недифтерийных коринебактерий сопровождалось выделением их с УПМ (*H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*) в большом количестве (10^6 – 10^7 КОЕ/мл), тогда как клинические изоляты, чувствительные ко всем АМП, изолированы в ассоциации с УПМ в незначительном количестве (10^4 КОЕ/мл и менее).

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 2, 3, 5, 8-12 СМ. REFERENCES)

1. Харссеева Г. Г., Мангутов Э.О., Миронов А.Ю. Коринебактериозы: этиология, микробиологическая диагностика. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (1): 59-67.
 4. Харссеева Г. Г., Мангутов Э.О., Бут О.М., Чепусова А.В., Алутина

Э.Л. Анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 430-4.

6. Мангутов Э. О., Алиева А. А., Харсеева Г. Г., Воронина Н. А., Алексеева Л. П., Евдокимова В. В. и др. *Corynebacterium* spp.: взаимосвязь патогенных свойств и резистентности к антимикробным препаратам. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (9): 519-24.
 7. Мангутов Э. О., Харсеева Г. Г., Подойница О. А., Носков А. К., Кругликов В. Д., Алтутина Э. Л. и др. *Corynebacterium* spp.: анализ профилей резистентности к антимикробным препаратам у изолятов от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта и практически здоровых лиц. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (6): 356-64.

REFERENCES

1. Kharseeva G.G., Mangutov E.O., Mironov A.Yu. Corynebacteriosis: etiology, microbiological diagnostics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2025; 70 (1): 59-67. DOI: 10.51620/0869-2084-2025-70-1-59-67. (in Russian)
 2. de Oliveira Sant'Anna L., Dos Santos L.S., Araújo M.R.B., da Rocha D.J.P.G., Ramos J.N., Baio P.V.P. et al. *Corynebacterium guaraldaiae* spp. nov.: a new species of *Corynebacterium* from human infections. *Braz. J. Microbiol.* 2023; 54(2): 779-90. DOI: 10.1007/s42770-023-00938-y.
 3. Cappelli E. A., Ksiezarek M., Wolf J., Neumann-Schaal M., Ribeiro T.G., Peixe L. Expanding the bacterial diversity of the female urinary microbiome: description of eight new *Corynebacterium* Species. *Microorganisms*. 2023; 11(2): 388.
 4. Kharseeva G. G., Mangutov E. O., But O. M., Chepusova A. V., Alutina E. L. Analysis of the frequency of isolation of non-diphtheria corynebacteria from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (7): 430-4. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-7-430-434. (in Russian)
 5. Kang Y., Chen S., Zheng B., Du X., Li Z., Tan Z. et al. Epidemiological investigation of hospital transmission of *Corynebacterium striatum* infection by core genome multilocus sequence typing approach. *Microbiol. Spectr.* 2023; 11(1): e0149022. DOI: 10.1128/spectrum.01490-22.
 6. Mangutov E.O., Alieva A.A., Kharseeva G.G., Voronina N.A., Alekseeva L.P., Evdokimova V.V. et al. *Corynebacterium* spp.: relationship between pathogenic properties and resistance to antimicrobial drugs. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67 (9): 519-24. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-9-519-524. (in Russian)
 7. Mangutov E. O., Kharseeva G. G., Podoinitsyna O. A., Noskov A. K., Kruglikov V. D., Alutina E. L. et al. *Corynebacterium* spp.: analysis of antimicrobial resistance profiles in isolates from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract and practically healthy individuals. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (6): 356-64. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-6-356-64. (in Russian)
 8. Heggendorf L.H., Gomes S.W.C., Sant'Anna L.O., Longo L., Farsura A.F., Ramos J.N. et al. Virulence potential and characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium amycolatum* strains isolated from nosocomial infections. *Ijsrm. Human.* 2022; 22(4): 1-24. DOI: 10.25166/IJSRM/2022.22.4.2.
 9. Qiu J., Shi Y., Zhao F., Xu Y., Xu H., Dai Y. et al. The pan-genomic analysis of *Corynebacterium striatum* revealed its genetic characteristics as an emerging multidrug-resistant pathogen. *Evol. Bioinform. Online*. 2023; 19:11769343231191481. DOI: [10.1177/11769343231191481](https://doi.org/10.1177/11769343231191481).
 10. Koenen M. H., de Steenhuijsen Piters W. A. A., Bogaert D., Verhagen L. M. The microbiota in respiratory tract infections: from association to intervention. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2022; 35(3): 215-22. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000826.
 11. Ramsey M. M., Freire M. O., Gabrilska R. A., Rumbaugh K. P., Lemon K. P. *Staphylococcus aureus* shifts toward commensalism in response to *Corynebacterium* Species. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1230. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01230.
 12. Szabo D., Ostorhazi E., Stercz B., Makra N., Penzes K., Kristof K. et al. Specific nasopharyngeal *Corynebacterium* strains serve as gatekeepers against SARS-CoV-2 infection. *Geroscience*. 2023; 45 (5): 2927-38. DOI: 10.1007/s11357-023-00850-1.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Баимова Р.Р., Рябико Е.Г., Остankova Ю.В., Токаревич Н.К.



<https://elibrary.ru/nzncgq>

ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ДЕТЕКЦИИ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ

ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия

Оптимизирован способ детекции и генотипирования патогенных лептоспир в биологических образцах, на основе классической ПЦР с использованием трёх пар праймеров. При разработке метода использованы образцы, полученные от диких и синантропных мелких грызунов, собранных на территории Санкт-Петербурга. Согласно разработанному методу из клинического материала экстрагируют тотальную ДНК, далее с помощью амплификации по фрагменту гена lipL32 определяют наличие или отсутствие ДНК патогенных лептоспир. Образцы, содержащие ДНК патогенных лептоспир, амплифицируют последовательно по двум фрагментам генов rpoB и secY. Регистрируют полученные результаты посредством электрофореза в агарозном геле с последующей детекцией на трансиллюминаторе. Полученные фрагменты секвенируют по Сэнгеру. Оптимизированный способ направлен на усовершенствование и расширение арсенала способов, предназначенных для выявления и генотипирования различных видов патогенных лептоспир в целях улучшения диагностики и профилактики заболевания.

Ключевые слова: *Leptospira; лептоспироз; генотипирование патогенных лептоспир; метод диагностики лептоспироза*

Для цитирования: Баимова Р.Р., Рябико Е.Г., Остакова Ю.В., Токаревич Н.К. Оптимизация способа детекции и генотипирования патогенных лептоспир в биологических образцах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (3): 210-217.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-210-217>
EDN: NZNCGQ

Для корреспонденции: Баимова Регина Равилевна, мл. науч. сотр. лаб. зооантропозных инфекций; e-mail: baimovar@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.09.2024

Принята к печати 25.11.2024

Опубликовано 25.02.2025

Baimova R.R., Riabiko E.G., Ostankova Yu.V., Tokarevich N.K.

OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR DETECTION AND GENOTYPING OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA IN BIOLOGICAL SAMPLES

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

The method for detection and genotyping of pathogenic leptospires in biological samples has been optimized, based on classical PCR using three pairs of primers. When developing the method, samples obtained from wild and synanthropic small rodents collected in St. Petersburg were used. According to the method we developed, total DNA is extracted from clinical material, then the presence or absence of pathogenic Leptospira DNA is determined using amplification using a fragment of the lipL32 gene. Two fragments of the rpoB and secY genes amplify samples containing DNA of pathogenic Leptospira sequentially. The results obtained are recorded by electrophoresis in an agarose gel, followed by detection on a transilluminator. The resulting fragments are sequenced using Sanger. The optimized method is aimed at improving and expanding the range of methods designed to identify and genotype various types of pathogenic leptospires in order to improve the diagnosis and prevention of the disease.

Key words: *Leptospira; leptospirosis; genotyping of pathogenic leptospira; diagnostic method for leptospirosis*

For citation: Baimova R.R., Riabiko E.G., Ostankova Yu.V., Tokarevich N.K. Optimization of the method for detection and genotyping of pathogenic leptospira in biological samples. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (3): 210-217

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-210-217>

EDN: NZNCGQ

For correspondence: Baimova R.R., junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St.Petersburg Pasteur Institute; e-mail: baimova@pasteurorg.ru

Information about authors:

Baimova R.R., <https://orcid.org/0000-0002-0145-2653>;

Riabiko E.G., <https://orcid.org/0000-0001-8738-3021>;

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

Tokarevich N.K., <https://orcid.org/0000-0001-6433-3486>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 14.09.2024

Accepted 25.11.2024

Published 25.02.2025

Введение. Лептоспироз считается одним из самых распространённых зооантропонозных заболеваний, влияющих как на здоровье людей, так и животных, по всему миру. Ежегодно выявляют порядка миллиона заболеваний, и около 60 тыс. смертельных исходов. Наибольшие показатели регулярно регистрируются в развивающихся странах с тропическим климатом [1]. Вспышки лептоспироза связаны как с социальными факторами, так и с природными явлениями, такими как ураганы и наводнения, поскольку это создает благоприятные условия для выживания видов лептоспир в окружающей среде [2, 3].

В последнее десятилетие в Российской Федерации наблюдается тенденция к снижению заболеваемости, однако, в значительной степени это связано с отсутствием высокоточной доступной диагностики, и с тем, что при лёгком течении лептоспироза инфицированные люди не обращаются в медицинские учреждения. При этом активность природных очагов лептоспироза во всех федеральных округах страны сохраняется [4] и может приводить к эпидемическим вспышкам в случае природных катастроф.

Диагностические ошибки при лептоспирозе часто связаны с отсутствием специфических признаков и симптомов. Лёгкое течение лептоспироза часто регистрируется под другими диагнозами, и может наблюдаться как самокупирующееся лихорадочное заболевание. Тяжёлая форма характеризуется полиорганной недостаточностью и смертностью до 40% [5].

Клиническая лабораторная диагностика лептоспироза включает в себя прямые и косвенные методы обнаружения возбудителя. К косвенным методам обнаружения лептоспир, относят серологический метод, направленный на поиск антител: реакция микроагглютинации (РМА), иммуноферментный анализ (ИФА). К прямым методам относят микроскопию в тёмном поле, бактериологический и молекулярно-генетический методы, направленные на поиск самого возбудителя [6]. Молекулярно-генетический метод диагностики лептоспироза, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР), считается наиболее чувствительным и специфичным способом выявления лептоспир на ранних этапах заболевания, ещё до развития иммунного ответа.

Классификация лептоспир до 1989 года основана исключительно на их вирулентности, патогенные лептоспирь относили к виду *Leptospira interrogans*, сапрофитные к *Leptospira biflexa*. Дальнейшая классификация основана на антигенных характеристиках с использованием серологического метода. *L. interrogans* и *L. biflexa* содержат большое количество сероваров, которые, в свою очередь, собираются в серогруппы по антигенному родству [7]. Известно 32 серогруппы и 300 сероваров [8].

Использование серологической классификации в диагностике лептоспирозной инфекции имеет важное эпидемиологическое значение. Стандартной методи-

кой для определения сероваров является реакция микроагглютинации с перекрёстной абсорбцией антител. Основным ограничением данного метода является трудоёмкость, связанная с необходимостью наличия панели живых культур и постоянной рекультивации этих штаммов [9].

Развитие молекулярно-генетических методов привело к созданию таксономической классификации, основанной на генотипических характеристиках. Помимо патогенных и сапрофитных штаммов, классифицированы виды с умеренным уровнем патогенности, при этом имеющие общего предка с патогенными видами [10].

По генетической классификации, основанной на полногеномном анализе, род *Leptospira* включает в себя 72 вида, сгруппированных в 4 субклады: патогенные (P1), промежуточные (P2), сапрофитные (S1, S2) [8].

Филогенетический анализ на основе нуклеотидных последовательностей геномов лептоспир, позволил выяснить, что виды и серовары не имеют корреляционной связи, и один серовар может относиться к разным видам. На данный момент серотипирования недостаточно для выявления эпидемиологически значимых штаммов и генотипов [11].

Классификация с использованием молекулярно-генетических методов, таких как ПЦР и секвенирование, является достойной альтернативой классификации на основании серотипирования. Таксономическая классификация необходима для отслеживания эволюционных связей между видами. Род *Leptospira* характеризуется открытым пангеномом и высокой способностью к горизонтальному переносу генов, то есть свободноживущие лептоспирь могут преобразовываться в патогенные виды и инфицировать людей и животных. Открытие новых и изучение генетики известных патогенных и промежуточных штаммов позволит улучшить диагностику, профилактику и контроль за лептоспирозной инфекцией [10].

Полногеномное секвенирование является полезным инструментом для классификации бактерий и может расширить понимание видоспецифичных характеристик штаммов, в зависимости от резервуарного хозяина, отследить эволюцию видов лептоспир [12]. Использование полногеномного анализа в качестве рутинной методики крайне ограничено высокой стоимостью приборов и реагентов, и необходимостью в высококвалифицированном персонале. Полногеномный анализ возможен исключительно из культивированных штаммов, что связано с необходимостью высокой концентрации образца и его чистоты от сторонних примесей. Культивирование лептоспир, сложный и иногда невыполнимый процесс, чаще всего связанный с прихотливостью данного микроорганизма. Помимо специальных питательных сред, и длительного времени инкубации, успех культивирования зависит от правильно собранного клинического материала [13]. Использование метода секвенирования по Сэнгеру представляется более доступным способом

молекулярно-генетического типирования.

В течение долгого времени для изучения видового разнообразия лептоспир использовали методику секвенирования последовательности фрагмента гена 16S рРНК. В настоящее время существует большое количество исследований, сообщающих о его низкой дискриминационной способности различать виды внутри клад, по причине его высокой консервативности [15, 16].

Описан целый ряд других генетических маркёров, используемых для выявления и генотипирования лептоспир. К ним относят фрагменты генов *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligB*, *secY*, *gyrB* и др. Отсутствие стандартного протокола приводит к тому, что исследователи используют разные генетические мишени, и сравнивать результаты затруднительно [14]. Исследование нескольких генов-мишеней позволит избежать дискриминационных ограничений, и поможет повысить актуальность

разработки новых диагностических инструментов [17].

Цель работы - оптимизация способа детекции и генотипирования патогенных лептоспир.

Материал и методы. Использованы образцы почек, изъятых из 190 особей диких и синантропных мелких млекопитающих (желтогорлые мыши - *Apodemus flavicollis*, рыжие полевки - *Myodes glareolus*, серые крысы - *Rattus norvegicus*).

Геномную ДНК получали с использованием набора «Рибопреп» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), согласно инструкции производителя.

Выявление и генотипирование патогенных лептоспир в образцах проведено с использованием олигонуклеотидов на основе классической ПЦР, с регистрацией результатов посредством электрофоретической детекции и последующим секвенированием по Сэнгеру (табл. 1).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для выявления и генотипирования патогенных лептоспир

Праймер	Нуклеотидная последовательность
Lept_1900f	5'- CCTCATGGGTTCCAACATGCA - 3'
Lept_2500R	5'- CGCATCCTCRAAGTTGTAWCCTT - 3'
SecY-F1	5'- ATGCCGATCATTTTGCTTC - 3'
SecY_IVR	5'- GAGTTAGAGCTCAAATCTAAG - 3'
Lipl32_F5	5'- CTAAGTTCATACCGTGATT - 3'
Lipl32R	5'- TGGGAAAAGCAGACCAACAGA - 3'

Состав амплификационной смеси представляет собой буферный раствор, содержащий Трис HCl (рН 8,8), сульфат аммония, MgCl₂; ЭДТА; меркаптоэтанол; БСА; dNTP; Тақ ДНК-полимеразу [15].

На первом этапе ПЦР проводили выявление положительных образцов с использованием прямого

и обратного праймеров *lipL32* (см. табл. 1) при указанных параметрах амплификации (табл. 2).

На следующем этапе из ДНК образцов, позитивных по *lipL32*, амплифицировали фрагменты генов *secY* и *rpoB* с использованием соответствующих праймеров SecY и Lept_(см. табл. 1).

Таблица 2

Параметры программ амплификации на программируемом термостате «Терцик»

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
<i>lipL32</i>			
1	95	5 мин	1
2	95	15 с	50
	60	20 с	
	72	30 с	
	72	5 мин	
3	72		1
<i>secY</i>			
1	95	5 мин	1
2	95	15 с	40
	56	20 с	
	72	40 с	
	72	5 мин	
3	72		1
<i>rpoB</i>			
1	95	5 мин	1
2	95	15 с	35
	63	20 с	
	72	40 с	
	72	5 мин	
3	72		1

Продукты амплификации визуализировали в 1,5% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием в сравнении с маркёром молекулярного веса. Электрофорез проводили при 150 В в течение 20 мин и визуализировали под ультрафиолетом.

Результаты интерпретировали на основании наличия или отсутствия фрагмента искомого размера в сравнении с коммерческим набором фрагментов ДНК известной длины. Результат амплификации считали положительным, если при использовании праймеров

lipL32, образуется фрагмент длиной 742 нуклеотида, праймеров *secY* фрагмент длиной 400 нуклеотидов, праймеров *rpoB* фрагмент длиной 600 нуклеотидов.

Секвенирующую реакцию проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили в генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems).

Полученные последовательности штаммов сравнивали с последовательностями, доступными в ба-

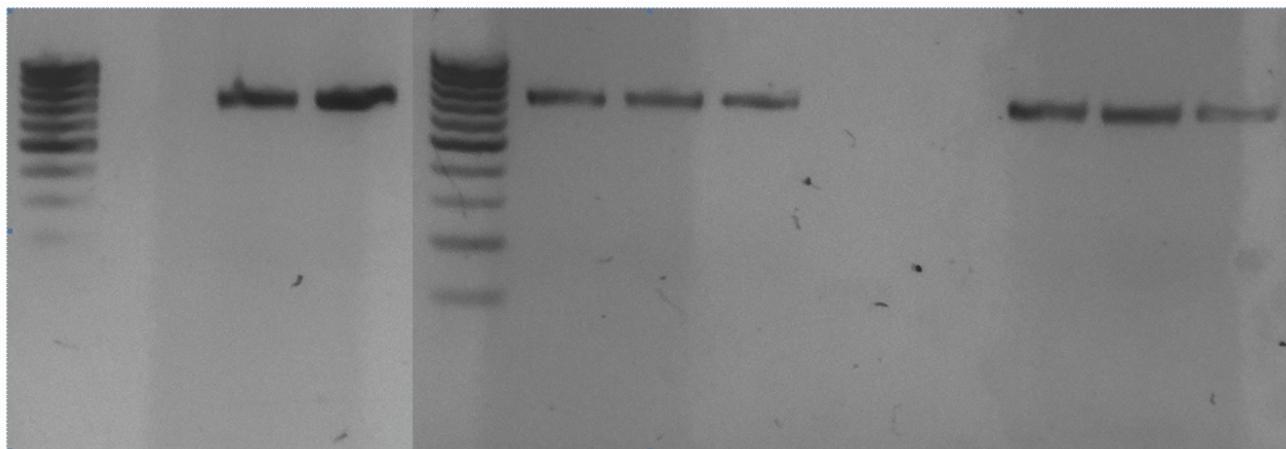


Рис. 1. Электрофорограмма положительных образцов по фрагменту гена *lipL32*.

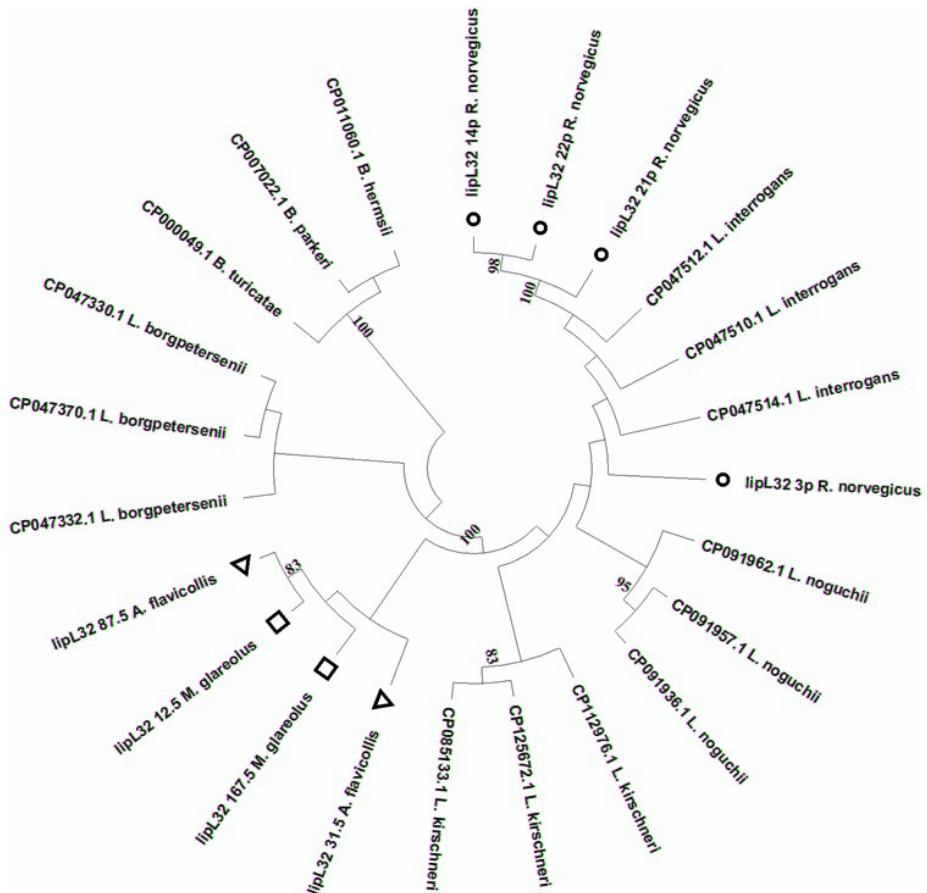


Рис. 2. Филогенетический анализ полученных последовательностей фрагмента гена *lipL32* в сравнении с последовательностями, полученными из GenBank. Внешней группой выбраны последовательности *Borrelia* spp. В зависимости от видовой принадлежности грызуна установлены маркёры, круг - серая крыса, треугольник - желтогорлая мышь, квадрат - жёлтая полёвка.

зе данных GenBank с помощью NCBI Blast. Оценка коэффициента расхождения нуклеотидных последовательностей проводилась в UGENE по алгоритму ClustalW. Построение филогенетических деревьев проводилось в MEGA 11 с использованием метода Maximum Likelihood, бустреп 1000. 24 полученные нуклеотидные последовательности, депонированы в международную базу данных GenBank, под номерами OR917411-OR917434.

Результаты и обсуждение. Оптимизирован способ выявления и генотипирования патогенных лептоспир в биологическом материале на основе классической ПЦР с регистрацией результатов посредством электрофоретической детекции и последующим секвенированием по Сэнгеру.

Согласно разработанному способу, выявление ДНК патогенных лептоспир проводилось с использованием праймеров (см. табл. 1), подобранных для фрагмента гена *lipL32*. Данный ген выбран благодаря его широкому использованию для диагностики лептоспироза из различного биологического материала [14]. Из 190 исследованных образцов, у 8 зафиксировано наличие искомого фрагмента длиной 742 нуклеотида (рис. 1).

С целью исключения ложноположительного результата, данные образцы секвенированы. Полученные последовательности сравнивали с референсными последовательностями, представленными в базе данных GenBank с использованием алгоритма BLASTn. По результатам анализа все исследуемые последова-

<i>CP047514.1 Leptospira interrogans</i>	0%
<i>CP047512.1 Leptospira interrogans</i>	0%
<i>CP047510.1 Leptospira interrogans</i>	0%
<i>lipL32 21p Rattus norvegicus</i>	2%
<i>lipL32 14p Rattus norvegicus</i>	2%
<i>lipL32 3p Rattus norvegicus</i>	0%
<i>lipL32 22p Rattus norvegicus</i>	2%
<i>CP047332.1: Leptospira borgpetersenii</i>	4%
<i>CP047370.1 Leptospira borgpetersenii</i>	5%
<i>CP047330.1 Leptospira borgpetersenii</i>	5%
<i>lipL32 31.5 Apodemus flavicollis</i>	4%
<i>lipL32 167.5 Myodes glareolus</i>	5%
<i>lipL32 87.5 Apodemus flavicollis</i>	5%
<i>lipL32 12.5 Myodes glareolus</i>	6%
<i>CP125672.1 Leptospira kirschneri</i>	1%
<i>CP085133.1 Leptospira kirschneri</i>	1%
<i>CP112976.1 Leptospira kirschneri</i>	1%
<i>CP091962.1 Leptospira noguchi</i>	1%
<i>CP091957.1 Leptospira noguchi</i>	1%
<i>CP091936.1 Leptospira noguchi</i>	1%

Рис. 3. Коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей основных видов патогенных лептоспир по фрагменту гена *lipL32*.

тельности отнесены к *Leptospira* spp. (рис. 2).

Использование данного гена для генотипирования патогенных лептоспир малоэффективно, так как коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей слишком низок (от 1% у видов *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchi*) (рис. 3).

Для дальнейшего генотипирования выбраны наиболее значимые, на наш взгляд, гены *secY* и *rpoB*. Данные гены успешно использованы в генотипических целях в различных исследованиях, и показали высокую дискриминационную способность [14, 16].

Положительные образцы, в количестве 8 штук, амплифицировали с двумя парами праймеров (см. табл. 1), подобранных для фрагментов генов *secY* и *rpoB*, визуализация результатов проведена с использованием электрофоретической детекции (рис. 4).

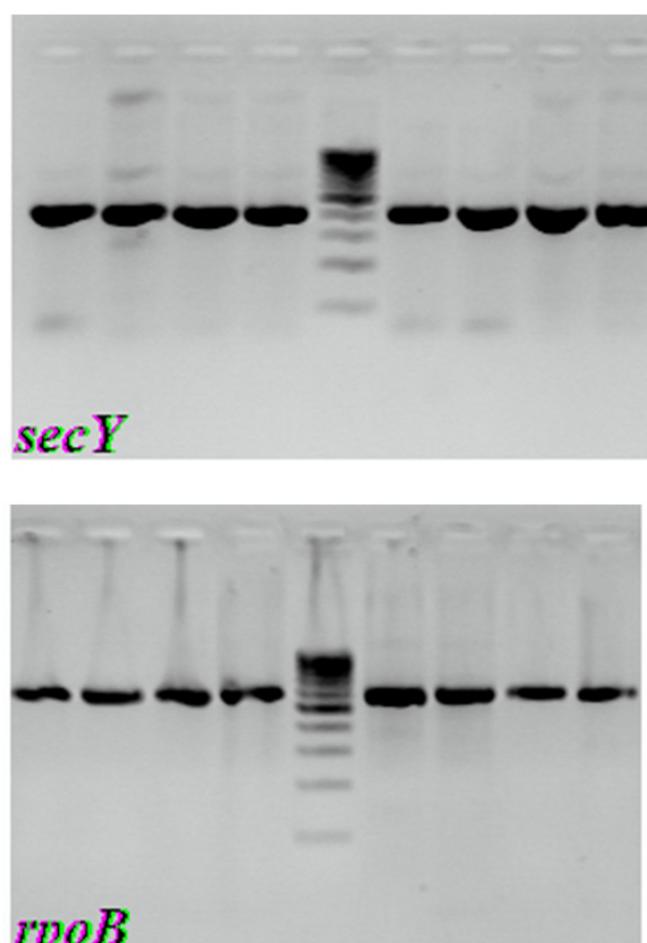


Рис. 4. Электрофорограмма в агарозном геле с продуктами амплификации по генам *secY* и *rpoB*.

По результатам филогенетического анализа полученных после секвенирования последовательностей по фрагментам генов *secY* и *rpoB*, с последовательностями, загруженными в GenBank, установлено, что искомые последовательности, полученные от серых крыс, имеют сходство с последовательностями, относящимися к виду *L. interrogans*, последовательности от рыжих полёвок и жёлтогорлых мышей к *L. borgpetersenii* (рис. 5, а, б).

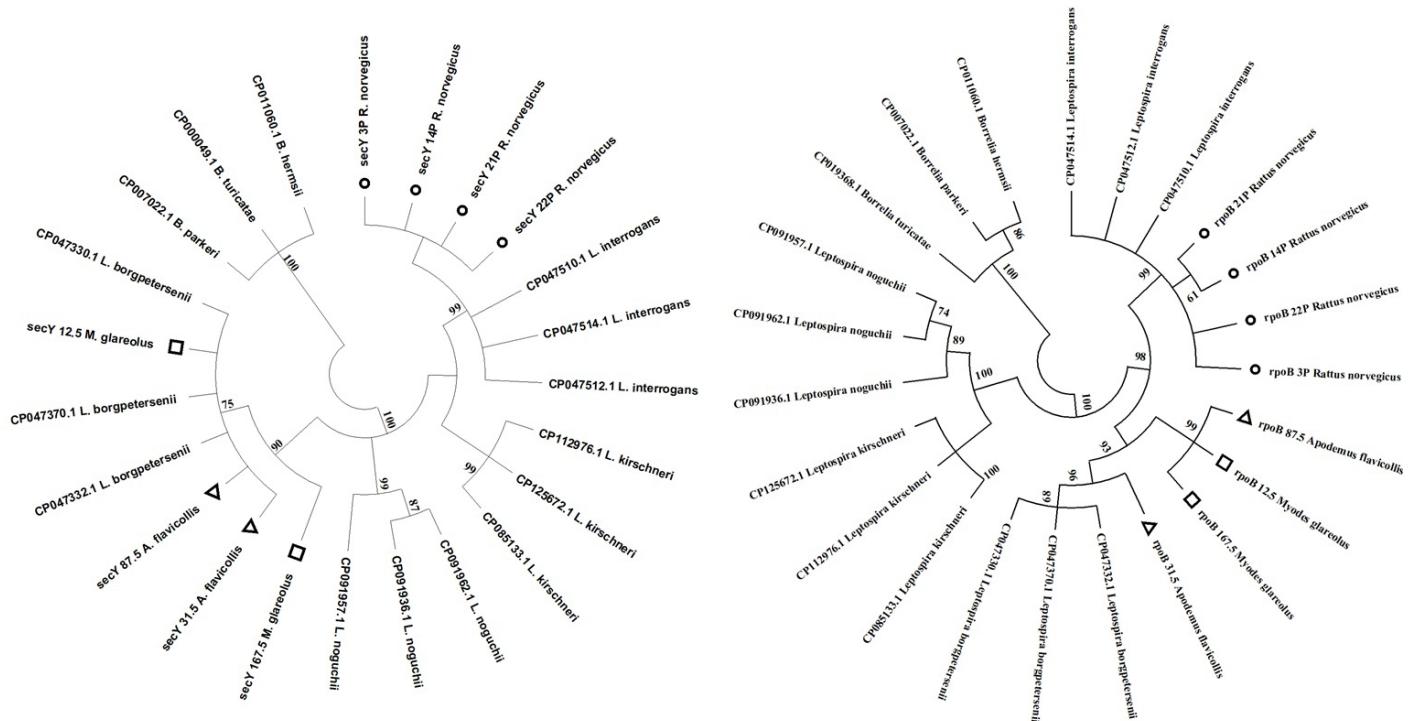


Рис. 5. Филогенетический анализ полученных последовательностей фрагментов гена *secY* (а) и *rpoB* (б) в сравнении с последовательностями, полученными из GenBank. Внешней группой выбраны последовательности *Borrelia* spp. В зависимости от видовой принадлежности грызуна установлены маркёры, круг – серая крыса, треугольник – ёлтогорлая мышь, квадрат – ёлтая полёвка.

Анализ выравнивания последовательностей показал коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей между основными патоген-

ными видами лептоспир по фрагменту гена *secY* от 9% до 18%, по фрагменту гена *rpoB* от 9% до 63% (рис. 6).

<i>secY</i>		<i>rpoB</i>	
<i>CP047514.1 Leptospira interrogans</i>	0%	<i>CP047514.1 Leptospira interrogans</i>	0%
<i>CP047512.1 Leptospira interrogans</i>	0%	<i>CP047512.1 Leptospira interrogans</i>	0%
<i>CP047510.1 Leptospira interrogans</i>	0%	<i>CP047510.1 Leptospira interrogans</i>	0%
<i>secY 21P Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB 21P Rattus norvegicus</i>	0%
<i>secY 14P Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB 14P Rattus norvegicus</i>	0%
<i>secY 3P Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB 3P Rattus norvegicus</i>	0%
<i>secY 22P Rattus norvegicus</i>	0%	<i>rpoB 22P Rattus norvegicus</i>	0%
<i>CP047332.1 Leptospira borgpetersenii</i>	18%	<i>rpoB 87.5 Apodemus flavicollis</i>	9%
<i>CP047370.1 Leptospira borgpetersenii</i>	18%	<i>rpoB 12.5 Myodes glareolus</i>	9%
<i>CP047330.1 Leptospira borgpetersenii</i>	18%	<i>rpoB 16.5 Myodes glareolus</i>	9%
<i>secY 31.5 Apodemus flavicollis</i>	18%	<i>rpoB 31.5 Apodemus flavicollis</i>	9%
<i>secY 167.5 Myodes glareolus</i>	19%		
<i>secY 87.5 Apodemus flavicollis</i>	18%		
<i>secY 12.5 Myodes glareolus</i>	18%		
<i>CP125672.1 Leptospira kirschneri</i>	9%		
<i>CP085133.1 Leptospira kirschneri</i>	9%		
<i>CP112976.1 Leptospira kirschneri</i>	9%		
<i>CP091962.1 Leptospira noguchii</i>	11%		
<i>CP091957.1 Leptospira noguchii</i>	12%		
<i>CP091936.1 Leptospira noguchii</i>	11%		

Рис. 6. Коэффициент расхождения нуклеотидных последовательностей основных видов патогенных лептоспир по фрагментам генов *secY* и *rpoB*. Последовательности, полученные в рамках настоящего исследования, выделены полужирным шрифтом.

Фрагмент гена *secY* является перспективной мишенью для генотипирования лептоспир, так как он имеет достаточный уровень дискриминационной способности. В исследовании 2008 года B. Victoria и соавт. [18] описали анализ локуса *S10-spc-a*, и в заключении отметили, что фрагмент гена *secY*, обеспечивает надежную идентификацию видов патогенных лептоспир. В 2020 году L. Grillová и соавт. [19] описали молекулярно-эпидемиологическое исследование, с использованием вложенной ПЦР нацеленной на локус *secY*. Результатом данного исследования была идентификация 20 генотипов *Leptospira*, циркулирующих как у людей, так и у животных [19]. L.D.S Medeiros и соавт. [20] в 2020 году опубликовали данные исследования мелких млекопитающих в лесах бразильской Западной Амазонки, видовая идентификация образцов проводилась с использованием генетического маркера *secY*.

Полученные нами результаты совпадают с данными других исследователей, использование данного гена в генотипических целях эффективно для широкого спектра исследуемого материала [21-23]. В международной базе данных GenBank представлено более четырех тысяч последовательностей гена *secY*, протяженностью от 200 до 4000 нуклеотидов, что облегчает сравнение и быструю идентификацию лептоспир.

Фрагмент гена *groB* для генотипирования используют реже, в GenBank загружено около 800 последовательностей, протяженностью от 560 до 3500 нуклеотидов. Однако высокий уровень различий между основными патогенными видами лептоспир по указанному региону генома открывает перспективы для его использования.

Анализ двух мишеней в целях генотипирования снижает риски ошибочной интерпретации полученных результатов.

Нуклеотидные последовательности, полученные при секвенировании фрагмента гена *lipL32*, показали низкую степень расхождения между основными патогенными видами лептоспир. Данная мишень, по нашему мнению, совпадающему с выводами некоторых исследователей, может использоваться в диагностических целях как инструмент скрининга [24].

Заключение. Оптимизированный способ детекции и генотипирования патогенных лептоспир в биологических образцах на основе классической ПЦР с использованием трех пар праймеров позволяет идентифицировать различные геномовиды лептоспир. Результаты нашего исследования свидетельствуют об эффективности разработанного способа для определения генотипов лептоспир, циркулирующих в популяциях диких и синантропных мелких млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1, 3, 5-21, СМ. REFERENCES)

2. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Ваганова А.Н. Лептоспирозы: пособие для врачей. СПб: НИИЭМ им. Пастера; 2010.
 4. Транквилевский Д.В., Киселева Е.Ю., Корзун В.М., Бренёва Н.В., Вержуцкая Ю.А., Зарва И.Д. и др. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по лептоспирозам в Российской Федерации в период с 2013 по 2022 г. и прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; (3): 43-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-43-50.
 15. Баймова Р.Р., Остапкова Ю.В., Блинова О.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Молекулярно-генетическая характеристика коллекций онных штаммов LEPTOSPIRA spp. Санкт-Петербургского института Пастера на основе данных секвенирования гена 16S рРНК. *Инфекция и иммунитет*. 2023; (6): 1040-8. DOI: 10.15789/2220-7619-MAG-17028.
-
- #### REFERENCES
1. Her R., Crespin L., Etougbehé J., Groud K., Gnolofoun M., Chapron A. et al. Seroprevalence and renal carriage of pathogenic *Leptospira* in livestock in Cotonou, Benin. *Veterinary medicine and science*. 2024; 10(3): e1430. DOI: 10.1002/vms3.1430.
 2. Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Vaganova A.N. *Leptospirosis: a manual for doctors*. St. Petersburg: NIIEM im. Pastera; 2010. (in Russian)
 3. Pinto G.V., Senthilkumar K., Rai P., Kabekkodu S.P., Karunasagar I., Kumar B.K. Current methods for the diagnosis of leptospirosis: Issues and challenges. *Journal of microbiological methods*. 2022; 195: 106438. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106438.
 4. Trankvilevsky D.V., Kiseleva E.Yu., Korzun V.M., Breneva N.V., Verzhutskaya Yu.A., Zarva I.D. et al. Epizootiological and epidemiological situation on leptospirosis in the Russian Federation over the period of 2013–2022 and the forecast for 2023. *Problemy osobopasnykh infektsiy*. 2023; (3): 43-50. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-43-50. (in Russian)
 5. Alexopoulou C., Proklos A., Kokkinis S., Raissaki M., Konstantinou I., Kondili E. A fatal case of presumptive diagnosis of Leptospirosis involving the Central Nervous System. *Healthcare (Basel)*. 2024; 12(5): 568. DOI: 10.3390/healthcare12050568.
 6. Verma V., Goyal M., Kala D., Gupta S., Kumar D., Kaushal A. Recent advances in the diagnosis of leptospirosis. *Frontiers in bioscience (Landmark ed.)*. 2020; 25(9): 1655-81. DOI: 10.2741/4872.
 7. Levett P.N. Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*. 2001; 14(2): 296-326. DOI: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
 8. Ca Ferreira L., de Fa Ferreira Filho L., V Cosate M.R., Sakamoto T. Genetic structure and diversity of the *rfb* locus of pathogenic species of the genus *Leptospira*. *Life science alliance*. 2024; 7(6): e202302478. DOI: 10.26508/lsa.202302478.
 9. Sohm C., Willixhofer D., Fasching E., Waldner K., Deitzer N., Steiner J. et al. First isolation and genotyping of pathogenic *Leptospira* spp. from Austria. *Scientific reports*. 2024; 14(1): 4467. DOI: 10.1038/s41598-024-53775-w.
 10. Vincent A.T., Schiettekatte O., Goarant C., Neela V. K., Bernet E., Thibeaux R. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019; 13(5): e0007270. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007270.
 11. Bourhy P., Herrmann Storck C., Theodose R., Olive C., Nicolas M., Hochedez P. et al. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013; 7(3): e2114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002114.
 12. Kakita T., Kuba Y., Kyan H., Okano S., Morita M., Koizumi N. Molecular and serological epidemiology of *Leptospira* infection in cats in Okinawa Island, Japan. *Scientific reports*. 2021; 11(1): 10365. DOI: 10.1038/s41598-021-89872-3.
 13. Ružić-Sabljić E., Podgoršek D., Strašek Smrdel K., Celar Šturm, A., Logar M., Pavlović A. et al. First report on *Leptospira* species isolated from patients in Slovenia. *Microorganisms*. 2023; 11(11): 2739. DOI: 10.3390/microorganisms11112739.
 14. Di Azevedo M.I.N., Lilienbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in applied microbiology*. 2021; 72(5): 496-508. DOI: 10.1111/lam.13442.
 15. Baimova R.R., Ostapkova Yu.V., Blinova O.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K. Molecular and genetic characterization of LEPTOSPIRA spp. collection strains from the St. Petersburg Pasteur institute based on 16S rRNA gene sequencing data. *Infektsiya i imunitet*. 2023; 13: 6. DOI: 10.15789/2220-7619-MAG-17028. (in Russian)
 16. Guernier V., Allan K.J., Goarant C. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. *Parasitology*. 2018; 145(5): 595-607. DOI: 10.1017/S0031182017001147.
 17. Thibeaux R., Girault D., Bierque E., Soupé-Gilbert M.E., Rettlinger A., Douyère A. et al. Biodiversity of environmental *Leptospira*: improving identification and revisiting the diagnosis. *Frontiers in microbiology*. 2018; 9: 816. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00816.
 18. Victoria B., Ahmed A., Zuerner R. L., Ahmed N., Bulach D. M.,

- Quinteiro J., et.al. Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS One*. 2008; 3(7): e2752. DOI: 10.1371/journal.pone.0002752.
19. Grillová L., Angermeier H., Levy M., Giard M., Lastère S., Picardeau M. Circulating genotypes of *Leptospira* in French Polynesia: an 9-year molecular epidemiology surveillance follow-up study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2020; 14(9): e0008662. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008662.
20. Medeiros L.D.S., Braga Domingos S.C., Azevedo M.I.N.D., Periquetti R.C., de Albuquerque N.F., D'Andrea P.S. et. al. Small mammals as carriershosts of *Leptospira* spp. in the Western Amazon forest. *Frontiers in veterinary science*. 2020; 7: 569004. DOI: 10.3389/fvets.2020.569004.
21. Ma X. J., Gong X. Q., Xiao X., Liu J. W., Han H. J., Qin X. R. et al. Detection of *Leptospira* interrogans in hedgehogs from Central China. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 2020; 20(6): 427-31. DOI: 10.1089/vbz.2019.2544.
22. Chaiwattanarunguengpaisan S., Thepapichaikul W., Paungpin W., Ketchim K., Suwanpakdee S., Thongdee M. Potentially pathogenic *Leptospira* in the environment of an elephant camp in Thailand. *Tropical medicine and infectious disease*. 2020; 5(4): 183. DOI: 10.3390/tropicalmed5040183.
23. Guernier V., Richard V., Nhan T., Rouault E., Tessier A., Musso D. *Leptospira* diversity in animals and humans in Tahiti, French Polynesia. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017; 11(6): e0005676. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005676.
24. Di Azevedo M.I.N., Lilenbaum W. An overview on the molecular diagnosis of animal leptospirosis. *Letters in Applied Microbiology*. 2021; 72(5): 496-508. DOI: 10.1111/lam.13442.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЧЕТОВ А.Г., ИВОЙЛОВ О.О., 2025

Кочетов А.Г.^{1,2}, Ивойлов О.О.^{1,3}



<https://elibrary.ru/nhlvba>

АРХАИЧНОЕ В СОВРЕМЕННОСТИ: ЧТО РЕГУЛИРУЕТ В РОССИИ ПРИКАЗ МИНЗДРАВА О ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ?

¹АНО ДПО «Институт лабораторной медицины», 117042, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

³ООО НПФ «Хеликс», 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Анализируется нормативно-правовое регулирование в сфере лабораторной диагностики в здравоохранении России, с акцентом на приказ Министерства здравоохранения от 18 мая 2021 года № 464н о правилах проведения лабораторных исследований. Подчёркивается важность законодательства для обеспечения качества и безопасности медицинской помощи, защиты данных и лицензирования медицинских организаций. Несмотря на наличие специфических требований к качеству и безопасности проведения лабораторных исследований, российское законодательство сталкивается с проблемами избыточного регулирования и недостаточной конкретизации в данной сфере деятельности. Историческое развитие нормативной базы, начиная с приказа № 380 конца 90-х годов, показало неэффективность единых актов, регулирующих разнообразные аспекты лабораторной диагностики.

Анализ функциональности приказа № 464н выявляет проблемы, связанные с непоследовательностью и избыточностью регулирования, отсутствием обоснований для выбора оборудования и процедур, что может указывать на бюрократизацию и возможный конфликт интересов. Данный приказ не способствует унификации и стандартизации процессов лабораторной диагностики и не обеспечивает надежность и точность результатов исследований. Вместо этого он может быть инструментом формализации для неопытных специалистов органов контроля, не добавляя существенной ценности к существующим стандартам. Усилия по созданию комплексного и эффективного нормативного акта привели лишь к бюрократическому регулированию ради регулирования, что отвлекает внимание от более значимых задач и целей по обеспечению качества и безопасности лабораторных исследований в здравоохранении.

Ключевые слова: приказ 464н; Минздрав России; правила; лабораторные исследования; лаборатория

Для цитирования: Кочетов А.Г., Ивойлов О.О. Архаичное в современности: что регулирует в России приказ Минздрава о лабораторных исследованиях. Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70 (3): 218-224.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-218-224>

EDN: NNLVBA

Для корреспонденции: Кочетов Анатолий Глебович, д-р мед. наук, проф., ректор АНО ДПО «Институт лабораторной медицины», проф. каф. фармакологии Института фармации и медицинской химии РНИМУ им. Н.И. Пирогова; e-mail: ag_kochetov@dpo-ilm.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.01.2025

Принята к печати 07.02.2025

Опубликовано 25.02.2025

Kochetov A.G.^{1,2}, Ivojlov O.O.^{1,3}

ARCHAIC IN MODERNITY: WHAT THE RUSSIAN MINISTRY OF HEALTH'S ORDER ON LABORATORY RESEARCH REGULATES?

¹Institute of Laboratory Medicine, 117042, Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), 117977, Moscow, Russia;

³Helix Co, 197022, St. Petersburg, Russia

The article analyzes the regulatory framework in the field of laboratory diagnostics in Russian healthcare, with a focus on the Ministry of Health order №. 464n dated May 18, 2021, concerning the rules for conducting laboratory tests. It emphasizes the importance of legislation in ensuring the quality and safety of medical care, data protection, and the licensing of medical organizations. However, despite the existence of specific requirements for the quality and safety of laboratory testing, Russian legislation faces issues of excessive regulation and insufficient specificity in this field. The historical development of the regulatory framework, starting with Order No. 380 from the late 1990s, has shown the inefficacy of single acts governing the diverse aspects of laboratory diagnostics. The analysis of the functionality of Order №. 464n reveals issues related to inconsistency and excessive regulation, a lack of justification for the selection of equipment and procedures, which may indicate bureaucratization and potential conflicts of interest. This order does not facilitate the unification and standardization of laboratory diagnostic processes and does not ensure the reliability and accuracy of test results. Instead, it may serve as a tool of formalization for inexperienced regulatory specialists, without adding significant value

to existing standards. Efforts to create a comprehensive and effective regulatory act have only resulted in regulation for the sake of regulation, distracting from more significant tasks and goals of ensuring the quality and safety of laboratory testing in healthcare.

Key words: order 464; Ministry of Health of Russia; rules; laboratory research; laboratory

For citation: Kochetov A.G., Ivojlov O.O. Archaic in modernity: what the Russian Ministry of Health's Order on Laboratory Research Regulates? *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2025; 70 (3): 218-224 (in Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-3-218-224>

EDN: NNLVBA

For correspondence: Kochetov Anatoly Glebovich, MD, PhD, Professor, Rector of ANO DPO «Institute of Laboratory Medicine», Professor of the Department of Pharmacology at the Institute of Pharmacy and Medicinal Chemistry, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov; e-mail: ag_kochetov@dpo-ilm.ru

Information about authors:

Kochetov A.G., <https://orcid.org/0000-0003-3632-291X>;

Ivojlov O.O., <https://orcid.org/0000-0002-4684-8440>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 06.01.2025

Accepted 07.02.2025

Published 25.02.2025

Введение. Нормативно-правовое регулирование в сфере лабораторной диагностики в здравоохранении во всём мире играет важнейшую роль в обеспечении качества и безопасности оказания медицинской помощи [1]. Российское законодательство включает аспекты защиты данных и конфиденциальности, что критически важно для соблюдения прав пациентов на неприкосновенность личной информации, определяет правила лицензирования и аккредитации медицинских организаций, в том числе лабораторных подразделений, с целью контроля рынка лабораторных услуг и его защиты от недобросовестных участников [2]. Помимо этого, необходимо наличие специфических требований к лабораторной диагностике в здравоохранении. Во-первых, они должны обеспечивать стандарты качества и безопасности лабораторных исследований, включая контроль за методиками исследований, оборудованием и квалификацией персонала, что напрямую влияет на точность и надежность результатов анализов. Во-вторых, чётко определять нормы и правила, помогающие снизить вероятность ошибок в лабораторной диагностике, что важно для обеспечения безопасности пациентов и предотвращения неправильной диагностики или лечения. Регулирование должно способствовать унификации лабораторных процессов, позволяя проводить сравнение и обмен данными между различными учреждениями на национальном и международном уровнях. Законодательная база должна стимулировать внедрение новых технологий и методов диагностики, обеспечивая при этом их безопасность и эффективность [1]. Регулирование помогает обеспечивать соблюдение этических норм и стандартов в проведении лабораторных исследований, особенно в отношении клинических испытаний и исследований с использованием биоматериалов человека [3]. Нормативно-правовое регулирование в сфере лабораторной диагностики является фундаментом для поддержания высокого уровня медицинских услуг, безопасности и прав пациентов, и должно способствовать развитию и инновациям в здравоохранении.

За прошедшую четверть века государственное регулирование в области клинической лабораторной диагностики шло извилистым путем, принимая край-

ние формы нормотворчества. Конец 90-х годов ознаменован появлением «великого и могучего» приказа Минздрава РФ № 380¹, который явился попыткой объять необъятное и одним нормативным актом отрегулировать едва ли не все аспекты деятельности клинико-диагностических лабораторий. При всем качестве исполнения и значимости этого документа, он опоздал к началу бума развития лабораторных технологий, поставившему крест на значительной части его положений уже через несколько лет после публикации. Следующей серией документов стали стандарты, разработанные в нулевые годы и регулирующие отдельные, узкие задачи: аналитическое качество, преаналитику и постаналитику. Часть из них в значительной степени дублировала друг друга, допуская разнотечения в справочной информации^{2,3}, что, возможно, связано с разными исполнителями и отсутствием системного регулирования. Более новые ГОСТы⁴ имели меньшую юридическую силу, чем более старые стандарты, вве-

¹Приказ Минздрава РФ от 25.12.1997 № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». <https://base.garant.ru/4173965/>.

²Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53022.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность)» (утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. № 555-ст) <https://base.garant.ru/70218416/>.

³Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53133.1-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения анализаторов в клинико-диагностических лабораториях» (утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации от 25 декабря 2008 г. № 663-ст) <https://base.garant.ru/57969742/>.

⁴Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53133.2-2008 «Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов» (утв. и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации от 18 декабря 2008 г. № 559-ст) <https://base.garant.ru/57969744/>.

денные в действие приказами Минздрава⁵. Многие из этих документов оказались удачными, конкретными, транслировали в отечественную практику мировой опыт и до сих пор активно используются отраслью [4]. Этот период нормотворчества продуктивен, хотя и несколько бессистемен. Следующее десятилетие ознаменовано разработкой и появлением профессиональных стандартов^{6 7 8}. Можно дискутировать об их применимости к реальной ситуации с кадровым обеспечением и подготовке специалистов для медицинских лабораторий в стране, но они представляют собой действительно качественно новые документы, создающие определенный задел на будущее. Параллельно в этот же период в деятельность отечественных лабораторий стал активно «проникать» такой фундаментальный документ, регламентирующий требования к системе менеджмента качества, как ГОСТ 15189, в своих итерациях⁹.

По всей логике, в конце пройденного пути следовало ожидать весомого комплексного нормативного акта, ликвидирующего правовые лакуны, возникшие на фоне стремительной модернизации лабораторий в первые два десятилетия нового века и связанного с этим устареванием приказа № 380. Это, конечно, мог быть новый объемный приказ такого же типа, пытающийся регулировать все, что не было регламентировано ранее, хотя неэффективность такого подхода и следовало бы прогнозировать. Куда более желательным был бы программный документ, обобщающий и закрепляющий то, что было создано ранее (ГОСТы, профессиональные стандарты) и тезисно закладывающий основы для разработки и введения необходимых специализированных нормативных актов в ближайшем будущем. К таковым следовало бы отнести регуляторные документы, касающиеся многих современных аспектов деятельности лабораторий: верификация и валидация методов исследования, рекомендации к выбору лабораторных технологий и объективного планирования оснащения, разработка и перенос референсных интервалов и пороговых значений, трудовое нормирование с разработкой штатного расписания и критериев для сдельной оплаты труда, расчет себестоимости лабораторного исследования и управление ресурсами, основы взаимодействия с субподрядными лабораториями в условиях централизации и специализации

⁵Приказ Минздрава РФ от 26 мая 2003 г. № 220 «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутри лабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов». <https://base.garant.ru/4179445/>.

⁶Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 14 марта 2018 г. № 145н «Об утверждении профессионального стандарта «Специалист в области клинической лабораторной диагностики» <https://base.garant.ru/71913892/>.

⁷Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 31 июля 2020 г. № 473н «Об утверждении профессионального стандарта «Специалист в области лабораторной диагностики со средним медицинским образованием» <https://base.garant.ru/74520068/>

⁸Приказ Министерства труда и социальной защиты РФ от 8 июня 2021 г. № 384н «Об утверждении профессионального стандарта «Специалист в области медицинской микробиологии» <https://base.garant.ru/401459210/>.

⁹Национальный стандарт РФ ГОСТ Р ИСО 15189-2015 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 апреля 2015 г. N 297-ст) <https://base.garant.ru/71286348/>.

профиля деятельности, передача, архивирование, использование и защита медицинской лабораторной информации и многое другое. Вместо всего этого мы получили приказ Министерства здравоохранения от 18 мая 2021 года № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований», который ныне является одним из ключевых нормативных актов, регулирующих порядок проведения лабораторных исследований в медицинской практике. Прошло достаточно времени, более трёх лет, чтобы оценить реальную функциональность приказа, полезность его практического применения.

Анализ функциональности приказа. Само наличие обсуждаемого приказа отражает общую проблему нормативно-правового регулирования в отечественном здравоохранении. Вызвана она попыткой бездумного копирования зарубежного регулирования, что напоминает действия в басне И.А. Крылова мартышки, примерявший на себя очки. За рубежом лицензируются специалисты, аккредитуются организации [5]. Без лицензии специалист не имеет права на медицинскую деятельность, а аккредитация для организации не обязательна, но является решающим преимуществом на рынке оказания медицинской помощи. В России, переняв эти понятия в виде красивых слов, остальное сделали шиворот-навыворот. Лицензирование у нас обязательно для организаций, для специалистов - аккредитация, при этом остаются не урегулированные в правовом отношении возможности аккредитации для организаций^{10, 11, 12}. Всё это повлекло за собой создание множества дополнительных, запутанных и сложно воспроизводимых в реальной практике нормативно-правовых актов, в том числе приказа о правилах проведения лабораторных исследований.

Приказ о правилах проведения лабораторных исследований декларирует стандарты и требования, касающиеся организаций и выполнения лабораторных исследований, включая требования к оснащению и оборудованию лабораторий, квалификационные требования к персоналу, проводящему исследования, порядок проведения различных видов лабораторных исследований, меры обеспечения качества и безопасности в процессе проведения исследований, порядок документирования и хранения результатов исследований. То есть, в качестве альтернативной гипотезы данный приказ должен способствовать унификации и стандартизации процессов лабораторной диагностики, обеспечивая надежность и точность, безопасность и эффективность результатов, что крайне важно для принятия правильных медицинских решений. Но в контексте нулевой гипотезы возникает

¹⁰Постановление Правительства РФ от 1 июня 2021 г. № 852 «О лицензировании медицинской деятельности (за исключением указанной деятельности, осуществляющей медицинскими организациями и другими организациями, входящими в частную систему здравоохранения, на территории инновационного центра «Сколково») и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями) <https://base.garant.ru/400846456/>.

¹¹Приказ Министерства здравоохранения РФ от 28 октября 2022 г. № 709н «Об утверждении Положения об аккредитации специалистов» <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/405742919/>.

¹²Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 декабря 1993 г. № 295н «Об утверждении Положения об аккредитации клинико-диагностических лабораторий» <https://base.garant.ru/4101111/>.

вопрос - так ли это?

В первом же пункте общей части приказа, в первом приложении, используется непонятно откуда взятая классификация по видам лабораторных исследований - одни названы клиническими и перечисляются в первом приложении, другие микробиологическими. Документ, на который бы ссылался приказ о том, какие конкретные исследования относятся к тем или иным видам, не приведён. Хотя существует до сих пор не отменённый приказ Минздрава РФ №64 о номенклатуре лабораторных исследований, в котором лабораторные исследования представлены по разделам (видам) исследований, в том числе и микробиологические исследования¹³. В настоящее время в лабораторных информационных системах активно применяется Федеральный справочник лабораторных исследований, он постоянно актуализируется и дорабатывается в соответствии с практической востребованностью [6].

Технологии лабораторных исследований, перечисленные в приложениях приказа, тоже не обеспечены определениями или ссылками на определения.

Не менее удивительными являются исключения из правил - это генетические исследования, выполняемые в рамках оказания медицинской помощи пациентам с врождёнными и наследственными заболеваниями, и исследования по месту оказания медицинской помощи. По указанным генетическим лабораторным исследованиям уже существует отдельный приказ, а по месту оказания медицинской помощи приказ, видимо, в планах на будущее. Разве к ним какие-то иные требования по надёжности, качеству, безопасности и эффективности? А может быть «не следует множить сущее без необходимости» (Бритва Оккама)? Или же авторы приказов исходят из того, что дублирование повышает надёжность?

Приказ весьма скомканно описывает основные этапы проведения лабораторного исследования. Иные формулировки теряют смысл или читаются неоднозначно. Пройдемся по пунктам.

В пункте 8 указано: «Сбор биоматериала проводится медицинским работником или самим пациентом или иным лицом, осуществляющим уход за пациентом, если это касается естественных выделений пациента, с последующей доставкой к месту выполнения лабораторных исследований в контейнере в соответствии с санитарно-эпидемиологическими нормами и при определенном температурном режиме, в зависимости от места, условий и методов проведения клинических лабораторных исследований». Пункт не позволяет однозначно идентифицировать виды биоматериала и техники его взятия, доступные пациенту или лицу, осуществляющему уход либо требующие медицинского вмешательства, осуществляемого медицинским работником. Что подразумевается под «естественными выделениями»? Непонятно, что является основанием для определения температурного режима, и других требований к внелабораторной преаналитике, отсутствующих, как целостное понятие в данной формулировке. Столь лаконичное описание всего

этапа в одном лишь предложении не просто не создает никакой нормативной основы для его регулирования. Тут уже напрашивается небезызвестное булгаковское: «Кто на ком стоял? Потрудитесь выражать свои мысли яснее».

Пункт 11 сообщает, что «выбор и назначение лабораторного исследования в соответствии с порядками оказания медицинской помощи и с учетом стандартов медицинской помощи». Вопрос назначения лабораторного исследования может трактоваться шире, чем это определено требованиями ОМС. Ограничения его выбора только порядками и стандартами оказания медицинской помощи не учитывают клинические рекомендации, реалии коммерческой медицины и повсеместные факты личного обращения пациента за лабораторной услугой. В последующих положениях этого пункта не содержится упоминание внелабораторной подготовки биоматериала к временному хранению и транспортировке, как-то: центрифугирование, отбор супернатанта, аликовотирование, замораживание образца, выполняемые, в современных тенденциях к централизации исследований, медицинским работником, не имеющим подготовки по лабораторной диагностике, непосредственно в месте взятия - процедурном кабинете.

В пункте 13. указано, что «аналитический этап включает проведение клинических лабораторных исследований с использованием аналитических методик, реагентов и оборудования, имеющих регистрационное удостоверение и разрешенных для применения на территории Российской Федерации». Здесь смешаны разные понятия: медицинские изделия (наборы реагентов, оборудование) и аналитические методики. Очевидно, все медицинские изделия для диагностики *in vitro*, применяемые не только на аналитическом, но и на других этапах, должны иметь регистрационные удостоверения и быть разрешены к применению на территории Российской Федерации. Методика исследования не является регламентируемой, ее выбор для предназначенного использования - зона ответственности лаборатории, согласно ГОСТ ИСО 15189-2015.

В пункте 16 говорится «отчет о результатах клинических лабораторных исследований выдается пациенту, его законному представителю или лечащему врачу или в направившую медицинскую организацию на бланке организации, проводившей исследование, в электронном виде или на бумажном носителе при соблюдении требований законодательства Российской Федерации по защите конфиденциальной информации и персональных данных». Пункт формален и не соответствует реалиям деятельности современной лаборатории. Он требует как более точной идентификации с конкретными законами РФ, в частности 323 ФЗ (ст. 13. Соблюдение врачебной тайны), так и определения многообразия современных аспектов обработки и передачи результатов лабораторных исследований: автоматическое сообщение критических или несоответствующих значений, передача экстренной информации по телефону, мессенджерам, использование обезличенной информации, перенос результатов между ЛИС основной и субподрядной

¹³Приказ Минздрава РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований» <https://base.garant.ru/4176654/>

лабораторий или между ЛИС лаборатории и МИС заказчика.

В пункте 20 сказано «в медицинской организации формируется архив направлений и документированных результатов исследований». Что подразумевается под таким архивом, особенно в том случае, если создание, передача и обработка лабораторного заказа, а равно и всей постаналитической информации происходит в электронном виде, понять сложно.

Но особенного внимания заслуживает определение категорий сложности лабораторных исследований. Понятие таких категорий появилось впервые в профстандартах. Их определение дано, наконец, именно на страницах обсуждаемого нами приказа. Только боязнью авторов перед современной техникой можно объяснить, почему ручные исследования считаются ими проще, чем выполняемые на автоматических анализаторах. Очевидно, что рутинная работа на современном анализаторе является простейшей операторской деятельностью, не требующей, в практическом смысле, какой-либо специальной подготовки, сложных профессиональных навыков, умения приготавливать реактивы и пользоваться общелабораторным оборудованием.

Авторы определения как заклинание повторяют слово «высокотехнологичный», что, по их мнению, вероятно, должно само по себе вселить священный трепет перед сложностью исследования. Но что является таковым в клинической лабораторной диагностике? 323 ФЗ определяет высокотехнологичную медицинскую помощь, но о лабораторных технологиях там нет ни слова.

Само деление на более или менее сложные исследования - архаичное. Пример лежит на поверхности. Самое распространенное лабораторное исследование, общий (клинический) анализ крови (ОАК), выполняется в настоящий момент почти исключительно на автоматических анализаторах и не может быть разделено на отдельные тесты по определяемым аналитам. В своем автоматизированном исполнении ОАК - зона ответственности среднего медицинского персонала лаборатории. В условиях отсутствия патологии результат его может проходить автоматическую валидацию и тут же быть выданным в виде лабораторного отчета. В случае, если результат не может быть валидирован автоматически, он может поступить на рассмотрение врачу, либо, если определены правила, на образец может быть назначено выполнение микроскопии мазка. Это будет происходить лишь в определенном проценте случаев [7]. Если пользоваться определением приказа, часть общего потока ОАК является исследованием 2-й категории сложности, а часть, как правило, меньшая, - 3-й. Может быть более правильным с точки зрения современных реалий было бы говорить уже не о категориях сложности целых исследований, а о категориях сложности выполнения определенных этапов одного и того же исследования? В эту концепцию бы легли и базовые автоматизированные, и морфологические, и различные подтверждающие исследования, и валидация результатов на разном уровне, а на высшем - «формирование клинико-лабораторного заключения». И не потребовалось бы оговорки, присутствующей в

профессиональном стандарте, что средний персонал может выполнять отдельные этапы исследований 3 и 4 категорий сложности, что только запутывает и без того непонятную большинству лабораторных специалистов классификацию.

Приложения о правилах проведения исследований и правилах организации деятельности лаборатории, содержат дублирующие по смыслу требования действующих нормативно-правовых актов к квалификации персонала, в том числе руководящему составу, утвержденным как до, так и после принятия приказа о правилах проведения лабораторных исследований^{14, 15, 16}. Проблемы, связанные с отечественными историческими особенностями кадрового состава лабораторий, не только остались не урегулированными, но и продолжают усугубляться. Значительному количеству биологов и провизоров в лабораториях, занимающих руководящие посты, не воспрепятствовал даже более ранний приказ 2010 года 541н, не разрешавший им занимать должность заведующего лабораторией, и это до сих пор объективно обусловлено особенностями работы в лаборатории и потребностью в кадрах, особенно в малонаселенных регионах страны. Признанием данного факта является оговорка в приказе о разрешении оставаться на должности заведующего лаборатории, если до вступления приказа в действие биолог эту должность уже занимал, разрешение оставаться на должности врача-лаборанта лицам, занявшим данную должность до 1999 года и занимающим её до сих пор. О врачах-бактериологах с биологическим образованием приказ скромно умолчал.

Провизоры, подготовка которых в значительной степени основана на изучении лабораторных технологий, что особенно важно в контексте деятельности химико-токсикологических лабораторий, и многие из которых занимали должность врача клинической лабораторной диагностики, в документе тоже не упомянуты. В последующем приказ 206н о квалификационных требованиях к специалистам с высшим образованием регламентировал для провизора, получившего образование до 2010 года, возможность работы на должности врача клинической лабораторной диагностики, однако приведённые в нём дополнительные требования о необходимости прохождения ординатуры или профессиональной переподготовки данную возможность завуалированно исключили. Обусловлено это тем, что ординатура и профессиональная переподготовка по клинической лабораторной диагностике в 206н приказе

¹⁴Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 июля 2010 г. № 541н «Об утверждении Единого квалификационного справочника должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел «Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения» (с изменениями и дополнениями)» <https://base.garant.ru/12178397/>.

¹⁵Приказ Министерства здравоохранения РФ от 2 мая 2023 г. № 206н «Об утверждении Квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием» <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/406869654/>.

¹⁶Приказ Министерства здравоохранения РФ от 10 февраля 2016 г. № 83н «Об утверждении Квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам со средним медицинским и фармацевтическим образованием» <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71248254/>.

предполагает приём на обучение при наличии одной из специальностей укрупнённых групп специальностей «Клиническая медицина» или «Науки о здоровье и профилактическая медицина», в то время как «Фармация» является отдельной укрупнённой группой специальностей и не указана в приказе 206н в требованиях к дополнительному профессиональному образованию¹⁷.

Эквилибристика с должностями среднего персонала лаборатории - медицинского технолога и медицинского лабораторного техника, продолжила своё существование: приказ о правилах проведения лабораторных исследований так и не представил чёткого понимания их роли и особенностей деятельности.

Штатное расписание лаборатории, особенно клинической, никак не связано в приказе с трудозатратами на выполнение лабораторных исследований. Важнейший вопрос формирования штатного расписания лаборатории, который на практике должен решаться и регламентироваться на основе понимания реальных трудозатрат персонала на выполнение исследований и нормирования труда, представлен совершенно неопределённой фразой «в соответствии с объёмом лабораторных исследований» [8]. При этом отсутствуют не только какие бы то ни было практические подходы к определению трудоемкости исследований, но даже типовые нормы труда.

Распределение клинических лабораторий по уровням вызывает, по крайней мере, недоумение. Что имеется в виду под «мощностью», какими объективными критериями она определяется или измеряется? Что такое крупные и тогда уж, что такое не крупные лаборатории? По микробиологическим исследованиям хотя бы представлено количество проб, но откуда это количество взято, к сожалению, не указано. Это не помешало авторам документа разработать подробные списки оборудования лабораторий (стандарты оснащения) по уровням. Критерии, которые использовались при выборе перечисленного оборудования, не представлены. Стандарты оснащения составлялись, видимо, на основе интуитивного и ситуативного понимания авторов приказа, что на практике создает высокую вероятность ошибок и злоупотреблений.

Судя по всему, авторами приказа осталась совершенно не понятой реальная практика специализации лабораторий по тому или иному профилю, хотя термин этот присутствует в положениях. Очевидно, это путь развития, отличный от централизации и укрупнения обычных клинико-диагностических подразделений с их типовым набором услуг. Даже если исключить генетические исследования, удивительным образом обойденные в рассматриваемом приказе, существуют обособленные лаборатории, выполняющие, например, исключительно хроматографические (химико-токсикологические) тесты или специализирующиеся на

иммунологической диагностике. Если формулировка «специализированные лаборатории» воспринята нами правильно, то их следует относить либо ко 2-му, либо к 3-му уровню мощности, хотя и без понятных критериев такой классификации. Но в первом случае, согласно приведенному перечню, стандартное оснащение таких лабораторий не сможет включать, например, хроматографическое оборудование или проточный цитометр. Так что же тогда понимают авторы приказа под термином «специализированные лаборатории»? На каких «отдельных видах лабораторных исследованиях» они предлагают «специализироваться»: общий анализ мочи или ОАК? И является ли необходимым для лицензирования узкопрофильной хроматографической лаборатории весь тот перечень оборудования, который приведен в таблице для 3-го уровня (только здесь появляется соответствующая лабораторная техника)? Пункт 7 приложения № 2 отвечает на это невнятно: «оснащение лаборатории осуществляется в соответствии со стандартом оснащения клинико-диагностической лаборатории (отдела, отделения), предусмотренным приложением № 4 к Правилам проведения лабораторных исследований, утвержденным настоящим приказом, и с учетом видов проводимых клинических лабораторных исследований и их количества». Так в соответствии или с учетом? ГОСТ 15189-2015, например, понятно и лаконично сообщает, что «лаборатория должна быть обеспечена всеми видами оборудования, необходимыми для выполнения услуг», и только. Приказ обязателен к исполнению, а ГОСТ нет. Что перевесит в формировании парка оборудования лаборатории при ее лицензировании, здравый смысл или формализм?

Исходя из представленного анализа, можно утверждать, что содержание приказа не соответствует его названию и не отвечает современным требованиям к организации лабораторных исследований. Наиболее вероятна нулевая гипотеза: приказ Минздрава России о правилах проведения лабораторных исследований не способствует унификации и стандартизации процессов лабораторной диагностики, не обеспечивает надежность и точность результатов лабораторных исследований. Тогда что же он регулирует, и кто в нем заинтересован? Ответы очевидны: формальное лицензирование и бюрократический аппарат. Обсуждаемым приказом реализована концепция «регулирование ради регулирования»: правила и процедуры созданы и поддерживаются без явной необходимости или пользы, главным образом для соблюдения формальностей [9]. Такая практика приводит к избыточной сложности, неэффективности и созданию дополнительных препятствий для работы организаций и людей, отвлекает внимание и ресурсы от более значимых задач и целей.

Но приказ в его настоящем виде может породить не только законных бенефициаров. Списки оборудования составлены без детального обоснования, в них не уделяется должного внимания индивидуальному подходу или особенностям различных медицинских учреждений. Отсутствие обоснований и критериев выбора оборудования указывает на возможность конфликта интересов [10]. Когда списки оборудования составляются без прозрачных и четких критериев,

¹⁷Приказ Министерства образования и науки РФ от 12 сентября 2013 г. № 1061 «Об утверждении перечней специальностей и направлений подготовки высшего образования» (с изменениями и дополнениями от 24 апреля 2022 года) Приложение № 6. Перечень специальностей высшего образования - подготовки кадров высшей квалификаций по программам ординатуры» <https://base.garant.ru/70480868/7dede6ac8f25beb19ed07c17ed1c62c9/>.

это может создать благоприятные условия для продвижения интересов определенных поставщиков или производителей. Без обоснований сложно оценить, действительно ли выбранное оборудование соответствует потребностям, или же его выбор обусловлен иными мотивами. Это может привести к закупкам, которые не оптимизируют ресурсы и даже приносят вред организациям.

Заключение. Полезность правил проведения лабораторных исследований сомнительна, они не добавляют какой-либо ценности к уже существующим нормативным документам и стандартам. Их основная функция заключается в обеспечении формализации и в упрощении процесса лицензирования некомпетентными специалистами. Однако без достаточной конкретизации такие правила не только не улучшают качество и безопасность лабораторных исследований, но, оставляя слишком много места для интерпретации, способствуют различным несоответствиям в их применении. При этом архаика положений документа по отношению к современным потребностям клинической лабораторной диагностики и отсутствие структурированного представления нужной информации более чем очевидны.

С учётом вышеизложенного, парадоксальным выглядит непосредственное участие в создании документа целой профессиональной лабораторной ассоциации, особенно декларируемая гордость за это [11]. Усилиями Федерации лабораторной медицины и внештатного главного специалиста по клинической лабораторной диагностике Минздрава России создана урезанная пародия на прежний 380-й приказ. Гора, к величайшему сожалению, родила мышь.

ЛИТЕРАТУРА (П.1 СМ. REFERENCES)

- Гарант. Врачебная тайна и цифровизация: как защитить информацию о пациенте [Электронный ресурс]. URL: <https://www.garant.ru/news/1465292/> (дата обращения: 03.02.2025).
- Центр фармакоэкономических исследований. Введение в биомедицинскую этику. Документы, регламентирующие этические нормы проведения биомедицинских исследований с участием человека [Электронный ресурс]. URL: <https://healtheconomics.ru/library/item/vvedenie-v-biomeditsinskuyu-etiku-dokumenty-reglamentiruyushchie-eticheskie-normy-provedeniya-biomeditsinskikh-issledovanij-s-uchastiem-cheloveka> (дата обращения: 03.02.2025).
- Меньшиков В.В. Система национальных стандартов для лабораторной медицины России: итоги 10 лет разработки. *Вестник Росздравнадзора*. 2014; 1: 5-13.
- Коротков Ю., Стульнева Т. О сертификации и лицензировании за рубежом. *Врач*. 1995; 1995; 4: 2-3.
- Федеральный справочник лабораторных исследований. Паспорт справочника: Лабораторные исследования [Электронный ресурс]. URL: <https://nsi.rosminzdrav.ru/dictionaries/1.2.643.5.1.13.13.11.1080/passport/3.40> (дата обращения: 14.02.2025)
- Ивойлов О.О., Кочетов А.Г., Сальникова Ю.П., Велицкая О.А. Трудозатраты персонала автоматизированной медицинской лаборатории на проведение гематологических исследований. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (2): 141-51. DOI: 10.51620/0869-2084-2025-70-2-141-151.
- Ивойлов О.О., Кочетов А.Г. Метод анализа типовой структуры прямых затрат в себестоимости лабораторного теста. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3): 187-92. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-187-192.
- Спиридов В.П. Бюрократия и реформа (анализ концепции М. Кроэзе). [Электронный ресурс]. URL: <https://web.archive.org/web/20130122211547/http://philosophy.ru/iphras/library/spirid.html> (дата обращения: 03.02.2025).
- Федеральный закон от 25.12.2008 N 273-ФЗ (ред. от 08.08.2024) "О противодействии коррупции". Статья 10. Конфликт интересов [Электронный ресурс]. URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_82959/5d02242ebd04c398d2acf7c53dbc79659b85e8f3/ (дата обращения: 03.02.2025).
- Федерация лабораторной медицины. Вышел приказ Минздрава РФ, которого ждали 7 лет [Электронный ресурс]. URL: https://fedlab.ru/nashi-novosti/vyshel-prikaz-minzdrava-rf-kotorogo-zhdali-7-let/?sphrase_id=186034 (дата обращения: 03.02.2025).

REFERENCES

- Rob E. Carpenter. Navigating the new norm: The FDA's final rule on laboratory developed tests (LDTs) and its impact on clinical laboratory operations. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2024; 48:1-8. DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2024.09.001.
- Garant. Doctor-patient confidentiality and digitalization: how to protect patient information [Electronic resource]. URL: <https://www.garant.ru/news/1465292/> (accessed: 02/03/2025). (in Russian)
- Center for Pharmacoeconomic Research. Introduction to biomedical ethics. Documents regulating ethical norms for conducting biomedical research involving humans [Electronic resource]. URL: <https://healtheconomics.ru/library/item/vvedenie-v-biomeditsinskuyu-etiku-dokumenty-reglamentiruyushchie-eticheskie-normy-provedeniya-biomeditsinskikh-issledovanij-s-uchastiem-cheloveka> (accessed: 02/03/2025). (in Russian)
- Men'shikov V.V. The system of national standards for laboratory medicine in Russia: results of 10 years of development. *Vestnik Roszdravnadzora*. 2014; 1: 5-13. (in Russian)
- Korotkov Yu., Stul'neva T. On Certification and Licensing Abroad. *Vrach*. 1995; 1995; 4: 2-3. (in Russian)
- Federal Directory of Laboratory Research. Directory Passport: Laboratory Research [Electronic resource]. URL: <https://nsi.rosminzdrav.ru/dictionaries/1.2.643.5.1.13.13.11.1080/passport/3.40> (accessed: 14.02.2025). (in Russian)
- Ivoylov O.O., Kochetov A.G., Sal'nikova Yu.P., Velitskaya O.A. Labor costs of automated medical laboratory staff for performing hematological tests. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2025; 70 (2): 141-51. DOI: 10.51620/0869-2084-2025-70-2-141-151. (in Russian)
- Ivoylov O.O., Kochetov A.G. Method of analyzing the typical structure of direct costs in the cost of a laboratory test. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(3): 187-92. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-187-192. (in Russian)
- Spiridonov V.P. Bureaucracy and reform (analysis of M. Crozier's concept). [Electronic resource]. URL: <https://web.archive.org/web/20130122211547/http://philosophy.ru/iphras/library/spirid.html> (accessed: 02/03/2025). (in Russian)
- Federal Law of 25.12.2008 N 273-FZ (as amended on 08.08.2024) "On combating corruption". Article 10. Conflict of interest [Electronic resource]. URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_82959/5d02242ebd04c398d2acf7c53dbc79659b85e8f3/ (accessed: 02/03/2025). (in Russian)
- Federation of Laboratory Medicine. The Russian Ministry of Health order that was awaited for 7 years has been issued [Electronic resource]. URL: https://fedlab.ru/nashi-novosti/vyshel-prikaz-minzdrava-rf-kotorogo-zhdali-7-let/?sphrase_id=186034 (accessed: 02/03/2025). (in Russian)