ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

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

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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Том 65

2 • 2020

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ФЕВРАЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес
ОАО «Издательство"Медицина"»
115088, Москва, Новоостаповская ул., д. 5, строение 14

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

Зав. редакцией *Л. А. Шанкина*

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

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 08.01.2020.
Подписано в печать 15.01.2020.
Формат 60 × 88⅛.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

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

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: wwwakc.ru, www-pressa-rf.ru
Подписка на электронную версию: elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика. 2020. № 2. 73–136.

«Издательство"МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

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

KLINICHESKAYA LABORATORNAYA Diagnostika

Volume 65

2 • 2020

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

FEBRUARY

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"
115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

ISSN 0869-2084.

IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Захарова Н. О., Булгакова С. В., Тренева Е. В., Николаева А. В., Романчук П. И., Нестеренко С. А.
Особенности определения и прогностическое значение скорости клубочковой фильтрации у лиц старших возрастных групп с сердечно-сосудистой патологией 77

Минин А.С., Шень Н.П., Панов И.Д., Бем С.А.
Влияние газового состава крови и параметров искусственной вентиляции легких на прогноз медицинской эвакуации пациентов в критическом состоянии 84

ИММУНОЛОГИЯ

Соснина О.Ю., Николаева А.М., Вязникова Т.В., Фельдблюм И.В., Субботина К.А.
Изучение возможности использования иммуноферментной тест-системы для оценки противококлюшного иммунитета 90

Исаева О.В. , Ильченко Л.Ю. , Кичатова В.С., Потемкин И.А. , Амон Е.П., Сарыглар А.А., Аль-Шараби Шукри А.С., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.
Выявление маркеров инфицирования вирусами гепатитов B и D в биологических средах и сухой капле крови 95

Селезнева И. А., Гильмиярова Ф. Н., Бородина И. А., Ерещенко А. А., Гильмияров Э. М., Карташов В. В.
Клинико-молекулярные индикаторы воспалительно-деструктивных поражений полости рта при пародонтите у лиц с различной групповой принадлежностью крови 100

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Сапожкова Ж.Ю., Еремин К.И.
Модификация протокола аналитического этапа спермограммы 106

МИКРОБИОЛОГИЯ

Лямин А.В.
Редкие виды в структуре кислотоустойчивых представителей порядка *Actinomycetales*, выделенных из клинического материала 111

Чеботарь И. В., Бочарова Ю. А., Гурьев А. С., Маянский Н. А.
Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками 116

Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Шемякин И.Г., Шепелин А.П.
Опыт использования ТБ тест-набора для ускоренного определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* 122

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Титов С.Е., Анищенко В.В., Полоз Т.Л., Веряскина Ю.А., Архипова А.А., Устинов С.Н.
Возможности дифференциальной диагностики рака желудка и предраковых изменений слизистой желудка с помощью анализа экспрессии шести микроРНК 131

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Zakharova N.O., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Nikolaeva A.V., Romanchuk P.I., Nesterenko S.A.
Specificity of estimation and prognostic value of glomerular filtration rate in older age groups with cardiovascular pathology 77

Minin A.S., Shen N.P., Panov I.D., Bem S.A.
Influence of the blood gas composition and mechanical ventilation parameters
of the medical evacuation prognosis of critically ill patients 84

IMMUNOLOGY

Sosnina O.Yu., Nikolaeva A.M., Vyaznikova T.V., Feldblum I.V., Subbotina K.A.
Studying the possibility of using immuno-enzy test system for evaluating anti-pertussis immunity 90

Isaeva O.V. , Ilchenko L.Yu. , KichatovaV.S., Potemkin I.A. , Amon E.P. , Saryglar A.A., Al-Sharabi Shukri A.S., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.
Detection of markers of hepatitis B and D virus infection in biological media and dried blood spots 95

Selezneva I.A., Gilmiyarova F.N. , Borodina I.A., Ereshchenko A.A., Gilmiyarov E.M., Kartashov V.V.
Clinic-molecular indicators of inflammatory destructive damage of the oral cavity in periodontitis in persons
with various group accessories of blood 100

GENERAL CLINICAL METHODS

Sapozhkova Zh.Yu., Eremin K.I.
Updates in protocol for human semen examination. 106

MICROBIOLOGY

Lyamin A.V.
Rare species in the structure of acid-resistant members of the order actinomycetales isolated from clinical material 111

Chebotar I. V., Bocharova Yu. A., Gur'ev A. S., Mayansky N. A.
Bacteria survival strategies in contact with antibiotics 116

Domotenko L. V., Morozova T.P., Shemyakin I.G., Shepelin A. P.
Experience of using TB test kit for the rapid drug susceptibility testing of *M. tuberculosis*. 122

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Titov S.E., Anishchenko V.V., Poloz T.L., Veryaskina Yu.A., Arkhipova A.A., Ustinov S.N.
Differential diagnostics of gastric cancer and precancerous changes of the gastric mucosa using analysis
of expression of six microRNAS. 131

БИОХИМИЯ

Захарова Н.О., Булгакова С.В., Тренева Е.В., Николаева А.В., Романчук П.И., Нестеренко С.А.

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СКОРОСТИ КЛУБОЧКОВОЙ ФИЛЬТРАЦИИ У ЛИЦ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

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

Демографическая ситуация в последние десятилетия характеризуется прогрессирующим увеличением доли лиц старших возрастных групп как в развитых странах мира, так и в Российской Федерации. Основной вклад в заболеваемость и смертность людей старше 60 лет вносят болезни системы кровообращения (БСК). Раннему развитию и прогрессированию сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) способствует дисфункция почек, зачастую развивающаяся на фоне происходящих с возрастом морфологических изменений в почках, получивших название «старческой почки». Снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) у пожилых пациентов не является обязательным и в большинстве случаев происходит в результате существующего патологического процесса. Сочетанное влияние изменения СКФ и сердечно-сосудистой патологии на прогноз пациентов старшего возраста остается малоизученным, что определяет актуальность исследования течения хронической болезни почек (ХБП) у гериатрических пациентов.

Ключевые слова: *старение; хроническая болезнь почек; скорость клубочковой фильтрации; креатинин; мочевина; цистатин С.*

Для цитирования: *Захарова Н.О., Булгакова С.В., Тренева Е.В., Николаева А.В., Романчук П.И., Нестеренко С.А. Особенности определения и прогностическое значение скорости клубочковой фильтрации у лиц старших возрастных групп с сердечно-сосудистой патологией. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 77-83. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-77-83*

Zakharova N.O., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Nikolaeva A.V., Romanchuk P.I., Nesterenko S.A.

SPECIFICITY OF ESTIMATION AND PROGNOSTIC VALUE OF GLOMERULAR FILTRATION RATE IN OLDER AGE GROUPS WITH CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

The demographic situation in recent decades has been characterized by a progressive increase in the proportion of older age groups in both developed countries and the Russian Federation. The main contribution to morbidity and mortality of people over 60 years of age is made by diseases of the circulatory system. Early development and progression of cardiovascular diseases contributes to kidney dysfunction, often developing against the background of morphological changes occurring with age in the kidneys, called "senile kidney". Reduction of glomerular filtration rate in elderly patients is not mandatory and in most cases occurs as a result of an existing pathological process. The combined effect of changes in GFR and cardiovascular disease on the prognosis of older patients remains poorly understood, which determines the relevance of the study of chronic kidney disease in geriatric patients.

Key words: *aging; chronic kidney disease; glomerular filtration rate; creatinine; urea; cystatin C.*

For citation: *Zakharova N.O., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Nikolaeva A.V., Romanchuk P.I., Nesterenko S.A. Specificity of estimation and prognostic value of glomerular filtration rate in older age groups with cardiovascular pathology. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 77-83 (in Russ.)
DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-77-83*

For correspondence: *Treneva E.V.,* Ph.D. (Medicine), associate professor of the chair of geriatrics and age-related endocrinology; e-mail: eka1006@yandex.ru

Information about authors:

Zakharova N.O., http://orcid.org/0000-0001-7501-830X
Bulgakova S.V., http://orcid.org/0000-0003-0027-1786
Treneva E.V., http://orcid.org/0000-0003-0097-7252
Nikolaeva A.V., http://orcid.org/0000-0003-5168-5481
Romanchuk P.I.,http://orcid.org/0000-0002-0603-1014
Nesterenko S.A., http://orcid.org/0000-0003-1478-016X

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 15.11.2019
Accepted19.11.2019

Для корреспонденции: *Тренева Екатерина Вячеславовна*, канд. мед.наук, доцент каф. гериатрии и возрастной эндокринологии; e-mail: eka1006@yandex.ru

Важнейшим демографическим феноменом на рубеже XX– XXI веков явилось глобальное увеличение продолжительности жизни населения и, как следствие, адекватный рост доли пожилых людей в общей популяции населения стран всего мира. Так, в 1950 г. лица в возрасте 60 лет и старше составляли 8% мирового населения, в 2000 г. – уже 10%, а в 2050 г., по прогнозам ООН, их доля достигнет 21%. К 2020 г. впервые в истории численность людей в возрасте 60 лет и старше превысит численность детей младше 5 лет [1].

В России доля лиц старше 60 лет на 1 января 2016 г. составила 20,3%, к 2025 г. ожидается рост до 23,9 %, а к 2050 г. – до 28,8%. Самарская область повторяет общероссийские тенденции: на начало 2018 г. все население составило 3 193 514 человек, из них пожилых людей – 733 728 человек (мужчины старше 60 лет и женщины старше 55 лет), что составляет 23 % от всего взрослого населения [2].

Однако если системы здравоохранения не выработают эффективных стратегий решения проблем, встающих перед стареющим мировым населением, растущее бремя хронических заболеваний окажет глубокое воздействие на качество жизни пожилых людей [3]. В процессе старения увеличивается вероятность возникновения многих болезней, развивается полиморбидность. Наличие хронических заболеваний зачастую затрудняет диагностику, лечение и утяжеляют прогноз пациента.

Для старения характерны изменения, приводящие к формированию «старческой почки» [4]. К морфологическим изменениям почек относятся: уменьшение размеров почек, снижение эффективного почечного кровотока в кортикальном слое, гиалиноз клубочков и склеротические изменения в интерстиции, изменения в канальцах атрофического характера. Это сопровождается снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ). В соответствии с Национальными рекомендациями (2012 г.) СКФ в пределах 60-89 мл/мин/1,73 м² считается возрастной нормой для лиц в возрасте 65 лет и старше [5, 6].

Часть исследователей считают возрастное снижение СКФ доброкачественным явлением, «возрастной нормой», не имеющим большого клинического значения. Другие авторы утверждают, что снижение СКФ у пожилых пациентов происходит в результате существующего патологического процесса в почках. С возрастом почки подвергаются изменениям, которые обусловлены сдвигами в системе кровообращения. У 80-летнего человека от 30 до 40% нефронов склерозированы. У лиц старшего поколения почти на 50% уменьшается объем гломеруллярной фильтрации, плазменный почечный кровоток, концентрационная способность почек. Общепризнано, что пороговым значением для СКФ, свидетельствующим о снижении функции почек для пожилых пациентов является показатель 60 мл/мин/1,73м² [4].

Распространенность хронической болезни почек увеличивается по мере старения организма: дисфункция почек выявляется у 6-14 % взрослого населения и у 20 % - 56 % в популяции старших возрастных групп [7]. Поражение почек вносит свой «отрицательный вклад» в развитие и прогрессирование сердечно-сосудистой патологии [8]. По данным многочисленных проспективных исследований даже незначительное снижение функции почек ассоциировано с увеличением риска сердечно-сосудистой заболеваемости и смерти. Распространенность ХБП среди лиц пожилого возраста высока, но точных данных об истинной распространенности додиализных стадий ХБП недостаточно [9].

У пожилых людей существующие почечные заболевания и инволютивные процессы формируют «мультиморбидную» почку старческого возраста, которая склонна к быстрому прогрессирующему течению [10].

ХБП у пожилых часто развивается на фоне имеющихся болезней системы кровообращения. Повышение артериального давления играет ведущую роль в развитии дисфункции почек. Доказано, что уже при высоком, нормальном артериальном давлении и АГ 1 степени начинает формироваться гипертоническая нефропатия. Взаимосвязь дисфункции почек и изменений сердечно - сосудистой системы (ССС) получила название кардиоренального синдрома [8, 11].

Диагноз и степень тяжести ХБП определяется величиной СКФ и показателями альбуминурии/протеинурии. В зависимости от уровня СКФ различают 5 стадий ХБП: 5 стадия- менее 15 мл/мин/1,73м², 4 стадия-15-29 мл/мин/1,73 м², 3А стадия – 45-59 мл/мин/1,73 м², 3Б стадия - 30-44 мл/мин/1,73 м², 2 стадия -60-89 мл/мин/1,73 м², 1 стадия - СКФ более 90 мл/мин/1,73 м². Деление 3 стадии на две подстадии связано с различным прогнозом. Считается, что что при 3А стадии выше риск летальных сердечно-сосудистых осложнений, а при 3Б стадии более вероятно развитие терминальной почечной недостаточности [12].

«Золотым стандартом» расчета СКФ во всем мире является расчет по уровню креатинина. Определение СКФ по разным расчетным формулам представляет определенный интерес у людей старших возрастных групп, так как понятие возрастной нормы до конца не сформулировано в гериатрической практике и требует дополнительных исследований [13].

Таким образом, вопрос о «нормальности» снижения СКФ у пожилых людей до настоящего времени является спорным. Вопрос о разработке доступной и достоверной расчетной методике определения СКФ, особенно у пациентов старших возрастных групп, является весьма актуальным, так как оценка функции почек необходима не только для стратификации степени тяжести ХБП, но и для прогнозирования ее исходов.

Цель исследования - с помощью различных методик определения СКФ оценить функциональное состояние почек и его динамику у пациентов старческого возраста, страдающих ишемической болезнью сердца, стенокардией напряжения II функционального класса по классификации Канадской ассоциации кардиологов, в сочетании с гипертонической болезнью III стадии, хронической сердечной недостаточностью 2 функционального класса по NYHA с додиализными стадиями ХБП.

Материал и методы. Для решения поставленной цели на базе ГБУЗ «Самарский областной клинический госпиталь для ветеранов войн» было проведено проспективное исследование 135 человек: 69 мужчин (51,1%) и 66 женщин (48,9%) в возрасте от 75 до 90 лет (средний возраст 83,2 ± 0,70 лет) с додиализной стадией ХБП. Больные наблюдались в среднем 24,2 ± 0,93 месяца. Период наблюдения состоял из трех этапов. На первом этапе пациентам проводилось клиническое, лабораторное и инструментальное обследование. Второй этап выполнялся через 12-14 мес после включения пациентов в исследование, третий этап - через 24-36 мес после начала исследования. Данные этапы включали клинико-лабораторное обследование, выявление раз-

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-77-83

вившихся за период наблюдения сердечно-сосудистых осложнений, оценку функции почек, эффективности гипотензивной терапии.

Критерием включения пациентов в исследование было наличие ХБП, диагноз которой выставлялся согласно рекомендациям Научного общества нефрологов России (2012 г.) на основании данных визуализирующих методов исследования - ультразвукового исследования (УЗИ) и/или компьютерной томографии (КТ) почек, определения альбуминурии/протеинурии, СКФ по формуле CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) в пределах от 15 до 90 мл/мин/1,73м^2 [14]. При ультразвуковом исследовании критериями повреждения почек являлись: уменьшение размеров почек, расширение чашечно-лоханочной системы, уменьшение кортико-медуллярной дифференцировки, деформация чашечек, наличие кист, конкрементов.

К критериям исключения из исследования относились: системные заболевания с поражением почек; терминальная и острая и почечная недостаточность; единственная почка; стенокардия напряжения IV функционального класса по классификации Канадской ассоциации кардиологов; сахарный диабет, онкологические заболевания, инфаркт миокарда; хроническая сердечная недостаточность III-IV ФК (по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации – NYHA), все формы фибрилляции предсердий, бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких.

Все пациенты получали терапию согласно Российским клиническим рекомендациям и протоколам.

Исследуемую группу (1) составили лица старческого возраста – 131 пациент в возрасте от 75 до 89 лет и 4 долгожителя в возрасте 90 лет. Пациенты были разделены на 4 подгруппы по уровню СКФ, рассчитанному по уравнению CKD-EPI по креатинину сыворотки крови (2009 г.¸ модификация 2011 г.). Группу контроля (2) составили 33 пациента (СКФ - 60 мл/мин/1,73 м^{2}и выше, средний уровень СКФ 69,82 ± 1,74 мл/мин/1,73 м^2), т.е. с 1 и 2 стадиями ХБП, возраст пациентов 75-89 лет: 17 мужчин (51,52 %) и 16 женщин (48,48%) (средний возраст 81,82 ± 0,76 лет); 2 группу составили 33 пациента с 3А стадией ХБП: 17 мужчин (51,52%) и 16 женщин (48,48%) (СКФ 45-59 мл/мин/1,73 м^2 (средний уровень 52,58 ± 0,72 мл/мин/1,73м^2), в возрасте 75-89 лет (средний возраст 83,58 ± 0,72 лет).

В 3 группу были включены 35 пациентов с 3Б стадией ХБП в возрасте 78-88 лет (средний возраст 83,69 ± 0,46 лет). СКФ у них соответствовала 30-44 мл/мин/1,73 м^2 (средний уровень 40,20 ± 0,67 мл/мин/1,73м^2), из них 18 мужчин (51,43%) и 17 женщин (48,57%). 4 группу составили 34 пациента старческого возраста 75-90 лет,средний возраст - 83,76 ± 0,81 лет, СКФ в данной группе - 15-29 мл/мин/1,73 м^2 (средний уровень 24,44 ± 0,79 мл/мин/1,73м^2), что соответствует 4 стадии ХБП, из них 17 мужчин (50 %) и 17 женщин (50 %). Соотношение мужчин и женщин во всех группах было 1:1 или 1:1,06. Разница по возрастному составу между группами не достоверны (p_{1-2} = 0,295, p_{1-3} = 0,232, p_{1-4} = 0,205, p_{2-3}= 0,999, p_{2-4} = 0,998, p_{3-4} =1,0).

Всем обследуемым измеряли массу тела и рост с помощью медицинских весов и медицинского ростомера с точностью до 0,1 кг. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле Кетле. Биохимические показатели крови изучались на анализаторе ChemWell (Awareness Technology, США), реактивы Human (Германия). Исследование креатинина крови выполняли по методу Яффе с щелочным пикратом (нормальные значения до 123 мкмоль/л), мочевины - иммуноферментным методом. Определение цистатина С проводили с помощью реактива BioVendor (Чешская Республика).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения: SPSS 21 (лицензия № 20130626-3). В качестве описательных статистик представлены среднее арифметическое и его ошибка (M±m) или стандартное отклонение (M±SD). Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Для оптимальной оценки функционального состояния почек у пациентов старческого возраста в каждой группе обследованных больных был проведен сравнительный анализ различных расчетных методик определения СКФ по 2 формулам по креатинину крови (MDRD, CKD-EPIcr), по формуле для КК по K-G, по 3 формулам по цистатину С сыворотки крови (CKD-EPIcys, Hoek F.J. и соавт. [15] и 1 уравнению по двум параметрам - креатинину и цистатину С (CKD-EPIcr+cys). Были получены следующие показатели СКФ:

по формуле Hoek F.J. [15] по цистатину С - 55,33 ± 23,08 мл/мин/1,73м²

(22,7-129 мл/мин/ 1.73м²;

по уравнению MDRD - 51,25 ± 19,35 мл/мин/1,73м² (16-110 мл/мин/ 1,73м²);

по формуле Stevens L.A. [16] по цистатину С – 54,79 ± 24,5

мл/мин/1,73м² (17,4 - 125,8 мл/мин /1,73 м²;

по формуле CKD-EPIcr – 46,50 ± 17,72 мл/мин/1,73м² (15-90 мл/мин/1,73м²);

по формуле CKD-EPIcys – 47,03 ± 22,37 мл/мин/1,73м² (17,1-104,8 мл/мин/1,73м²);

по формуле для КК по K-G - 41,27 ± 15,82 мл/мин/1,73м² (9,7-110 мл/мин/1,73м²);

по формуле CKD-EPIcr+cys - 43,73 ± 20,38 мл/мин/1,73 м² (14,8-96,4

мл/мин/1,73м²).

Результаты. Показатели креатинина крови у обследованных имели средние значения 124,48 ± 49,37 мкмоль/л (59-288 мкмоль/л, ДИ 95% 116,07-132,88 мкмоль/л), показатели цистатина С - 1,54 ± 0,56 мг/л (0,66 - 2,78 мг/л, ДИ 95% 1,43-1,63 мг/л**.**

Полученные результаты СКФ у всех обследованных пациентов, рассчитанные с помощью семи уравнений, выявили, что максимальные значения СКФ для всей выборки пациентов старческого возраста получены по формулам Hoek F.J. и соавт. [15] и Stevens L.A. и соавт. [16]. Наименьшие показатели СКФ были выявлены при использовании формулы для КК по K-G, что привело в переклассификации стадии ХБП в сторону утяжеления у 33 (50%) пациентов с 2-3А стадиями ХБП. Показатель СКФ по уравнению MDRD был выше (51,25), чем по любой формуле CKD-EPI. Оценивая результаты трех формул CKD-EPI наибольшие значения СКФ получены по формуле CKD-EPIcys,(47,03) а наименьшие результаты - при использовании двух параметров - креатинина и цистатина С(43,73), по формуле СКФ,CKD- EPIcr-46,51. Полученные нами результаты определения СКФ у обследованных больных в каждой из групп сравнения по всем 7 уравнениям представлены в таблице, а по формуле MDRD, 3 уравнениям CKD-EPI и КК K-G, приведенного к площади поверхности тела, на рис. 1.

Из анализа таблицы и рис. 1 видно, что распределение показателей СКФ, полученное для всей выборки, сохра-

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-77-83

няется только в первых двух группах пациентов, т.е. при 1-3А стадиях ХБП, и изменяется при СКФ ниже 45 мл/мин/1,73 м^2. У пациентов с 3Б ст. ХБП распределение уравнений по убыванию СКФ представлено следующим образом: наибольшее значение СКФ получено по формуле Hoek F.J. и соавт. [15], СКФ по формуле MDRD больше, чем по формуле Stevens L.A. и соавт. [16], СКФ по CKD-EPIcr ниже, чем по формуле MDRD, показатели СКФ по CKD-EPIcys и КК K-G близки между собой, самые низкие значения СКФ получены по формуле CKD-EPIcr+cys.

Что касается пациентов с 4 ст. ХБП, максимальные показатели СКФ, рассчитанные по цистатину С по формулам Hoek F.J. и соавт. [15] и Stevens L.A. и соавт. [16], ниже показателей СКФ по формуле MDRD, КК по K-G, CKD-EPIcr, CKD-EPIcys, и наименьшие значения СКФ, также, как и в 3 группе, получены по формуле CKD-EPIcr+cys. Показатели СКФ при 3Б-4 ст. ХБП по трем формулам CKD-EPI и формуле K-G сопоставимы между собой и не требуют реклассификации стадии ХБП у обследованных пациентов. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Дисперсионный анализ для всей выборки больных выявил зависимость от пола показателей креатинина (F=57,05, p=0,000), цистатина С (F=10,27, p=0,002), мочевины (F=8,33, p=0,005), СКФ по CKD-EPIcr+cys (F=23,26, p=0,000), причем эти показатели были выше у мужчин. При оценке корреляционной зависимости показателей СКФ у всех обследованных больных мы получили обратную зависимость от возраста, уровня СКФ,

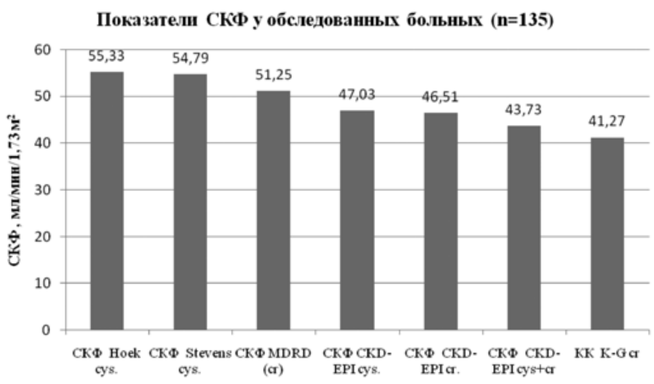

Рис. 1. Показатели скорости клубочковой фильтрации у обследованных больных.

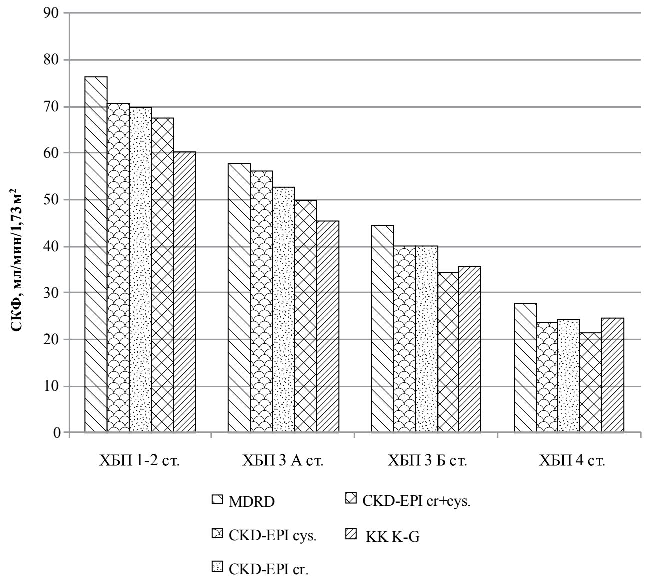

Рис. 2. Показатели СКФ в группах сравнения.

Показатели функции почек у пациентов по группам сравнения (M±m)

Параметры	1 группа СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73м^2 (ХБП 1-2 ст.), n=33	2 группа СКФ 45-59 мл/мин/1,73м^2 (ХБП3А ст.), n=33	3 группа СКФ 30-44 мл/мин/1,73м^2 (ХБП3Б ст.), n=35	4 группа СКФ 15-29 мл мин/1,73м^2 (ХБП 4 ст.), n=34
Мочевина, ммоль/л	7,26±0,35	7,55±0,30	8,98±0,39	14,30±0,98
Креатинин, мкмоль/л	79,45±2,59	99,58±2,23	125,54±3,36	191,24±7,6
Мужчины	86,41±2,77	109,57±2,17	141,17±3,23	212,94±8,0
Женщины	72,06±2,02	88,94±1,39	109,00±2,14	169,5±10,6
Цистатин С , мг/л	1,05 ± 0,06	1,19 ± 0,03	1,67 ± 0,05	2,27±0,07
Мужчины	1,13 ± 0,12	1,22 ± 0,05	1,81 ± 0,07	2,35 ± 0,08
Женщины	0,97 ± 0,06	1,15 ± 0,03	1,52 ± 0,06	2,17 ± 0,11
СКФ по цистатину С (Stevens L.A. et al. [16], мл/мин/1,73м^2	80,11±4,38	64,44±2,50	43,36±1,59	29,43±1,14
СКФ по цистатину С (Hoek F.J. et al. [15], мл/мин/1,73м^2	78,89±4,00	64,83±2,22	45,28±1,53	31,36±1,11
СКФ MDRD, мл/мин/1,73м^2	76,24±2,24	57,67±0,85	44,60±0,73	27,62±0,92
СКФ CKD-EPI по цистатину С, мл/мин/1,73м^2	70,61±3,83	56,15±2,31	35,99±1,36	23,70±0,93
СКФ CKD-EPI по креатинину, мл/мин/1,73м^2	69,82±1,74	52,58±0,72	40,20±0,67	24,44±0,79
СКФ CKD-EPI по креатинину и цистатину С, мл/мин/ ,73м^2	67,65±3,23	49,92±1,32	34,25±1,23	21,38±0,91
КК по K-G, мл/мин/1,73м^2	60,28±2,38	45,44±1,55	35,65±0,84	24,53±0,94

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-77-83

наиболее значимую для КК K-G (r=-0,406, p=0,000), слабую для СКФ по Hoek F.J. и соавт.[15] (r = - 0,246, p=0,008) и по Stevens L.A. и соавт.[16] (r = - 0,247, p=0,008). Показатели возраста не входят в расчет двух последних формул .

Связь показателей СКФ по изученным 7 уравнениям с мочевиной сыворотки крови обратная и значимая (r от - 0,516 до - 0,589 при p=0,000), наиболее сильная у СКФ по CKD-EPIcr (r = - 0,599, p=0,000 по CKD-EPIcr+cys (r= - 0,329, p=0,000). Как и предполагалось, показатели СКФ, рассчитанные по различным уравнениям, сильно коррелируют между собой: высокая зависимость выявлена между СКФ по уравнению Hoek F.J. и соавт. [15] (r=0,849, p=0,000), по уравнению Stevens L.A. и соавт. [16] (r=0,845, p=0,000), по CKD-EPIcr и по формуле MDRD (r=0,995, p=0,000), по ККK-G (r= 0,895, p=0,000), по CKD-EPIcys (r=0,856, p=0,000).

Таким образом, по полученным нами результатам можно заключить, что применение простой формулы для КК K-G, приведенного к площади поверхности тела, у пациентов старческого возраста со СКФ менее 45 мл/мин/1,73м^2 дает показатели СКФ, сопоставимые с полученными по формуле CKD-EPIcr, а при 3Б стадии ХБП показывает наиболее близкие значения к показателям СКФ, полученные по формуле CKD-EPIcr+cys, которая по данным последних исследований считается наиболее точной формулой для расчета СКФ. При СКФ выше 45 мл/мин/1,73м^2 формула ККK-G приводит к реклассификации пациентов с утяжелением стадии ХБП.

На втором (через 12-14 мес) и третьем (через 24-36 мес) этапах проводилась оценка функции почек при расчете СКФ по 3 уравнениям по креатинину сыворотки крови: по уравнениям CKD-EPIcr, MDRD, по формуле для КК K-G. Первое уравнение рекомендовано для оценки функции почек Национальными рекомендациями Научного общества нефрологов России (2012), второе, как показало наше исследование на первом этапе, завышает показатели СКФ при сравнении с уравнением CKD-EPI, третья формула продемонстрировала значения, близкие к минимальным при СКФ< 45 мл/мин/1,73м^2 и минимальные значения СКФ для больных с СКФ> 45 мл/мин/1,73м^2.

Ко второму этапу оценки функции почек дожили 129 больных из 135 включенных в исследование, 6 пациентов в течение 12 мес от начала исследования умерли. На третьем этапе функция почек оценивалась у 119 пациентов. У 9 пациентов был зафиксирован летальный исход в период от 13 до 30 мес наблюдения и одна пациентка выбыла из исследования (в связи с переездом в другой регион). Креатинин сыворотки крови через 12-14 мес составил у всех обследованных пациентов 138,57±14,98 мкмоль/л, через 24-36 мес - 153,91±19,75 мкмоль/л. К завершению исследования у всех обследованных пациентов установлено снижение функции почек, одному из 119 пациентов на 3 этапе начата гемодиализная терапия. Динамика показателей СКФ за период исследования представлена на рис. 3: средние показатели СКФ, рассчитанной по формулам CKD-EPIcr, MDR и K-G скорости клубочковой фильтрации снижаются почти параллельно на 3,5±0,41 мл/мин/1,73м^2, 3,38±0,25 мл/мин/1,73м^2, 3,02±0,19 мл/мин/1,73м^{2}за год соответственно.

При распределении пациентов по двум группам: СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73м^{2}и СКФ< 60 мл/мин/1,73м^2, мы обнаружили, что более заметное снижение функции почек к окончанию периода наблюдения в первой (контрольной)

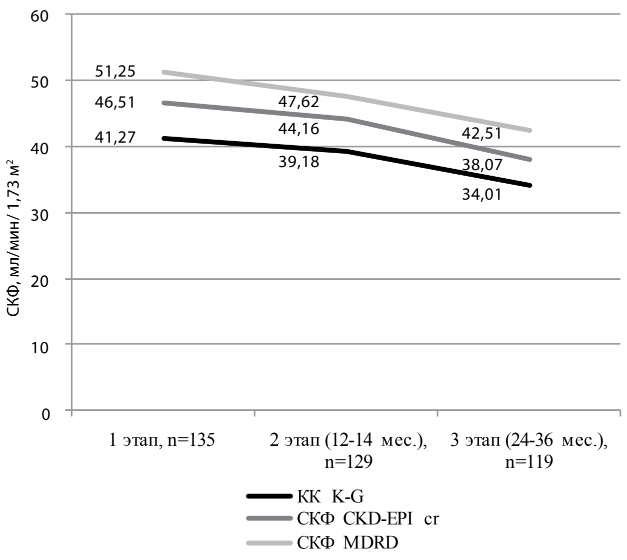

Рис. 3. Динамика СКФ у обследованных пациентов за период исследования.

группе больных с исходно «нормальными» для старческого возраста показателями СКФ. В этой группе зарегистрировано снижение СКФ по трем формулам (MDRD, CKD-EPIcr, КК по K-G) за первый год на 16,31 ± 2,40 мл/мин/1,73м^2, 11,45 ± 2,19 мл/мин/1,73м^2,8,28 ± 14,33 мл/мин/1,73м^2, за весь период наблюдения - на 26,41 ± 2,90 мл/мин/1,73м^2, на 22,38 ± 2,36 мл/мин/1,73м^2 и на 18,06 ± 2,33 мл/мин/1,73м^2 соответственно. Средняя скорость снижения СКФ за год составила по формуле КК по K-G - 7,22 ± 0,8 мл/мин/1,73м^2, по формуле CKD-EPIcr -8,95±0,94 мл/мин/1,73м^2, по формуле MDRD 10,56±2,1 мл/мин/1,73м^2.

Изменения показателей СКФ в группе больных со СКФ< 60 мл/мин/1,73м^2 за период исследования отличались от изменений СКФ в контрольной группе. Было выявлено незначительное снижение показателей СКФ по всем уравнениям (MDRD, CKD-EPIcr, КК K-G), а средняя скорость снижения СКФ соответствовала - 1,83±1,56, 1,66±1,75 и 1,59±1,67 мл/мин/1,73м^2 в год. Изменения СКФ на 2 и 3 этапах исследования в группах с 3А - 4 ст. ХБП происходили неодинаково.

В течение всего наблюдения снижение СКФ при 3А и 3Б ст. ХБП происходило медленно, также как и в группе со СКФ< 60 мл/мин/1,73м^2. У больных с 4 стадией ХБП мы выявили к концу первого года исследования незначительное увеличение СКФ по формулам MDRD и CKD-EPIcr,стабилизацию СКФ по формуле КК K-G, а к завершению исследования умеренное снижение СКФ по трем уравнениям.

Рассчитанная скорость снижения СКФ за год для исходной 3А ст. ХБП (2 группа) составила по формуле MDRD - 1,84±0,9 мл/мин/1,73м^2, по формуле CKD-EPIcr– 1,96±0,7 мл/мин/1,73м^2, по уравнению K-G – 2,18±0,95 мл/мин/1,73м^2, для исходной 3Б стадии - 2,45 ± 0,68 мл/мин/1,73 м^2, 2,07 ± 0,61 мл/мин/1,73 м^2, 1,75 ± 0,79 мл/мин/1,73 м^2 в год, для исходной 4 стадии ХБП - 0,82 ± 0,25 мл/мин/1,73 м^2, 0,76 ± 0,48 мл/мин/1,73 м^2, 1,06 ± 0,43 мл/мин/1,73 м^2, соответственно. Было установлено, что, несмотря на снижение средних значений СКФ, динамика ее показателей внутри каждой группы неоднородна. Положительная динамика СКФ через 12 мес выявлена у 3 (9,1%) пациентов в контрольной группе и у 4 (12,1%) пациентов во 2 группе с нарастанием СКФ в среднем на 7,02 мл/мин/1,73м^{2}и на 8,71 мл/мин/1,73м^2.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что более значимое ухудшение функции почек в течение периода исследования у пациентов старческого возраста наблюдаются в группе с нормальной для их возраста функцией почек (СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73 м^2), которое можно расценивать как быстрое прогрессирование ХБП. Пациенты с исходными 1-2 стадиями ХБП перешли в более тяжелую стадию ХБП за первый год наблюдения. Пациенты с 3А, 3Б и 4 стадиями ХБП, кроме умерших больных и пациента, которому была начата гемодиализная терапия, остались в пределах своей стадии с понижением показателя СКФ за 24-36 месяцев наблюдения по формуле MDRD на 4,56 ± 1,00 мл/мин/1,73 м^2, по формуле CKD-EPI на 4,15 ± 0,87 мл/мин/1,73 м^2, по формуле K-G на 3,78 ± 0,93 мл/мин/1,73 м^2.

Обсуждение. В ходе нашего исследования мы получили результаты, свидетельствующие о том, что у пациентов старческого возраста СКФ по уравнению MDRD при любой стадии ХБП выше, чем по уравнению CKD- EPI, что совпадает с данными других исследователей [12]. При использовании 2 уравнений с применением только одного показателя – цистатина С [15,16], мы получили у некоторых больных с ХБП 1-2 ст. завышенные показатели СКФ, вплоть до значений выше 115 мл/мин/1,73 м^2. Однако существует мнение, что у пациентов старших возрастных групп простая формула с одной переменной – цистатином С (СКФ = 100 / цистатин С) сопоставима с формулой CKD – EPIcr. Опубликованы данные исследований [17], которые при сравнении показателей СКФ у пациентов среднего возраста (44 года) по формулам с цистатином С, в том числе, по формулам Hoek F.J. и соавт. [15] и Stevens L.A. и соавт. [16], с показателями СКФ по формуле CKD – EPIcr , получили более низкие показатели СКФ при применении формул с цистатином С . Мы же получили противоположные результаты. В нашем исследовании формула Hoek F.J. и соавт. [15]: СКФ = 80,35/цистатин С (мг/л) – 4,32, завышает показатели СКФ по уравнению CKD – EPIcr более чем на 12 %. Кроме того, мы получили данные, что при СКФ ≥ 45 мл/мин/1,73м^2 применение формулы КК K-G, приведенной к площади поверхности тела, утяжеляет стадию ХБП. При СКФ< 45 мл/мин/1,73м^2 достоверных различий при расчете СКФ с применением двух вариантов формул CKD-EPI (cr, cys) нет, а минимальные значения СКФ дает формула CKD-EPIcr+cys. Следует отметить, что из всех примененных в нашем исследовании уравнений, только формула для КК K-G, приведенная к площади поверхности тела, учитывает массу тела больного. Следовательно, при потере мышечной массы больного в старческом возрасте и связанным с ней снижением уровня креатинина крови, эта формула не позволяет достоверно оценить функцию почек. Нами выявлена также высокая корреляционная зависимость между показателями СКФ по уравнению CKD-EPIcr и по формуле MDRD (r=0,995, *p*=0,000), по формуле CKD-EPIcr+cys (r=0,904, *p*=0,000), по ККK-G (r= 0,895, *p*=0,000), по CKD-EPIcys (r=0,856, *p*=0,000).

Средняя скорость снижения СКФ за год в нашем исследовании для всей выборки больных составила по формуле MDRD 3,5±0,41 мл/мин/1,73м^2 по CKD – EPIcr – 3,38±0,25 мл/мин/1,73м^2, по ККK-G – 3,02±0,19 мл/мин/1,73м^2. Наши данные несколько превышают значения, которые получили другие исследователи при наблюдении за пожилыми пациентами – Δ СКФ за год составила 1,6 ± 0,3 мл/мин/1,73 м^2 [18]. Неожиданно высокие темпы снижения СКФ в течение года мы получили в контрольной группе больных (1-2 ст. ХБП), несмотря на достигнутую стабилизацию САД на уровне, близком к целевому, у большинства больных на фоне гипотензивной терапии. Средняя скорость снижения СКФ за год составила в контрольной группе по формуле MDRD 10,56 ± 2,1 мл/мин/1,73м^2, по CKD – EPIcr – 8,95±0,94 мл/мин/1,73м^2, по КК K-G-7,22 ± 0,8 мл/мин/1,73м^2. Быстрым снижением СКФ одни авторы считают 5 мл/мин/1,73м^2 в год и более [19], другие – более 3 мл/мин/1,73м^{2}в год [20]. Наши данные значительно превышают эти уровни снижения СКФ только в контрольной группе пациентов, т.е. при 1-2 ст. ХБП. Мы сопоставили результаты нашего исследования с данными G.R. Aitken и соавт. [21], которые наблюдали 474 пациента с 3 Б ст. ХБП в возрасте от 40 до 75 лет в течение более 20 мес и выявили снижение СКФ на 1,9 мл/мин/1,73 м^2. У пациентов с 3 Б ст. ХБП в нашем исследовании мы получили сходные данные, снижение СКФ за год у них составило по формуле CKD – EPIcr 2,07± 0,61 мл/мин/1,73м^2.

Следовательно, большему риску снижения функции почек подвергаются пациенты, страдающие сердечно-сосудистыми заболеваниями именно с «нормальной» для своего возраста скоростью клубочковой фильтрации. Своевременная диагностика и профилактика ХБП и ее осложнений в старческом возрасте на фоне сердечно-сосудистой патологии имеет большое практическое значение. Особого внимания требуют пациенты с СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73 м^2 в связи с наличием у них риска быстрого снижения функции почек.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 7, 9-13, 15-21 см. REFERENCES)

2. Официальный сайт Росстата (2019). Старшее поколение. Доступно по ссылке: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/ population/generation.
3. Зорина Е.Н. Старение населения и уровень жизни населения третьего возраста. *Вестник института экономических исследований.* 2017; 4(8): 102-8.
4. Тареева И.Е., ред. Нефрология. Руководство для врачей. М.: Медицина; 2000.
5. Батюшин М.М., Врублевская Н.С., Терентьев В.П. Прогнозирование течения хронической сердечной недостаточности, осложнившейся развитием почечной дисфункции. *Клиническая нефрология.* 2010; 5: 41-4.
6. Кругликова А.С., Стражеско И.Д., Ткачева О.Н. Взаимосвязь факторов сердечно-сосудистого риска и биологии теломер с признаками сосудистого старения. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 2014; 13(3):11-7.
8. Кобалава Ж.Д., Виллевальде С.В., Ефремовцева М.А. Основы кардиоренальной медицины. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
14. Мухин Н.А. Нефрология. Национальное руководство. Краткое издание. М.: ГЭОТАР -Медиа; 2018.

REFERENCES

1. Global AgeWatch Index 2015. URL: http: // www.helpage.org/global - agewatch / reports / global - agewatch-index - 2015 - insight - report - summary - and-methodology.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-77-83

2. Rosstat (2019) Starshee pokolenie [The Older Generation]. Available at: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/ population/generation. (in Russian)
3. Zorina E.N. Population ageing and living standards of the third age population. *Vestnik instituta ekonomicheskikh issledovaniy*. 2017; 4(8): 102-8. (in Russian)
4. Tareeva I.E., ed. Nephrology. A guide for doctors [Nefrologiya. Rukovodstvo dlya vrachey]. Moscow: Meditsina; 2000. (in Russian)
5. Batyushin M.M., Vrublevskaya N.S., Terent'ev V.P. Prognosis of chronic heart failure complicated by the development of renal dysfunction. *Klinicheskaya nefrologiya*. 2010; 5: 41-6. (in Russian)
6. Kruglikova A.S., Strazhesko I.D., Tkacheva O.N. Correlation of cardiovascular risk factors and telomere biology with signs of vascular aging. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika.* 2014; 13(3):11-7. (in Russian)
7. Sharma D., Suri V., Pannu A.K., Attri S.V., VarmaN., Kochhar R., Varma S., Kumari S. Patterns of geriatric anemia: A hospital-based observational study in North India. *Family Med. Prim. Care.* 2019; 8(3): 976-80.
8. Kobalava Zh.D., Villeval'de S.V., Efremovtceva M.A. Fundamentals of cardiorenal medicine [Osnovy kardiorenal'noi meditsiny]. Moscow: GEOTARMedia; 2014. (in Russian)
9. Locatelli F., Mazzaferro S., Yee J. Iron Therapy Challenges for the Treatment of Nondialysis CKD Patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11(7): 1269-80.
10. Qaseem A., Hopkins R.H., Sweet D.E., Starkey M., Shekelle P. Screening, monitoring, and treatment of stage 1 to 3 chronic kidney disease: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann. Intern. Med.* 2013; 159: 835–47.
11. Clementi A., Virzì G.M., Goh C.Y. Cardiorenal syndrome type 4: a review. *Cardiorenal Med.* 2016; 3(1): 63-70.
12. Mok Y., Matsushita K., Sang Y., Ballew S.H., Grams M., Shin S.Y. Association of Kidney Disease Measures with Cause-Specific Mortality: The Korean Heart Study. *PLoS One.* 2016; 11: e 0153429-49.
13. Moyer V.A. Screening for chronic kidney disease: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann. Intern. Med.* 2012; 157: 567–70.
14. Mukhin N.A. Nephrology. National leadership. Brief edition [Nefrologiya. Natsional´noe rukovodstvo]. Moscow: GEOTARMedia; 2018. (in Russian)
15. Hoek F.J., Kemperman F.A., Krediet R.T. A comparison between cystatin C, plasma creatinine and the Cockcroft and Gault formula for the estimation of glomerular filtration rate. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18(10): 2024-31.
16. Stevens L.A., Viswanathan G., Weiner D.E. Chronic kidney disease and end-stage renal disease in the elderly population: current prevalence, future projections, and clinical significance. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2010; 17(4): 293-301.
17. Formiga F., Ferrer A., Cruzado J.M. Geriatric assessment and chronic kidney disease in the oldest old: the Octabaix study. *Eur. J. Intern. Med*. 2012; 23(6): 534-8.
18. Bowling C.B., O'Hare A.M. Managing older adults with CKD: individualized versus disease-based approaches. *Am. J. Kidney Dis.* 2012; 59(2): 293-302.
19. Kanasaki K., Kitada M., Koya D. Pathophysiology of the aging kidney and therapeutic interventions. *Hypertens. Res.* 2012; 35: 1121-8.
20. Toledo C., Thomas G., Schold J.D. Renal resistive index and mortality in chronic kidney disease. *Hypertension.* 2015; 66(2): 382-8.
21. Aitken G.R., Roderick P.J., Fraser S. Change in prevalence of chronic kidney disease in England over time: comparison of nationally representative cross-sectional surveys from 2003 to 2010. *B. M. J. Open.* 2014; 4(9): e005480.

Поступила 15.11.19
Принята к печати 19.11.19

Минин А.С.[1,2,3], Шень Н.П.[1,2], Панов И.Д.[1,4], Бем С.А.[2,3]

ВЛИЯНИЕ ГАЗОВОГО СОСТАВА КРОВИ И ПАРАМЕТРОВ ИСКУССТВЕННОЙ ВЕНТИЛЯЦИИ ЛЕГКИХ НА ПРОГНОЗ МЕДИЦИНСКОЙ ЭВАКУАЦИИ ПАЦИЕНТОВ В КРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

[1]ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет, кафедра акушерства, гинекологии и реаниматологии с курсом клинико-лабораторной диагностики, 625023, Тюмень, Россия;
[2]ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница №1», 625032 Тюмень, Россия;
[3]Территориальный центр медицины катастроф Тюменской области, 625032 Тюмень, Россия;
[4]ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница №2», 625039 Тюмень, Россия

Несмотря на то, что клиническая оценка всегда остается одним из основных компонентов контроля за состоянием пациента, на сегодняшний день становятся необходимыми более точные и объективные показатели. Анализ газов артериальной крови остается фундаментом, на котором базируется выбор оптимального режима искусственной вентиляции легких. Медицинская эвакуация пациентов, находящихся в критическом состоянии, часто требует коррекции параметров респираторной поддержки. Проведенные исследования показали, что прогностическим признаком неблагоприятного исхода в первые трое суток от момента медицинской эвакуации являются гиперкапния, сохраняющаяся в процессе транспортировки, не смотря на коррекцию параметров респираторной поддержки, снижение сатурации артериальной крови. Прогноз медицинской эвакуации также находится в прямой корреляционной связи с выраженностью ацидоза, а на момент завершения трансфера наибольшей прогностической значимостью обладают низкий уровень парциального напряжения кислорода в артерии. Применение портативного экспресс-анализатора газов крови позволяет осуществлять коррекцию параметров респираторной поддержки и повышать качество и безопасность медицинской эвакуации пациентов.

Ключевые слова: *прикроватные методы лабораторной диагностики; point of care; газовый состав крови; искусственная вентиляция легких; реанимация, интенсивная терапия; медицина катастроф; транспортировка пациентов.*

Для цитирования: *Минин А.С., Шень Н.П., Панов И.Д., Бем С.А. Влияние газового состава крови и параметров искусственной вентиляции легких на прогноз медицинской эвакуации пациентов в критическом состоянии. Клиническая лабораторная диагностика. 2020;65 (2): 84-89. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-84-89*

Minin A.S.[1,2,3], Shen N.P.[1,2], Panov I.D.[1,4], Bem S.A.[2,3]

INFLUENCE OF THE BLOOD GAS COMPOSITION AND MECHANICAL VENTILATION PARAMETERS OF THE MEDICAL EVACUATION PROGNOSIS OF CRITICALLY ILL PATIENTS

[1]FGBOU VO Tyumen State Medical University, Department of obstetrics, gynecology and resuscitation with a course of clinical and laboratory diagnostics, 625023, Tyumen, Russia;
[2]GBUS TO «Regional clinical hospital №1», 625032, Tyumen, Russia;
[3]Territorial center of disaster medicine of Tyumen region, 625032, Tyumen, Russia;
[4]GBUS TO «Regional clinical hospital №2», 625039, Tyumen, Russia

The clinical estimation of the state of patient is one of the basic components of the checking of the state of patient, but more precise and more objective indices today become necessary. The arterial blood gases analysis helps to select the optimum regime of mechanical ventilation. The medical evacuation of the critically ill patients frequently requires the correction of the parameters of respiratory support. The conducted investigations showed that the prognostics of unfavorable outcome within the first three days from the moment of the medical evacuation are hypercapnia, which exists during the process of evacuation in spite of the correction of the parameters of mechanical ventilation, reduction in the saturation of the arterial blood. The forecast of the medical evacuation is located as well in the direct correlation with the manifestation of acidosis, and at the moment of the completion of the transfer of the patient the greatest prognostic significance they possess the low level of the partial tension of oxygen in the artery. The application of a portable express- analyzer of blood gases permits implementation of correction parameters of respiratory support and to increase quality and safety of the medical evacuation of patients.

Keywords: *point-of-care; blood gases analysis; mechanical ventilation; resuscitation; intensive care; disaster medicine; the transfer of the patients.*

For citation: *Minin A.S., Shen N.P, Panov I.D., Bem S.A. Influence of the blood gas composition and mechanical ventilation parameters of the medical evacuation prognosis of critically ill patients. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 84-89 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-84-89*

For correspondence*: Shen N.P.,* the doctor of medical sciences, chairman of department of obstetrics, gynecology and resuscitation with a course of clinical and laboratory diagnostic; e-mail: nataliashen@rambler.ru

Information about authors:

Minin A.S., https://orcid.org/0000-0002-9600-5580
Shen N.P., https://orcid.org/0000-0002-3256-0374

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*
Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 10.11.2019
Accepted 20.11.2019

Для корреспонденции: *Шень Наталья Петровна*, д-р мед. наук, зав. каф. акушерства, гинекологии и реаниматологии с курсом клин.-лаб. диагностики; e-mail: nataliashen@rambler.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-84-89

Введение. За последние несколько десятилетий количество отделений интенсивной терапии и реанимационных коек во всем мире имеет устойчивую тенденцию к росту, но также большое и постоянно растущее число критически больных пациентов требует перевода между отделениями интенсивной терапии как внутри одного стационара, так и на большие расстояния [10]. Признание того, что централизация специализированной помощи связана со снижением уровня смертности, может привести к новому потоку трансферов [15, 26]. Недавнее исследование, проведенное в США, показало, что за 1 год благодаря переводу в другую, более квалифицированную больницу, или специализированное отделение, могли бы быть спасены жизни 4000 больных [18].

Перевод тяжелобольных пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии из одной медицинской организации в другую, безусловно, призван улучшить прогноз. Сам транспорт должен быть максимально безопасным и не должен представлять дополнительных рисков для пациента. Проблемы с кровообращением или вентиляцией легких могут возникнуть как в машине скорой помощи, так и при транспортировке внутри стационара [4, 6, 9, 21, 32]. Основной целью всех межгоспитальных медицинских эвакуаций является сохранение непрерывности оказания медицинской помощи и повышение ее качества.

Транспортировка пациента в критическом состоянии является потенциально дестабилизирующим фактором с риском развития вторичных, в том числе, и ятрогенных осложнений. Поскольку транспортируются больные, находящиеся в отделении реанимации с нарушениями витальных функций, встает вопрос об интегративной оценке исходной тяжести состояния больного, более скрупулезного учета степени компенсации функции витальных систем, являющихся предикторами безопасной эвакуации. Процесс транспортировки, как правило, связан с риском развития нежелательных событий и критических инцидентов. Как нередко указывают авторы обзоров, посвященных медицинской эвакуации, частота нежелательных явлений и декомпенсации жизненно важных функций пропорциональна продолжительности транспортировки, тяжести заболевания или травмы перед трансфером, и неопытности медицинского сопровождения [3, 19, 20, 29,30].

Ключевыми элементами безопасной транспортировки являются предварительная стабилизация и подготовка к трансферу, выбор соответствующего способа транспортировки, т. е. наземного или воздушного транспорта, персонала, сопровождающего пациента, оборудования и мониторинга, необходимых во время трансфера. Эти ключевые элементы должны соблюдаться в каждом случае, чтобы предотвратить любые неблагоприятные события, которые могут серьезно повлиять на прогноз.

Поскольку перевод пациента может вызвать различные физиологические изменения, которые способны отрицательно повлиять на прогноз заболевания или критического состояния, его следует инициировать в соответствии с научно обоснованными рекомендациями. Для безопасного выполнения перевода пациента были предложены различные руководства, разработанные профессиональными организациями (Американский колледж критической медицины, общество критической медицины, общество интенсивной терапии, Ассоциация анестезиологов Великобритании и Ирландии и педиатрическое общество интенсивной терапии).

Все авторы указывают на необходимость мониторирования показателей витальных функций в процессе подготовки и проведения эвакуации. В частности, в руководстве по транспортировке пациентов штата Иллинойс (США) [31] указано, что в каждой больнице должен быть формализованный план внутри- и межбольничного трансфера, в котором рассматриваются координация и вид транспорта; сопровождающий персонал; транспортное оборудование; мониторинг и документация. В Индийском руководстве по межбольничному трансферу также указывается, что ключевыми элементами безопасной транспортировки являются своевременное решение о переводе, предварительная стабилизация и предтранспортная подготовка, выбор подходящего способа передачи, квалификация персонала, сопровождающего пациента, качество, состав и опции оборудования, а также адекватный контроль за состоянием пациента в пути, что важно для предотвращения любых нежелательных явлений, которые могут серьезно повлиять на прогноз [22].

В Российской Федерации на межрегиональном уровне экстренную консультативную медицинскую помощь и эвакуацию пациентов осуществляют федеральные специализированные медицинские организации, расположенные на территории федерального округа. На региональном уровне эту помощь оказывают территориальные центры медицины катастроф, региональные многопрофильные больницы (взрослые и детские) и перинатальные центры. В методических рекомендациях по организации оказания экстренной консультативной медицинской помощи и проведения медицинской эвакуации [1] отмечается, что решение о транспортабельности пациента принимает врач-консультант выездной консультативной бригады специализированной медицинской помощи или борт-врач авиамедицинской бригады при очной или телемедицинской консультации, а подготовку пациента к эвакуации проводит персонал медицинской организации, в которой он находится; результат подготовки согласовывается с руководителем выездной бригады. Между тем, в прописанном в этом документе стандарте оснащения не содержится никакого мобильного лабораторного оборудования, кроме глюкометра.

Во время транспортировки не должен прекращаться ни на минуту мониторинг пациента и поддержание его витальных функций. Наиболее тяжелые больные, для которых транспортировка представляет риск, это пациенты, находящиеся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), особенно те, кто нуждается в применении высоких уровней положительного давления конца выдоха (PEEP) – более 5 см. H_2O и во введении вазоактивных препаратов, таких как добутамин, допамин, норадреналин [6, 17, 28].

Постоянный мониторинг также позволяет предупредить о проявлениях риска развития суб- и декомпенсации (гипоксемии и гипотензии) и своевременно их ликвидировать. Мониторинг также сигнализирует об угрожающих изменениях в состоянии больного и необходимости немедленно применять меры по ликвидации возникших нарушений (например, о дисконнекции контура дыхательного аппарата). В руководстве по организации неотложных процедур M.S. Jastremski и соавт. [16] подчеркивают необходимость соответствия объёма мониторинга в процессе транспортировки объёму, получаемому пациентом в отделении интенсивной терапии (при наличии технических возможностей). Авторы также рекомендуют выделять минимальный и максимальный объём мониторинга. Минимальный объём мониторинга должен осуществляться в процессе любого трансфера и включать в себя контроль АД, ЧСС и SpO_2. Максимальный объём, имеющийся в распоряжении транспортной бригады, должен быть использован у наиболее нестабильных пациентов [11, 23].

Чтобы оптимизировать проведение ИВЛ и свести к минимуму ее осложнения, врачу важно иметь информацию, отражающую адекватность вентиляции и оксигенации. Хотя клиническая оценка всегда остается одним из основных компонентов контроля за состоянием пациента, на сегодняшний день становятся необходимыми более точные и объективные показатели. Этим целям служат как инвазивные, так и неинвазивные методы, каждый из которых имеет свои, присущие ему достоинства и недостатки, ограничения к применению и возможные осложнения, возникающие порой непосредственно в процессе получения информации.

Анализ газов артериальной крови, pH, PCO_2, PO_2, и концентрация бикарбонатов остаются фундаментом, на котором базируется выбор режима ИВЛ [2, 25]. Пробы крови могут отбираться как путем периодической пункции периферических артерий, так и с помощью постоянных катетеров, позволяющих осуществлять постоянный контроль артериального давления, а также транскутанно [2, 12, 13]. Между тем, до настоящего времени единых методологических подходов к оценке тяжести витальных функций больных в критических состояниях в процессе медицинской эвакуации предложено не было, а газоанализатор не включен в стандарты оснащения мобильных бригад. Таким образом, транспортировка критически больных пациентов, ее качество и результаты, тесно связаны с получением точных и надежных данных, какими, на наш взгляд, являются показатели газового состава артериальной крови пациентов, находящихся на ИВЛ в процессе медицинской эвакуации.

Цель исследования: оценить влияние газового состава крови и параметров искусственной вентиляции легких в процессе медицинской эвакуации пациентов на формирование неблагоприятного прогноза.

Материал и методы. Проведена медицинская эвакуация 23 пациентов в возрасте 53,4±3,1 [33; 86] лет, 15 (65,2%) из которых были мужского пола и 8 (34,8%) женского. Среднее расстояние между медицинскими организациями (МО) составило 101,6±8,6 [70; 251] км. В нозологической структуре группы больных не было доминирующей патологии и примерно в равной мере оказались представлены такие нозологии, как тяжелая сочетанная травма, острые отравления, абдоминальный сепсис и сепсис других локализаций, кома неясной этиологии и тяжелая термическая травма. Все пострадавшие были эвакуированы из МО I и II уровня на III уровень в связи с необходимостью дополнительной диагностики, проведения жизнеспасающих мероприятий и высокотехнологичной медицинской помощи, не доступной в первичной МО. У всех пациентов было зарегистрировано развитие синдрома полиорганной недостаточности (СПОН) по 2,7±0,28 [2, 6] системам. У 7 пациентов (30,4%) развился летальный исход в первые трое суток от момента эвакуации.

Всем больным на этапе первой МО была начата ИВЛ, которая продолжалась и в процессе эвакуации. Параметры ИВЛ регулировались по показателям биомеханики дыхания и состоянию газового состава крови, который определялся на 3 этапах эвакуации: перед началом транспортировки, в ее процессе, и на момент окончания. Также оценивались показатели гемодинамики: систолическое, диастолическое и среднее артериальное давление, частота сердечных сокращений. На всех трех этапах у пациентов выполнялась оценка жизненно важных функций организма по интегральным прогностическим шкалам. Высшая нервная деятельность оценивалась по шкале FOUR (предусмотренной для оценки уровня нарушения сознания у пациентов на ИВЛ), а также шкале седации RASS. Выраженность органной дисфункции – по шкалам SOFA, NEWS и MEWS, определялся индекс коморбидности Чарлсона.

ИВЛ в процессе проведения эвакуации осуществлялась транспортным аппаратом, у которого в качестве привода используется встроенная турбина как дополнительный источник сжатого газа, при этом не требуется применение компрессора. Также был использован пневматический аппарат ИВЛ. В процессе проведения подготовки к эвакуации в состояние готовности к работе приводились оба аппарата и далее, в зависимости от состояния биомеханики дыхания и газового состава крови, выполнялся подбор аппарата и режима ИВЛ. При отсутствии высокой потребности в кислороде выбор чаще делался в пользу турбинного аппарата, т.к. возможности пневматического предусматривали проведение ИВЛ с фракцией кислорода во вдыхаемой смеси (FiO_2) не ниже 0,5 (0,5 или 1,0), что при длительной эвакуации могло вызывать гипокапнию и гипероксию. Также выбор турбинного аппарата осуществлялся в случае необходимости измерения парциальной концентрация CO_2 в конце выдоха, комплайнса и резистентности легочной ткани. Следует также отметить, что аппараты различались чувствительностью триггерной системы и при неровной дороге более тонко настроенный триггер мог принять за попытку вдоха колебания автомобиля. С другой стороны, менее чувствительный триггер требовал применения миоплегии, так как при попытках вдоха не всегда позволял синхронизировать дыхание пациента и респиратора.

Газовый состав крови оценивали с помощью портативного экспресс-анализатора газов крови, электролитов, гематокрита, метаболитов технологией SmartCard (измерительные карты со встроенным чипом биосенсеров) и беспроводной передачей данных с помощью Bluetooth и Wi-Fi. Особенностью измерительных карт одноразового использования (картриджей) было то, что они не нуждаются в специальном температурном режиме, могут использоваться вместе с анализатором в любой момент и в любом месте, где требуется экстренная медицинская помощь, в том числе, в службе медицине катастроф. Время получения данных от момента взятия крови до результата в распечатанном виде составляло в среднем 3 минуты.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью функций пакета анализа программы Microsoft excel, связь факторов между собой оценивалась с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена, определение статистической значимости различий средних величин в двух выборках – в группе выживших и умерших пациентов – определялись с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Исходные данные проверялись на нормальность, распределение было признано нормальным.

Результаты. У всех пациентов в начале медицинской эвакуации (1 этап исследования) отмечался ацидоз, который имел тенденцию к регрессу на 3 этапе. Между тем, на момент прибытия в МО III уровня в группе выживших этот показатель становился нормальным, в то время как в группе умерших ацидоз купирован не был (pH 7,26±0,06). Статистически значимо нарастала к 3 этапу в группе умерших пациентов гиперкапния ($paCO_2$ 50,8±7,3 мм рт.ст. в сравнении с 33,4±3,5 мм рт.ст. в группе выживших, p=0,04) не смотря на коррекцию параметров респираторной поддержки, причем уровень парциального напряжения кислорода в артериальной крови (paO_2) в обеих группах был нормальным и статистически не различался между группами на соответствующих этапах исследования.

С первого этапа у пациентов имел место дефицит бикарбонатов, который, впрочем, был умеренным и не имел статистически значимых отличий между группами. Важным критерием газообмена является показатель сатурации артериальной крови ($SpaO_2$). Динамическое наблюдение показало, что в то время как в группе выживших пациентов данный параметр оставался относительно стабильным, и даже имел тенденцию к росту к моменту прибытия пациента в МО III уровня, в группе умерших отмечалось снижение $SpaO_2$. Сравнение между группами показало статистически значимые отличия в пользу выживших пациентов (97,9±0,7% против 89,7±2,5%; p=0,006).

Образование лактата в организме является показателем гипоперфузии тканей и анаэробного гликолиза. Представляют интерес данные о значении уровня лактата в качестве прогностического признака неблагоприятного исхода патологических процессов. Доказано, что повышение уровня лактата происходит раньше, чем изменения других показателей развивающегося неблагополучия в организме (гипотония, олигурия, снижение pH и др.) [14]. Этот показатель также оказался важен и для долгосрочного прогноза выживаемости пациентов после критического состояния. В нашем исследовании, как в начале транспортировки, так и к моменту ее окончания уровень лактата был повышен, причем на 1 этапе в группе умерших он был статистически значимо выше, чем в группе выживших (3,1±0,2 ммоль/л против 2,14±0,4 ммоль/л; p=0,04). Отличия нивелировались к моменту прибытия.

Избыток оснований (BE) также подчеркивал выраженность ацидоза, что было характерно для обеих групп. Следует отметить, что, хотя по ряду позиций не было получено статистически значимых отличий (например, по уровню pH или paO_2), в процессе транспортировки отчетливо прослеживалась положительная динамика показателей или, по крайней мере, их стабильное состояние, что может являться свидетельством отсутствия негативного влияния факторов эвакуации на метаболизм и газообмен пациентов (табл. 1).

Корреляционный анализ, проведенный в сплошной выборке, без деления на группы, показал, что ряд показателей газового состава крови ассоциируется с неблагоприятным исходом. Именно в сплошной выборке такую зависимость продемонстрировал показатель pH крови: на всех этапах транспортировки он находился в прямой корреляционной связи с неблагоприятным прогнозом, т.е. чем более выражен был ацидоз, тем выше была вероятность летального исхода (первый этап r=0,32, второй этап r=0,44, третий этап r=0,51; (p<0,05)), причем с каждым этапом эта связь становилась все более тесной. Схожая тенденция прослеживалась и по уровню paO_2, причем, если на первом и втором этапах корреляции с неблагоприятным исходом нет (первый этап r=0,03, второй этап r=-0,13; p>0,05), третий этап показал обратную связь: чем ниже уровень paO_2, тем выше вероятность летального исхода (третий этап r=-0,37; p<0,05).

В соответствии с paO_2 находилась и $SpaO_2$, которая также приобретала обратную корреляционную связь с неблагоприятным прогнозом к моменту окончания транспортировки (первый этап r=0,001, второй этап r=-0,20, третий этап r=-0,43 (p<0,05)). Обращает на себя внимание, что в сплошной выборке такие показатели, как уровень $paCO_2$, BE и HCO_3 не показали связи с неблагоприятным исходом. В то же время, оценка различий средних величин раздельно – в группе выживших и умерших пациентов выявила статистически значимое накопление CO_2 в группе умерших пациентов, что свидетельствовало о неадекватном газообмене.

В процессе транспортировки в 12 случаях из 18 выполнялась коррекция параметров искусственной вентиляции легких. Так, при снижении показателя $paCO_2$ снижали ЧД, при снижении $SpaO_2$ увеличивали положительное давление конца выдоха (PEEP) и/или фракцию кислорода во вдыхаемой смеси (FiO_2). По-видимому, в связи с этим не было выявлено отличий между группами как по ЧД, так и по уровню FiO_2. Вместе с тем, на 2 этапе уровень PEEP был статистически значимо выше в группе умерших пациентов (7,7±1,0 см H_2O против 5,3±0,2 см H_2O; p=0,02). Не смотря на повышение

Таблица 1

Показатели газового состава крови на этапах медицинской эвакуации у выживших и умерших пациентов

Показатели на этапах исследования	Результаты измерений в группах		Критерии значимости	
	Выжившие пациенты, n=13	Умершие пациенты, n=5	t	p
pH 1 этап	7,28±0,06	7,12±0,1	1,37	0,19
2 этап	7,24±0,06	7,29±0,1	0,43	0,6
3 этап	7,37±0,05	7,26±0,06	1,41	0,06
$paCO_2$ мм рт.ст.				
1 этап	36,3±6,1	38,5±8,7	0,22	0,82
2 этап	38,1±8,1	44,5±6,0	0,64	0,5
3 этап	33,4±3,5	50,8±7,3	2,15	0,04
paO_2 мм рт.ст.				
1 этап	100,4±10	129,0±14,2	1,66	0,11
2 этап	115,3±26	116,2±15,1	0,06	0,94
3 этап	114,7±14	94,4±16,0	0,95	0,35
HCO_3 ммоль/л				
1 этап	19,6±3,4	21,2±10,7	0,15	0,88
2 этап	19,2±6,0	22,2±6,0	0,35	0,72
3 этап	21,0±2,9	23,2±4,7	0,49	0,62
$SpaO_2$, %				
1 этап	95,4±1,4	95,6±1,9	0,14	0,88
2 этап	94,3±2,6	96,6±1,4	1,03	0,31
3 этап	97,9±0,7	89,7±2,5	3,16	0,006
Лактат, ммоль/л	2,14±0,4	3,1±0,2	2,15	0,04
1 этап	2,2±0,6	1,9±0,3	0,45	0,66
3 этап				
BE 1 этап	-8,94±4,9	-4,55±11,4	0,38	0,71
2 этап	-9,67±7,9	-6,6±6,1	0,33	0,74
3 этап	-5,78±3,7	-3,05±4,3	0,50	0,62

Таблица 2

Параметры искусственной вентиляции легких на этапах медицинской эвакуации у выживших и умерших пациентов

Показатели на этапах исследования	Результаты измерений в группах		Критерии значимости	
	Выжившие пациенты, n=13	Умершие пациенты, n=5	t	p
ЧД, в 1 мин				
1 этап	14,5±0,6	15,6±0,6	1,3	0,21
2 этап	14,3±0,7	15,2±0,8	0,85	0,41
3 этап	15,0±0,8	14,8±1,0	0,16	0,87
FiO_2 1 этап	39,1±3,8	26,0±6,0	0,78	0,44
2 этап	45,2±5,2	27,0±1,5	0,40	0,69
3 этап	40,8±3,5	27,0±1,6	0,24	0,81
PEEP, см H_2O				
1 этап	4,8±0,4	7,2±1,4	1,68	0,11
2 этап	5,3±0,2	7,7±1,0	2,40	0,02
3 этап	6,1±0,7	8,2±1,2	1,55	0,14
I:E* 1 этап	1,85±0,1	1,90±0,1	0,35	0,72
2 этап	1,80±0,1	1,90±0,07	0,82	0,42
3 этап	1,87±0,5	1,67±0,19	0,37	0,71
Vt, мл/кг				
1 этап	543±54,8	550±43,5	0,10	0,92
2 этап	538±14,8	512±12,5	1,41	0,17
3 этап	609±54,1	473±26,2	2,27	0,03
PAP, см H_2O				
1 этап	21,2±1,4	24,3±4,0	0,73	0,47
2 этап	19,2±1,3	27,0±6,4	1,17	0,25
3 этап	20,3±1,6	24,1±3,7	0,92	0,37
MV, л/мин				
1 этап	8,3±0,4	8,1±0,3	0,40	0,69
2 этап	7,6±0,5	8,4±0,5	1,13	0,27
3 этап	9,0±0,5	7,6±0,4	2,19	0,04

Примечание. * – длительность выдоха, исходя из соотношения, что вдох = 1.

PEEP, дыхательный объем (Vt) в группе умерших пациентов не рос, и к 3 этапу был статистически значимо ниже (473±26,2 мл/кг против 609±54,1 мл/кг; p=0,03), что свидетельствовало о ригидности альвеол и их неспособности к растяжению. Это подтверждалось и снижением минутной вентиляции легких (MV), которая была значимо ниже также в группе умерших (7,6±0,4 л/мин против 9,0±0,5 л/мин; p=0,04), табл. 2.

Корреляционный анализ, проведенный в сплошной выборке, также показал, что необходимость смены режима ИВЛ в процессе транспортировки должна ориентировать специалистов на серьезность прогноза критического состояния. Так, изменение соотношения вдоха к выдоху в сторону удлинения вдоха (инверсия), обычно применяемое при нарушениях транспорта кислорода через альвеоло-капиллярную мембрану, имело место именно в группе пациентов с неблагоприятным прогнозом. Корреляция была обратной: чем меньше длительность выдоха, тем выше вероятность неблагоприятного прогноза (первый этап r=0,14; второй этап r=-0,11 (p>0,05); третий этап r=-0,51 (p<0,05), причем важен был именно динамический мониторинг, т.к. на первом этапе – в начале транспортировки – корреляционной связи соотношения I:E и прогноза эвакуации не прослеживалось.

Обсуждение. Медицинская эвакуация пациентов, как внутри- так и межбольничная, становится все более актуальной, как в России, так и во все мире. Данная тенденция связана с повышение доступности качественной медицинской помощи и развитием специализированных отделений реанимации. Чем более высока степень риска развития неблагоприятного исхода, тем чаще приходится выполнять транспортировку пациентов, в том, числе и внутри стационара – с целью выполнения дополнительных методов визуализации, проведения заместительной почечной терапии и т.д. Вместе с тем, качественная транспортировка пациентов невозможна без подробного мониторинга жизненно важных функций – гемодинамического, респираторного, лабораторного. Проведенное исследование подчеркнуло важность оценки газового состава крови. В частности, тяжести гиперкапнии, ацидоза и гипоксемии. Несмотря на прогностическую значимость оценки данных параметров, в Российской Федерации до сих пор нет стандарта оснащения транспортной бригады, осуществляющей эвакуацию пациентов, портативным лабораторным оборудованием, что, безусловно, необходимо. Проведенные исследования могут явиться веским аргументом в пользу пересмотра данной ситуации.

Выводы.

Прогностическим признаком неблагоприятного исхода в первые трое суток от момента медицинской эвакуации являются гиперкапния, сохраняющаяся в процессе транспортировки не смотря на коррекцию параметров респираторной поддержки и снижение $SpaO_2$ (89,7±2,5% против 97,9±0,7%; p=0,006).

Прогноз медицинской эвакуации находится в прямой корреляционной связи с выраженностью ацидоза; связь усиливается от начала трансфера к его окончанию (первый этап r=0,32, второй этап r=0,44, третий этап r=0,51; p<0,05).

На момент завершения трансфера наибольшей прогностической значимостью обладают низкий уровень paO2 (r=-0,37; p<0,05), SpaO2 (r=0,43; p<0,05) и уменьшение Vt (473±26,2 мл/кг против 609±54,1 мл/кг; p=0,03) не смотря на повышение уровня PEEP, а также вынужденная инверсия соотношения вдоха к выдоху.

Портативный экспресс-анализатор с технологией Smart Card является удобным и надежным инструментом мониторинга показателей газового состава крови, обеспечивающим полный объем информации для коррекции параметров ИВЛ и прогнозирования исхода медицинской эвакуации.

Безусловно, численность группы пациентов, вошедших в исследование, не велика, что может явиться некоторым ограничением. Вместе с тем, полученные статистически значимые отличия между группами могут явиться серьезным аргументом для продолжения изучения влияния газового состава крови, параметров биомеханики дыхания и респираторной поддержки на прогноз медицинской эвакуации пациентов в критическом состоянии. Не исключено, что некоторые тенденции, полученные в малой популяции, усилятся, или напротив, будут нивелированы. Также хотелось бы отметить, что уровень PEEP, применяемый в процессе транспортировки, как правило, не превышал 10 см H_2O. Дискуссии по поводу его оптимального уровня для обеспечения адекватного раскрытия альвеол и газообмена продолжаются. Как слишком высокий уровень PEEP, так и низкий, не способствуют улучшению оксигенации.

В практике выбора параметров ИВЛ при лечении острого респираторного дистресс-синдрома были предложены различные протоколы по установке уровня PEEP, с одной стороны, чтобы избежать альвеолярного коллапса, с другой – для предотвращения баротравмы

[5, 27]. Некоторые из предложенных стратегий используют таблицу значений PEEP, которые зависят от фракции кислорода во вдыхаемой смеси, в то время как другие основаны на индивидуальной оценке дыхательной механики. Протокол Express, разработанный A. Mercat и соавт. [24], например, состоит из достижения давления плато дыхательных путей до 28–30 см H_2O с фиксированным Vt, равным 6 мл/кг прогнозируемой массы тела. Авторы сообщили о значительном снижении заболеваемости, но не смертности. Поскольку давление в дыхательных путях является чрезмерно упрощенным эквивалентом повреждения легких у пациентов с аномальной эластичностью грудной стенки, может быть целесообразным подбор уровня PEEP, вызывающего растяжение легких по транспульмональному давлению. Между тем, данная методика пока не воспроизводима в условиях транспортировки пациентов.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки*.

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-32 см. REFERENCES)

1. Организация оказания экстренной консультативной медицинской помощи и проведения медицинской эвакуации: Методические рекомендации. М.: ФГБУ ВЦМК «Защита», 2014. (Библиотека Всероссийской службы медицины катастроф).

REFERENCES

1. Organization of rendering to special consultative medical aid and of conducting of the medical evacuation: the systematic recommendations. [Organizatsiya okazaniya ekstrennoy konsul'tativnoy meditsinskoy pomoshchi i provedeniya meditsinskoj evakuatsii: Metodicheskie rekomendatsii]. Moscow: FGBU VCMK «Zashchita»; 2014. (Biblioteka Vserossiyskoy sluzhby meditsiny katastrof). (in Russian)
2. Al Ashry H.S. Richards J.B., Fisher D.F., Sankoff J., Seigel T.A., Angotti L.B., Wilcox S.R. Emergency Department Blood Gas Utilization and Changes in Ventilator Settings. *Respir. Care*. 2018;63(1): 36-42.
3. Barry P.W., Ralston C. Adverse events occurring during interhospital transfer of the critically ill. *Arch. Dis. Child*. 1994; 71: 8–11.
4. Beckmann U., Gillies D.M., Berenholtz S.M., Wu A.W., Pronovost P. Incidents relating to the intra-hospital transfer of critically ill patients. An analysis of the reports submitted to the Australian Incident Monitoring Study in Intensive Care. *Intensive Care Med*. 2004; 30(8):1579-85.
5. Bergez M., Fritsch N., Tran-Van D., Saghi T., Bounkim T., Gentile A., Labadie P., Fontaine B., Ouattara A., Rozé H. PEEP titration in moderate to severe ARDS: plateau versus transpulmonary pressure. *Annals of Intensive Care*. 2019; 9, Article number: 81.
6. Bergman L., Pettersson M., Chaboyer W., Carlström E., Ringdal M. Improving quality and safety during intrahospital transport of critically ill patients: A critical incident study. *Aust. Crit. Care*. 2019; Jan 21. pii: S1036-7314(18)30241-8.
7. Bergman L.M., Pettersson M.E., Chaboyer W.P., Carlström E.D., Ringdal M.L. Safety hazards during intrahospital transport: a prospective observational study. *Crit. Care Med*. 2017;45:e1043-e1049.
8. Bourn S, Wijesingha S., Nordmann G. Transfer of the critically ill adult patient. *B.J.A Education*. 2018; 18(3): 63-8.
9. Doherty P., Digby B. Analysis of critical incidents during the interhospital transport of critically ill patients. *Crit. Care*. 2007; 11(2): 502.
10. Droogh J.M., Smit M., Absalom A.R., Ligtenberg J.J.M, Zijlstra J.G. Transferring the critically ill patient: are we there yet? *Crit. Care*. 2015; 19(1): 62. Published online 2015 Feb 20.
11. Eiding H., Kongsgaard U.E., Braarud A.-C. Interhospital transport of critically ill patients: experiences and challenges, a qualitative study. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med*. 2019; 27: 27.Published online 2019 Mar 4.
12. Fanari Z., Mohammed A.A., Bathina J.D., Hodges D.T., Doorey K., Gagliano N., Garratt K.N., Weintraub W.S., Doorey A.J. Inadequacy of Pulse Oximetry in the Catheterization Laboratory. An Exploratory Study Monitoring Respiratory Status Using Arterial Blood Gases during Cardiac Catheterization with Conscious Sedation. *Cardiovasc. Revasc. Med.* 2019;20(6):461-7.
13. Ge X., Adangwa P., Lim Y.J., Kostov Y., Tolosa L., Pierson R., Herr D., Rao G. Development and characterization of a point-of care rate-based transcutaneous respiratory status monitor. *Med. Eng. Phys*. 2018; 56: 36–41.
14. Geri G., Hernandez G., Vieillard-Baron A.Lactate kinetics in critically ill: a new prognostic marker or just another brick in the wall? *Intensive Care Medicine*. 2019; 45 (1): 113–4.
15. Iwashyna T.J., Christie J.D., Kahn J.M., Asch D.A. Uncharted paths: hospital networks in critical care. *Chest.* 2009; 135:827–33.
16. Jastremski M.S., Dumas M., Penalver L. Emergency procedures. *The American Journal of Emergency Medicine*. 1993; 11 (1): 90.
17. Jia L., Wang H., Gao Y., Liu H., Yu K. High incidence of adverse events during intra-hospital transport of critically ill patients and new related risk factors: a prospective, multicenter study in China. *Crit. Care.* 2016; 20:12.
18. Kahn J.M., Linde-Zwirble W.T., Wunsch H., Barnato A.E., Iwashyna T.J., Roberts M.S., et al. Potential value of regionalized intensive care for mechanically ventilated medical patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2008;177:285–91.
19. Kanter R.K., Tompkins J.M. Adverse events during interhospital transport: physiologic deterioration associated with pretransport severity of illness. *Pediatrics.* 1989;84:43–8.
20. Knight P.H., Maheshwari N., Hussain J., Scholl M., Hughes M., Papadimos T.J., Guo W.A., Cipolla J., Stawicki S.P., Latchana N. Complications during intrahospital transport of critically ill patients: Focus on risk identification and prevention. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci.* 2015; 5(4):256-64.
21. Kreeftenberg H.G.Jr., Ligtenberg J.J., Arnold L.G., van der Werf T.S., Tulleken J.E., Zijlstra J.G. Condition on arrival of transferred critically ill patients. *Neth. J. Med*. 2000; 57(5):180-4.
22. Kulshrestha A., Singh J. Inter-hospital and intra-hospital patient transfer: Recent concepts. *Indian J. Anaesth*. 2016; 60(7): 451–7.
23. Ligtenberg J.J.M., Arnold L.G., Stienstra Y., van der Werf T.S., Meertens J.H.J.M., Tulleken J.E., et al. Quality of interhospital transport of critically ill patients: a prospective audit. *Crit. Care*. 2005;9:R446–51.
24. Mercat A., Richard J.-CM., Vielle B., Jaber S., Osman D., Diehl J.-L. et al. Expiratory Pressure (Express) Study Group: positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2008; 299:646–55.
25. Moler F.W., Palmisano J.M., Custer J.R., Bartlett R.H. Mechanical ventilation and arterial blood gas measurements 24 hours postextracorporeal life support for survivors of pediatric respiratory failure. *Crit. Care Med*. 1996;24(4):679-82.
26. Mueller S.K., Fiskio J., Schnipper J. Interhospital Transfer: Transfer Processes and Patient Outcomes. *J. Hosp. Med.* 2019;14(8):486-91.
27. Rouby J-J., Brochard L. Tidal recruitment and over inflation in acute respiratory distress syndrome: yin and yang. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2007;175:104–6.
28. Szem J.W., Hydo L.J., Fischer E., Kapur S., Klemperer J., Barie P.S. High-risk intrahospital transport of critically ill patients: safety and outcome of the necessary "road trip". *Crit. Care Med*. 1995;23(10):1660-6.
29. Veiga V.C., Postalli N.F., Alvarisa T.K., Travassos P.P., Vale R.T.D.S., Oliveira C.Z., Rojas S.S.O. Adverse events during intrahospital transport of critically ill patients in a large hospital. *Rev. Bras. Ter. Intensiva*. 2019;31(1):15-20.
30. Wallen E., Venkataraman S.T., Grosso M.J., Kiene K., Orr R.A. Intrahospital transport of critically ill pediatric patients. *Crit. Care Med*. 1995; 23:1588–95.
31. Warren J., Fromm R.E.Jr., Orr R.A., Rotello L.C., Horst H.M. American College of Critical Care Medicine. Guidelines for the inter- and intrahospital transport of critically ill patients. *Crit. Care Med*. 2004; 32(1):256-62.
32. Waydhas C., Schneck G., Duswald K.H. Deterioration of respiratory function after intra-hospital transport of critically ill surgical patients. *Intensive Care Med*. 1995;21(10):784-9.

Поступила 10.11.19
Принята к печати 20.11.19

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-90-94

ИММУНОЛОГИЯ

Соснина О.Ю.[1], Николаева А.М.[1], Вязникова Т.В.[1], Фельдблюм И.В.[2], Субботина К.А.[2]

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОТИВОКОКЛЮШНОГО ИММУНИТЕТА

[1]Филиал АО «НПО «Микроген», 614089, Пермь, Россия;
[2]ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А.Вагнера» Минздрава РФ, 614089, Пермь, Россия

Цель исследования – изучить возможность применения разработанной иммуноферментной тест-системы «ИФА Анти-К» для оценки противококлюшного иммунитета. Проведена сравнительная оценка содержания коклюшных антител в сыворотках крови взрослых, беременных и детей 6 лет в реакции агглютинации, в тест-системе «ИФА Анти-К» и тест-системах зарубежного производства. Тест-система «ИФА Анти-К» дает возможность выявлять уровень специфических антител как к цельноклеточному, так и бесклеточному коклюшному компоненту вакцины на любой стадии цикла вакцинации. Данный диагностический тест может быть использован и для определения тактики иммунизации, и для оценки популяционного иммунитета.

Ключевые слова: *«ИФА Анти-К»; противококлюшный иммунитет; реакция агглютинации; иммуноферментный анализ.*

Для цитирования: *Соснина О.Ю., Николаева А.М., Вязникова Т.В., Фельдблюм И.В., Субботина К.А.Изучение возможности использования иммуноферментной тест-системы для оценки противококлюшного иммунитета. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 90-94. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-90-94*

Sosnina O.Yu.[1], Nikolaeva A.M.[1], Vyaznikova T.V.[2], Feldblum I.V.[2], Subbotina K.A.[2]

STUDYING THE POSSIBILITY OF USING IMMUNO-ENZY TEST SYSTEM FOR EVALUATING ANTI-PERTUSSIS IMMUNITY

[1]Submittal of Federal State Unitary Enterprise "Scientific and Production Association for Immunological Preparations "Microgen" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 614089, Perm, Russia;
[2]Perm State Medical University named after Academician EA Wagner Health Ministry of Russia, 614990, Perm, Russia

A research objective - to study the possibility of using the ELISA Anti-K enzyme immunoassay system to evaluate anti-pertussis immunity. A comparative assessment of the content of co-crank antibodies in the blood serum of adults, pregnant women and children 6 years old in the agglutination test, in the test system "Anti-K ELISA" and test systems of foreign production was carried out. The "Anti-K" IFA test system makes it possible to detect the level of specific antibodies to both the whole cell and cell-free pertussis component of the vaccine at any stage of the vaccination cycle. This diagnostic test can be used to determine the tactics of immunization, and to assess population immunity.

Keywords: *"Anti-K" IFA; anti-pertussis immunity; agglutination reaction; enzyme immunoassay.*

For citation: *Sosnina O.Yu., Nikolaeva A.M., Vyaznikova T.V., Feldblum I.V., Subbotina K.A. Studying the possibility of using immuno-enzy test system for evaluating anti-pertussis immunity. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 90-94 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-90-94*

For correspondence*: Subbotina K.A.,* Ph.D., Assistant Professor of the Department of Epidemiology; e-mail: ka.subbotina@bk.ru

Information about authors*:*

Sosnina O.Yu. https://orcid.org/0000-0003-2800-0654

Nikolaeva A.M. https://orcid.org/0000-0002-3160-518X

Vyaznikova T.V. https://orcid.org/0000-0003-0497-9757

Feldblyum I.V. http://orcid.org/0000-0003-4398-5703

Subbotina K. A. http://orcid.org/0000-0002-0060-625

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

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

Received 24.10.2019
Accepted 01.11.2019

Для корреспонденции: *Субботина Ксения Андреевна*, канд. мед. наук, доц. каф. эпидемиологии с курсом гигиены и эпидемиологии; e-mail: ka.subbotina@bk.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-65-2-90-94

Введение. Коклюш остается до настоящего времени одной из серьезных проблем здравоохранения не только для России, но и для всего мирового сообщества. В мире ежегодно регистрируется около 50 млн случаев коклюша, около 300 тысяч завершается летальным исходом. В России заболеваемость коклюшем находится на спорадическом уровне, ежегодно регистрируется более 4000 случаев, при этом следует заметить, что истинный уровень заболеваемости значительно выше. В последние годы на ряде территорий РФ отмечается активизация эпидемического процесса коклюшной инфекции [1, 2].

Низкий уровень заболеваемости коклюшем, сформировавшийся в большинстве субъектах РФ, и несоответствие его истинному распространению не позволяют оценивать эффективность проводимой массовой иммунизации по такому объективному критерию как заболеваемость. Контроль качества проводимой вакцинопрофилактики по показателям документированной привитости субъективен и формален, так как не отражает главного результата – фактической защищенности населения [3].

В свете вышеизложенного особую значимость в условиях гетерогенности прививаемых популяций и единой для всех регионов России схемы иммунизации приобретает серологический контроль популяционного иммунитета, формируемого как в результате массовой вакцинопрофилактики, так и после перенесенной инфекции [3]. Серологический мониторинг состояния поствакцинального иммунитета регламентирован нормативными документами Роспотребнадзора и осуществляется органами и учреждениями здравоохранения и государственной санитарно-эпидемиологической службы с 2003 года, являясь важной составной частью эпидемиологического надзора за инфекциями. Основные задачи серологического мониторинга: контроль качества проводимой иммунизации, определение групп повышенного риска инфицирования, оценка скрытой компоненты эпидемического процесса, активное выявление больных и обеспечение гибкости календаря профилактических прививок [4]. Следует отметить, что применительно к коклюшной инфекции надежный инструмент для осуществления серологического мониторинга отсутствует.

Согласно документам ВОЗ существуют только два утверждённых метода для оценки противококлюшного иммунитета: нейтрализация коклюшного токсина на клетках *Vero* и реакция агглютинации [5]. С начала применения вакцин против коклюша реакция агглютинации являлась и является по настоящее время классическим методом определения коклюшных антител и применяется для определения эффективности иммунизации и оценки противококлюшного иммунитета [6].

Реакция агглютинации (РА) обладает целым рядом существенных недостатков: невозможность получения точного количественного результата, т.к. учет проводится визуально и поэтому достаточно субъективен; тест очень длителен по времени - учет результатов проводится только через сутки после постановки реакции. К тому же РА не применима в случае оценки иммунного статуса людей, иммунизированных вакцинами, содержащими бесклеточный коклюшный компонент [7].

Выгодно отличается в этом плане экспрессный, количественный и более чувствительный метод исследования - иммуноферментный анализ (ИФА) [8].

Существуют импортные иммуноферментные тест-системы (ИФТС), в которых твердая фаза сенсибилизируется одним или несколькими индивидуально очищенными антигенами *Bordetella pertussis* (токсином, филаментозным гемагглютинином и липополисахаридом - ИФТС фирмы MyBioSourse; токсином и филаментозным гемагглютинином - ИФТС фирмы Savyon; в основном токсином - ИФТС фирм DRG), что является их существенным недостатком, поскольку до настоящего времени остается не ясна роль отдельных антигенов *Bordetella pertus*sis в развитии заболевания, а также в отношении их вклада в обеспечение протективной функции иммунопрофилактических препаратов [9, 10, 11]. Поэтому использование как можно большего количества коклюшных антигенов для фиксации их на твердой фазе позволяет более полно выявлять спектр специфических антител в сыворотках крови людей.

Отечественных иммуноферментных тест-систем для оценки противококлюшного иммунитета нет.

В связи с этим в Филиале АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» разработана иммуноферментная тест-система для определения коклюшных антител («ИФА Анти-К»), получен патент (RU 2582959 C1).

Цель работы – изучить возможность применения разработанной иммуноферментной тест-системы «ИФА Анти-К» для оценки противококлюшного иммунитета.

Материал и методы. «ИФА Анти-К» - иммуноферментная тест-система для выявления коклюшных антител в сыворотках крови человека (Филиал АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»). Метод определения основан на взаимодействии антигенов *Bordetella pertussis*, иммобилизованных на полистироловом планшете, с антителами против *Bordetella pertussis*, содержащимися в сыворотке крови. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляют с помощью конъюгата антител против IgG человека, меченных пероксидазой, которая обусловливает расщепление перекиси водорода, регистрируемое по изменению окраски индикатора тетраметилбензидина (ТМБ).

В качестве иммуносорбента использовали смесь обезвреженной формальдегидом и теплом (прогревание при 30-35 ^{o}С) антигенной фракции *Bordetella pertussis*, очищенной методом хроматографии и ультрафильтрации без разделения компонентов, включающей антигены: токсин (КТ), пертактин (ПРН), фимбриальные агглютиногены (2 и 3 типов), филаментозный гемагглютинин (ФГА), и коклюшной суспензии инактивированной, субстанции (цельноклеточный антиген), сорбированных в лунках 96-луночного планшета для иммунологических реакций.

Антигены *Bordetella pertussis* эквивалентны антигенам, использующимся в составе комбинированных вакцин (содержащими коклюшный компонент (цельноклеточный и бесклеточный)).

Концентрацию антител класса IgG против *Bordetella pertussis* в иммуноферментных единицах (ИЕ/мл) определяли по калибровочной кривой. Положительный контрольный образец, используемый для построения кривой, был аттестован в реакции иммуноферментного анализа по референс-образцу (стандартному образцу предприятия), откалиброванному в реакции агглютинации.

В качестве диагностических препаратов сравнения использовали:

коклюшный диагностикум для реакции агглютинации (НПО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Москва);

иммуноферментные тест-системы зарубежного производства: Human Anti-Pertussis IgG ELISA Assay (Xpres-

Таблица 1

Сравнительная оценка определения уровня антител в сыворотках крови человека с использованием «ИФА Анти-К» и реакции агглютинации

Обследованные	Кол-во сывороток, шт.	Показатели		
		СГТ		r
		«ИФА Анти-К»*	РА**	
Взрослые	318	**87,4** [77,7-98,2]	**51,8** [43,4-61,9]	0,7
Беременные женщины	140	**45,5** [40,1-51,6]	**38,1** [31,5-46,0]	0,7
Дети 6 лет	135	**55,9** [44,8-67,9]	**189,6** [148,2-243,0]	0,7

Примечание. * – ИЕ/мл; ** – величина, обратная разведению.

sBio, США); Enzyme Immunoassay for the detection of human IgG antibodies against Bordetella Pertussis in serum and plasma (MyBioSourse, Inc., США); Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the semi-quantitative determination of specific IgG antibodies to Bordetella Pertussis in human serum (Savyon Diagnostics Ltd., Израиль).

Оценка возможности использования разработанной иммуноферментной тест-системы «ИФА Анти-К» для оценки противококлюшного иммунитета проведена на основании сравнительной оценки содержания коклюшных антител в сыворотках крови взрослых (*n*=318), беременных (*n*=140) и детей 6 лет (*n*=135). Сыворотки были протестированы параллельно в реакции агглютинации (РА) и в тест-системе «ИФА Анти-К». Сыворотки крови взрослых (*n*=64), а также детей, иммунизированных вакциной Пентаксим, содержащей в своем составе бесклеточный коклюшный компонент (коклюшный анатоксин и филаментозный гемагглютинин) (*n*=24), были протестированы параллельно в РА и ИФА с помощью «ИФА Анти-К» и тест-систем зарубежного производства.

Были рассчитаны средние геометрические титра (СГТ) и доверительные интервалы для каждой группы, рассчитан коэффициент корреляции (r) между результатами, полученными в ИФА и РА.

Согласно МУ 3.1.2.2160-07 [4] уровень антител при титре 1:160 в реакции агглютинации считается условно-защитным, а 1:320 и выше – защитным. Поскольку защитный уровень коклюшных антител в реакции иммуноферментного анализа не установлен, была проведена оценка уровня защитных антител при параллельном титровании сывороток крови в РА и ИФА. Образцами служили сыворотки крови иммунизированных детей, участвовавших в клинических испытаниях новых отечественных комбинированных вакцин АКДС-Геп В+ХИБ и аАКДС-Геп В+ХИБ (*n*=640), сыворотки крови взрослых (*n*=458) и детей 6 лет (*n*=135). Всего протестировано 1233 пробы.

Все сыворотки крови разделили на 4 группы по результатам определения титров коклюшных антител в реакции агглютинации: 1 группа - титр в РА менее 1:160; 2 группа - 1:160; 3 группа –1:320; 4 группа – более 1:320. Затем определили содержание коклюшных антител во всех сыворотках в реакции иммуноферментного анализа с использованием разработанной тест-системы. Рассчитали среднюю геометрическую титра и доверительные интервалы в каждой группе сывороток.

На следующем этапе исследования была проведена оценка возможности использования разработанной тест-системы для контроля иммуногенности комбинированных вакцин по содержанию специфических антител в сыворотках крови иммунизированных детей, участвовавших в клинических испытаниях новых отечественных комбинированных вакцин АКДС-Геп В+ХИБ и аАКДС-Геп В+ХИБ (*n*=640).

Оценка иммуногенности комбинированных вакцин проводилась по уровню сероконверсии (%), фактору сероконверсии и СГТ антител. Уровень сероконверсии рассчитывался как процент детей, у которых титр антител после вакцинации увеличился не менее чем в 1,5 раза, фактор сероконверсии – во сколько раз увеличился уровень коклюшных антител после вакцинации по сравнению с исходным уровнем. Кроме того, был рассчитан уровень серопротекции (т.е. процент добровольцев с титрами антител выше установленного условно-защитного уровня против коклюша).

Результаты и обсуждение. Сравнительная оценка определения уровня коклюшных антител в сыворотках крови человека с использованием «ИФА Анти-К» и реакции агглютинации показала, что в среднем коэффициент корреляции между результатами, полученными с помощью разработанной тест-системы и реакции агглютинации, составил 0,7 (высокая степень связи по шкале Чеддока), что является хорошим показателем для столь различных методов (табл.1).

Было установлено также, что результаты определения уровня коклюшных антител с помощью «ИФА Анти-К» сопоставимы с данными, полученными в реакции агглютинации, в отличие от результатов, полученных с помощью зарубежных тест-систем (табл. 2).

Результаты определения коклюшных антител в сыворотках крови детей, иммунизированных вакциной Пентаксим (коклюшный компонент вакцины включает в себя коклюшный анатоксин и филаментозный гемагглютинин), показали, что реакция агглютинации не может быть использована для адекватной оценки противококлюшного иммунитета в сыворотках крови людей, иммунизированных вакцинами, не содержащими агглютиногены в своем составе. Разработанная ИФТС выявляет

Таблица 2

Сравнительная оценка определения уровня антител в сыворотках крови взрослых (*n*=64) с использованием «ИФА Анти-К» и зарубежных иммуноферментных тест-систем

Показатели	ИФА				РА, величина, обратная разведению
	«ИФА Анти-К», ИЕ/мл	XpressBio, U/ml	MyBioSource, U/ml	Savyon, BU/ml	
СГТ	**92,5** [67,0-127,8]	**13,5** [10,7-17,0]	**53,6** [44,4-64,8]	**21,5** [16,4-28,1]	**220,1** [139,7-346,8]
r с РА	0,8	0,2	0,4	0,5	

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-65-2-90-94

антитела ко всему комплексу коклюшных антигенов, что позволяет проводить серологический мониторинг после иммунизации всеми комбинированными вакцинами, содержащими как клеточный, так и бесклеточный коклюшный компонент. При этом данные, полученные с помощью «ИФА Анти-К» сопоставимы с данными, полученными при использовании тест-системы зарубежного производства (p>0,05) (табл. 3).

Таким образом, проведенные скрининговые исследования показали высокую степень корреляции данных, полученных с помощью разработанной тест-системы и реакции агглютинации, которая является классическим методом определения коклюшных антител в сыворотках крови людей, что позволило перейти к следующему этапу работы - определению защитного уровня коклюшных антител в реакции иммуноферментного анализа (табл. 4).

В результате параллельного титрования 1233 сывороток крови в РА и ИФА было установлено, что титр от 80 до 120 ИЕ/мл (т.е. 100 ИЕ/мл ± 20 %) можно считать условно-защитным, титр более 120 ИЕ/мл – защитным.

В результате проведенных исследований по оценке возможности использования разработанной тест-системы для контроля иммуногенности комбинированных вакцин было установлено, что уровень серопротекции, уровень сероконверсии и фактор сероконверсии в ИФА и РА существенно не отличались (p>0,05). Это свидетельствует о перспективности использования разработанной ИФТС для оценки эффективности иммунизации населения против коклюша (табл. 5 и 6).

Заключение. В наблюдениях на людях была обоснована возможность использования разработанной иммуноферментной тест-системы «ИФА Анти-К» для оценки эффективности иммунизации. Исследуемая тест-система дает возможность выявлять уровень коклюшных антител на любой стадии цикла вакцинации, что может служить основанием для определения тактики иммунизации. Поскольку данная тест-система позволяет определять в сыворотке крови антитела не только к цельноклеточному коклюшному компоненту вакцин, но и к бесклеточному, она может быть рекомендована и для оценки популяционного противококлюшного иммунитета в условиях широкого использования на практике комбинированных вакцин.

Основными преимуществами разработанной ИФТС по сравнению с реакцией агглютинации являются экспрессность, автоматизация анализа, стандартизация результатов, исключение субъективизма в интерпретации, определение специфических антител ко всему спектру коклюшных антигенов, легкость проведения анализа, возможность количественной оценки, а также низкая стоимость набора реагентов.

В заключение следует отметить, что разработанная ИФТС открывает широкие возможности для проведения эпидемиологических исследований по объективной оценке эффективности массовой иммунизации против коклюша, а также характеристики иммунной структуры населения.

Таблица 3

Результаты определения коклюшных антител в сыворотках крови детей, иммунизированных вакциной Пентаксим

№	ИФА Анти-К, ИЕ/мл	Savyon, BU/ml	XpressBio, U/ml	РА, величина, обратная разведению
1	80,8	74,0	101,0	отр.
2	46,8	36,0	46,5	отр.
3	44,3	16,0	26,9	отр.
4	46,5	52,0	110,8	отр.
5	54,9	37,0	71,8	отр.
6	44,2	68,0	94,0	отр.
7	76,1	70,0	94,8	отр.
8	104,5	50,0	37,6	отр.
9	52,3	57,0	85,1	отр.
10	37,4	52,0	98,5	отр.
11	41,0	41,0	90,7	отр.
12	61,9	66,0	90,7	отр.
13	63,4	55,0	80,7	отр.
14	26,8	17,0	41,1	отр.
15	45,1	53,0	63,4	80
16	79,6	62,0	73,1	20
17	26,9	38,0	69,1	отр.
18	55,2	50,0	93,1	отр.
19	16,6	38,0	54,3	отр.
20	66,2	57,0	101,3	отр.
21	55,9	53,0	95,1	20
22	72,6	70,0	112,2	320
23	24,1	32,0	32,6	отр.
24	51,8	65,0	87,7	отр.
СГТ	**49,1 [40,9-58,8]**	**47,2 [39,9-56,0]**	**72,1 [60,7-85,6]**	**2,0 [1,0-3,9]**

Таблица 4

Определение защитного уровня коклюшных антител в ИФА

Группа	кол-во, шт.	Средняя геометрическая титра (СГТ)							
		1 группа		2 группа		3 группа		4 группа	
		РА*	ИФА**	РА	ИФА	РА	ИФА	РА	ИФА
Дети	640	**21,6** [19,6-23,8]	**17,1** [14,7-19,9]	**160,0**	**70,4** [60,4-82,0]	**320,0**	**126,8** [110,8-145,0]	**963,8** [888,8-1045,1]	**254,4** [233,9-287,6]
Беременные	140	**26,7** [23,0-31,0]	**39,2** [34,6-44,4]	**160,0**	**73,8** [57,8-94,3]	**320,0**	**93,6** [39,3-222,7]	**735,2** [500,0-1080,8]	**185,6** [92,4-372,9]
Взрослые	318	**21,5** [19,1-24,2]	**61,4** [54,1-69,7]	**160,0**	**119,3** [94,9-150,0]	**320,0**	**198,2** [140,1-280,4]	**1338,5** [1038,9-1724,6]	**359,0** [282,5-456,3]
Дети 6 лет	135	**36,2** [29,7-44,0]	**16,3** [12,9-20,7]	**160,0**	**35,7** [23,8-53,7]	**320,0**	**125,0** [99,4-157,2]	**822,4** [738,2-916,1]	**151,4** [138,3-165,9]
Среднее значение		26,5	33,5	160,0	74,8	320,0	135,9	965,0	237,6

Примечание. * - величина, обратная разведению; ** - ИЕ/мл.

Таблица 5

Определение уровня антител в сыворотках крови детей с использованием «ИФА Анти-К» и реакции агглютинации

Группа детей	кол-во проб, шт.	Средняя геометрическая титра (СГТ)			
		до иммунизации		после иммунизации	
		ИФА*	РА**	ИФА	РА
АКДС-Геп В +ХИБ	160	**25,8** [17,7-37,6]	**50,2** [34,4-73,3]	**102,0** [77,1-135,0]	**215,3** [155,3-298,6]
АКДС-Геп В+Хиберикс	160	**24,0** [17,1-33,8]	**49,7** [34,1-72,5]	**126,2** [96,1-165,6]	**215,3** [150,0-309,1]
Инфанрикс-Гекса	160	**24,2** [16,9-34,7]	**36,2** [25,4-51,8]	**99,0** [82,0-119,5]	**164,8** [121,0-224,6]
аАКДС-Геп В +ХИБ+ Полиорикс	160	**37,1** [25,5-54,1]	**51,7** [34,6-77,4]	**136,2** [105,9-175,3]	**200,9** [143,5-281,3]

Примечание. * - ИЕ/мл; ** - величина, обратная разведению.

Таблица 6

Результаты исследования иммуногенности вакцин по коклюшному компоненту

Группа детей	Уровень серопротекции до вакцинации, %		Уровень серопротекции после вакцинации, %		Уровень сероконверсии, %		Фактор сероконверсии	
	ИФА	РА	ИФА	РА	ИФА	РА	ИФА	РА
АКДС-Геп В +ХИБ	28,8	37,5	62,5	70,0	76,3	72,5	4,0	4,3
АКДС-Геп В+Хиберикс	21,3	33,8	68,8	73,8	77,5	80,0	5,3	4,3
Инфанрикс-Гекса	23,8	33,8	60,0	62,5	63,8	71,3	4,1	4,5
аАКДС-Геп В+ХИБ+Полиорикс	40,0	46,3	72,5	66,3	70,0	62,5	3,7	3,9
Итого	28,5	37,9	66,0	68,2	71,9	71,6	4,3	4,3

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Таточенко В.К. Коклюш — недоуправляемая инфекция. *Вопросы современной педиатрии*. 2014; 13 (2): 78—82.
2. Global Health Observatory Data Repository. Available at http://apps.who.int/ gho/data/node.main.ChildMortREG100?langen; accessed July 2015.
3. Фельдблюм И.В. Эпидемиологический надзор за вакцинопрофилактикой. *Журнал Медиаль*. 2014; 3(13): 37-55.
4. МУ 3.1.2.2160-07 Методические указания. П.1.2. Профилактика инфекционных заболеваний. Инфекции дыхательных путей. Эпидемиологический надзор за коклюшной инфекцией: 2007.
5. WHO/DRAFT|11 June 2010.
6. МУ 3.1.2943-11 « Профилактика инфекционных болезней. Организация и проведение серологического мониторинга к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)»: 2011.
7. Гореликова Е.В. Оптимизация клинико-лабораторной диагностики и эпидемиологического надзора за коклюшем. Дис. … канд. мед. наук. Пермь; 2006.
8. Николаева А.М. Конструирование комбинированных вакцин и иммуноферментных тест-систем для профилактики и диагностики управляемых инфекций (дифтерия, столбняк, коклюш, гепатит В). Дис. … докт. биол. наук. Челябинск; 2003.
9. Вакцины против коклюша: позиция ВОЗ, август 2015. Еженедельный эпидемиологический отчет. 28 августа 2015 г. 35; 433-60.
10. Ценева Г.Я. Современные вопросы биологии и мониторинга возбудителей иерсиниозов, коклюша, дифтерии, совершенствование диагностики инфекций. СПб.: Питер; 2013.
11. Vaccines. 4th ed., by S.A. Plotkin, and W.A. Orenstein (Elsevier, 2004):1696.

REFERENCES

1. Tatochenko V.K. Pertussis - mismanaged infection. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2014; 13 (2): 78—82. (in Russian)
2. Global Health Observatory Data Repository. Available at http://apps.who.int/ gho/data/node.main.ChildMortREG100?langen; accessed July 2015.
3. Fel'dblyum I.V. Epidemiological surveillance of vaccine prevention. *Zhurnal Medial'*. 2014; 3(13): 37-55. (in Russian)
4. MU 3.1.2.2160-07 Metodicheskie ukazaniya. P.1.2. Prevention of infectious diseases. Respiratory tract infections. Epidemiological surveillance of pertussis infection: 2007. (in Russian)
5. WHO/DRAFT|11 June 2010.
6. MU 3.1.2943-11 « Prevention of infectious diseases. Organizing and conducting serological monitoring for infections controlled by specific prophylaxis (diphtheria, tetanus, whooping cough, measles, rubella, mumps, poliomyelitis, hepatitis B)»: 2011. (in Russian)
7. Gorelikova E.V. Optimization of clinical and laboratory diagnosis and epidemiological surveillance of pertussis. Dis. … Perm'; 2006. (in Russian)
8. Nikolaeva A.M. Designing combined vaccines and enzyme immunoassay systems for the prevention and diagnosis of controlled infections (diphtheria, tetanus, whooping cough, hepatitis B). Dis. … Chelyabinsk; 2003. (in Russian)
9. Whooping cough vaccines: pozitsiya VOZ, avgust 2015. Ezhenedel'nyi epidemiologicheskiy otchet. 28.08. 2015; 35: 433-60. (in Russian)
10. Tseneva G.Ya. Modern questions of biology and monitoring of pathogens of yersiniosis, whooping cough, diphtheria, improving the diagnosis of infections [Sovremennye voprosy biologii I monitoringa vozbuditeley Yersiniosis, koklyusha, difterii, sovershenstvovanie diagnostiki infektsiy]. St.Petersburg: Piter; 2013. (in Russian)
11. Vaccines. 4th ed. S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, eds. (Elsevier, 2004):1696.

Поступила 24.10.19
Принята к печати 01.11.19

Исаева О.В. [1,2], Ильченко Л.Ю. [1,2], Кичатова В.С.[1,2], Потемкин И.А. [1,2], Амон Е.П.[1], Сарыглар А.А.[3], Аль-Шараби Шукри А.С.[4], Кюрегян К.К.[1,2], Михайлов М.И.[1,2]

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТОВ В И D В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ И СУХОЙ КАПЛЕ КРОВИ

[1]ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, 125993, МоскваРоссия;
[2]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;
[3] ГБУЗ РТ «Инфекционная больница»,667003, Кызыл, Республика Тыва, Россия;
[4] ФГАОУ ВО «Российский университет Дружбы народов», 117198, Москва, Россия

Целью данного исследования явилась оценка частоты выявления основных маркёров инфицирования вирусами гепатитов В и дельта (D) в сыворотке крови, слюне и сухой капле крови (СКК) как возможного варианта для серологических исследований среди населения эндемичного региона в условиях ограниченных лабораторных ресурсов. Для этого исследованы парные образцы сыворотки крови и СКК, сыворотки крови и слюны от больных хроническим гепатитом В с дельта-агентом, проживающих в Республике Тыва, которая является эндемичным по данному заболеванию регионом. В образцах сыворотки крови HBsAg выявлен у 289 (100%) больных, в образцах слюны – у 88/92 (95,7%), в образцах СКК, хранившихся при комнатной температуре 3 года – в 60/80 (75%), образцах СКК, хранившихся в тех же условиях 1 год – в 111/117 (94,9%). Анти-HBcore определили в 209 (100%) образцах сыворотки крови, в то время как в образцах слюны и СКК этот маркёр выявили только в 13,04% (12/92) и 19,7% (23/117), соответственно. Анти-ВГD в сыворотке крови присутствовали в 209 (100%) образцах, собранных от пациентов в 2017-2018 гг. В образцах слюны и СКК антитела к вирусу ГD не были выявлены ни в одном случае. По-видимому, такая разница в выявлении антител к HBcAg и анти-ВГD обусловлена тем, что белок core является более сильным иммуногеном, приводящим к выработке анти-HBcore в высокой концентрации. Вероятно, концентрация антител к вирусу гепатита D значительно ниже, что объясняет их отсутствие в слюне и СКК у больных ХВГ В+D. Образцы биологических сред организма (слюна), а также сухая капля крови могут служить альтернативным материалом для выявления HBsAg не только при скрининге, но и в научных лабораторных исследованиях. В то же время определение анти-ВГD не представляется возможным в связи с получением ложноотрицательных результатов. Ввиду высокой вероятности суперинфицирования вирусом ГD больных с ХГВ на эндемичных территориях, в случае выявлении HBsAg в альтернативных клинических материалах (слюна, СКК) маркеры инфицирования ВГD следует определять в сыворотке крови.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *гепатит B; гепатит D; HBsAg; анти-HBcore; анти-ВГD; выявление серологических маркеров; лабораторные исследования.*

Для цитирования: *Исаева О.В., Ильченко Л.Ю. Кичатова В.С., Потемкин И.А., Амон Е.П., Сарыглар А.А., Аль-Шараби Шукри А.С., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Выявление маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и D в биологических средах и сухой капле крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 95-99. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99*

Isaeva O.V. [1,2], Ilchenko L.Yu. [1,2], KichatovaV.S.[1,2], Potemkin I.A. [1,2], Amon E.P. [2], Saryglar A.A.[3], Al-Sharabi Shukri A.S.[4], Kyuregyan K.K.[1,2], Mikhailov M.I.[1,2]

DETECTION OF MARKERS OF HEPATITIS B AND D VIRUS INFECTION IN BIOLOGICAL MEDIA AND DRIED BLOOD SPOTS

[1]Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, 125993, Moscow, Russia;
[2] Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;
[3] Infectious Hospital, 667003, Kyzyl, Republic Tyva, Russia;
[4] Peoples, Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia

The aim of this study was to assess the rates of detection of the major markers of infection with hepatitis B and Delta (D) viruses in serum, saliva and dry blood dots (DBS) as a possible option for serological studies among the population of the endemic region in conditions of limited laboratory resources. For this purpose, paired samples of blood serum and DBS, blood serum and saliva from patients with chronic hepatitis B with Delta agent living in the Republic of Tyva, which is endemic for this disease. HBsAg was detected in 289 (100%) serum samples, in 88/92 (95.7%) saliva samples, in 60/80 (75%) DBS samples, stored three years at room temperature, and in 111/117 (94.9%) DBS stored one year at the same conditions. Anti-HBcore was detected in 209 (100%) serum samples, while in saliva and DBS samples this marker was detected in only 13.04% (12/92) and 19.7% (23/117), respectively. Anti-HDV antibodies in serum were detected in 209 (100%) samples collected from patients in 2017-2018. In saliva and DBS anti-HDV were not detected in any sample. This difference in the detection rates of anti-HBcore and anti-HDV might be accounted for the fact that the HBV core protein is a very strong immunogen, indusing the production of anti-HBcore in high concentrations. Probably, the concentration of anti-HDV is much lower, which explains its absence in saliva and DBS in patients with hepatitis B+D. Samples of biological media (saliva), as well as DBS can serve as an alternative material for the detection of HBsAg in screening and research prevalence studies. Meanwhile, the definition of anti-HDV in such media is not possible due to the false negative results. Due to the high probability of superinfection with HDV in patients with HBV in endemic areas, the detection of HBsAg in alternative media (saliva or DBS) should be followed by testing for anti-HDV in serum samples.

K e y w o r d s : *hepatitis B; hepatitis D; HBsAg; anti-HBcore; anti-HDV; detection of serological markers; laboratory tests.*

Для корреспонденции: *Исаева Ольга Владиславовна*, канд. биол. наук, вед. науч.сотр. НИИ молекулярной и персонализированной медицины, вед. науч. сотр. лаб. вирусных гепатитов НИИВС им. И.И. Мечникова; e-mail: isaeva.06@mail.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99

For citation: *Isaeva O.V., Ilchenko L.Yu., Kichatova V.S., Potemkin I.A., Amon E.P., Saryglar A.A., Al-Sharabi Shukri A.S., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Detection of markers of hepatitis B and D virus infection in biological media and dried blood spots. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 95-99. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99*

For correspondence: *Isaeva O.V.,* PhD. Sci. Biol., leading researcher of the research Institute of molecular and personalized medicine at Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, lead researcher of laboratory of viral hepatitis “I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera”; e-mail: isaeva.06@mail.ru

Information about authors:

Isaeva O.V., https://orcid.org/0000-0002-2656-3667
Kyuregyan K.K., http://orcid.org/0000-0002-3599-117X
Potemkin I.A., https://orcid.org/0000-0001-7559-4219
КичатоваV.S., http://orcid.org/0000-0002-7838-6965
Mikhailov M.I., https://orcid.org/0000-0002-6636-6801

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

Acknowledgments. *The study was carried out within the framework of the State task on the theme: Development of a modern system of diagnosis, treatment and prevention of viral hepatitis B, C and D.*

Received 15.12.2019
Accepted 26.12.2020

Введение. Хронический гепатит В с дельта агентом (ГВ+D) является тяжелым заболеванием печени вирусной этиологии, приводящим к быстрому прогрессированию в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному [1]. Механизмы патогенного действия ВГD, связанные с более тяжелым течением заболевания печени и ускоренным развитием фиброза по сравнению с моноинфекцией ВГВ, остаются неясными [2]. Как и ВГВ, вирус гепатита D передается при контакте с кровью или другими физиологическими жидкостями инфицированного человека [3]. Известно, что в инфицированном вирусом гепатита дельта организме больного хроническим гепатитом В одновременно циркулируют антитела к антигенам обоих возбудителей – анти-ВГD, анти-HBcore, а также обязательно наличие HBsAg. Можно предположить, что анти-ВГD, наряду с маркерами ГВ, присутствуют и в образцах слюны и сухой капли крови СКК больных ГВ+D, однако исследования по выявлению анти-ВГD в таких образцах ранее не проводились. Очевидно, что биологический материал инфицированного человека (например, образцы слюны или СКК) могут служить объектом исследования как в серологических, так и в молекулярных тестах. Такие альтернативные типы клинических образцов преимущественно используются для диагностики и мониторинга терапии хронических вирусных заболеваний, таких как вирусные гепатиты В и С, ВИЧ в регионах, где дорогостоящая лабораторная медицинская инфраструктура на местах не может быть предоставлена по экономическим причинам, а также в силу удаленности от крупных лабораторий [4-8]. Тестирование с использованием образцов сухой капли крови намного проще и не требует удаления клеточных компонентов [5,6]. HBsAg и анти-HBcore успешно выявляются и в слюне, однако результаты могут различаться в зависимости от методики сбора ротовой жидкости и метода обнаружения маркера [9-12]. В РФ подобные исследования впервые были проведены еще в 1997 году [13], их результаты продемонстрировали, что HBsAg и анти-HBcore стабильно выявляются в парных образцах слюны и сыворотки крови при хранении при температуре +4°С в течение одного месяца. Ранее было показано, что результаты выявления HBsAg и анти-HBcore в слюне и СКК могут зависеть от срока хранения образцов, однако опубликованные данные по этому вопросу ограничены периодом хранения, не превышавшим 200 дней [14].

Целью данного исследования являлась оценка частоты выявления маркеров ГВ+D в архивных образцах слюны и СКК по сравнению с образцами сыворотки крови. Для этого исследованы пары образцов сыворотки крови и СКК, а также пары образцов сыворотки крови и слюны от больных хроническим гепатитом В+D, проживающих в Республике Тыва, которая является эндемичным по данному заболеванию регионом [15 – 17]. Все материалы были собраны в 2016-2018 гг. и хранились 1-3 года в соответствующих условиях – образцы СКК при комнатной температуре, образцы сыворотки и слюны – при -70°С.

Материал и методы. Исследованы 289 архивных парных образцов сыворотки крови, 92 образца слюны и 197 образцов сухой капли крови (СКК), собранных в 2016, 2017 и 2018 гг. от больных хроническим гепатитом В с D агентом (ХГ В+D), состоящих на учёте в консультативном кабинете (КК) ГБУЗ Инфекционной больницы Республики Тыва. Образцы сыворотки крови (2016-2018 гг.) и слюны (2017 г.) были доставлены в лабораторию с соблюдением холодовой цепи и хранились при температуре -70°С, а образцы СКК, собранные в 2016 г. и 2018 г. – при комнатной температуре (22-25°С) 3 года и 1 год, соответственно.

Во всех образцах сыворотки крови, слюны и СКК определяли HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» («HBsAg-ИФА-БЕСТ» «Вектор HBcAg-антитела» и «Вектогеп D-антитела») согласно инструкции производителя. Для образцов СКК при расчете оптической плотности в качестве отрицательного контроля использовали образцы СКК, полученные от HBsAg-негативных лиц.

Для проведения исследования образцы слюны после оттаивания центрифугировали при 4 000 об/мин в течение 5 мин, супернатант переносили в чистую пробирку. Для работы с СКК вырезали из листа фильтровальной бумаги с сухой каплей крови участок площадью примерно 1 см². Помещали образец СКК в чистую пробирку с 1 мл фосфатно-солевого буфера с твином. Затем проводили ночную инкубацию при комнатной температуре на шейкере. Центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 2 минут. Супернатант использовали для проведения ИФА.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы EXCEL 2003 и программы статистической обработки данных GraphPad Prism 4. Для оценки достоверности различий значений показателей в сравниваемых группах использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% – $p < 0,05$).

Результаты. Результаты выявления HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD в парных образцах сыворотки крови и слюны, собранных от пациентов с хроническим гепатитом B + D и хранившихся в течение 2-х лет при -70°C, представлены в табл. 1. В образцах сыворотки крови HBsAg выявлен у 92 (100%) больных, средняя величина коэффициента позитивности – 35,27±8,69, в парных им образцах слюны – в 88/92 (95,7%), средняя величина коэффициента позитивности составила 26,7±14,87 и не отличалась достоверно от аналогичного показателя для образцов сыворотки крови ($p > 0,05$). При этом необходимо отметить отсутствие корреляционной зависимости между показателями коэффициента позитивности при выявлении данного маркера инфицирования в парных образцах сыворотки крови и слюны ($r^2 = 0,084$). Частота выявления суммарных анти-HBcore в образцах слюны составила 13,04% от аналогичного в парных образцах сыворотки крови (100%), различия статистически достоверны ($p < 0,05$). Средняя величина коэффициента позитивности для данного маркера в сыворотке крови составила 0,043±0,008, в образцах слюны – 0,48±0,035 ($p < 0,05$). Корреляционная зависимость между показателями коэффициента позитивности анти-HBcore в парных образцах сыворотки крови и слюны также отсутствовала ($r^2 = 0,084$). Суммарные анти-ВГD определяли в парных образцах сыворотки крови и образцах слюны. Процент выявления составил 100% (92/92) в сыворотках против 0% (0/92) в образцах слюны ($p < 0,05$).

Результаты серологических исследований по выявлению маркеров ГВ+D в парных образцах сыворотки и сухой капли крови (СКК), собранных в 2016 и 2018 г. (сроки хранения при комнатной температуре 3 и 1 год, соответственно) представлены в табл. 2. В сыворотке крови частота выявления HBsAg составила 100% и не зависела от срока хранения. При аналогичных исследованиях образцов сухой капли крови, хранившихся 3 года, частота выявления была достоверно ниже ($p < 0,05$) и составила 75% (60/80), в образцах, хранившихся 1 год, таких различий нет (94,9% против 100%, $p > 0,05$). Среднее значение коэффициентов позитивности при выявлении HBsAg в образцах сыворотки и СКК (3 года хранения) достоверно отличаются ($p < 0,05$), в образцах после одного года эти показатели для образцов сыворотки и СКК схожи ($p < 0,05$). Корреляционная зависимость между показателями коэффициента позитивности по HBsAg в парных образцах сыворотки и СКК не выявлена ($r^2 = 0,02$). Результаты выявления анти-HBcore и антител к вирусу гепатита дельта в образцах СКК проведены только для образцов, хранившихся 1 год. В сыворотке крови анти-HBcore выявлены в 100% случаев (117/117), а в образцах СКК только в 19,7% (23/117), различия статистически достоверны ($p < 0,05$). Корреляционная зависимость между показателями коэффициентов позитивности анти-HBcore в парных образцах сыворотки крови и СКК отсутствовала ($r^2 = 0,028$). Анти-ВГD были выявлены во всех 117 образцах сыворотки крови после одного года хранения при -70°C, в то время как во всех парных им образцах СКК был получен отрицательный результат (0/117), различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Обсуждение. В последнее время образцы СКК используются для изучения распространенности ВГВ в эндемичных районах и в группах повышенного риска инфицирования [18 – 20]. Одна из задач нашего исследования заключалась в определении зависимости частоты выявления основных маркеров инфицирования вирусом гепатита B (HBsAg и анти-HBcore) в парных архивных образцах слюны, сухой капли крови и сыворотки крови в зависимости от длительности их хранения. Результаты выполненного исследования показали, что в образцах сыворотки крови, хранившихся при температуре -70°C, HBsAg выявляется в 100% случаев, независимо от сроков хранения (3 года).

Ранее J.C.Forbi и соавт. [19] сообщали о низкой чувствительности обнаружения HBsAg в СКК по сравнению с образцами сыворотки (78,6%) . В нашем исследовании не отмечена статистически значимая разница в частоте выявления HBsAg между парными образцами сыворотки крови и СКК, хранившимися 1 год при комнатной температуре (100% против 94,9%). Данное наблюдение подтверждается исследованиями L.M. Villar и соавт. [20], которые описывают применение ИФА для определения HBsAg в образцах СКК с клинической чувствительностью 97,62% . В нескольких исследованиях было показано, что образцы СКК остаются стабильными с течением времени, без каких-либо изменений результатов выявления HBsAg до 63 дней после отбора проб при любых температурах хранения [21,22]. Однако, как показали наши исследования, при длительном, до 3 лет, хранении образцов СКК происходит деградация HBsAg, на что указывает снижение частоты выявления этого маркера до 75%.

G. McAllister и соавт. [23] проводили исследования по оценке выявления HBsAg и анти-HBc в образцах СКК в зависимости от температуры (-70°C, -20°C, 4°C, 22-28°C и 37°C) и длительности хранения (200 дней). Было отмечено значительное снижение частоты обнаружения как HBsAg, так и анти-HBcore уже через 14 дней хранения при положительных температурах во всех условиях хра-

Таблица 1

Частота выявления HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD в парных образцах сыворотки крови и слюны, от пациентов с хроническим гепатитом B + D (срок хранения 2 года)

Маркер инфицирования	Тип образца	
	Сыворотка крови	Слюна
HBsAg (%), (Nпоз/Nобщ)	100% (92/92)	95,7% (88/92)
p*	>0,05	
r^2**	0,084	
КПсред	35,27±8,69	26,7±14,87
Анти-HBcore %, (Nпоз./Nобщ.)	100% (92/92)	**13,04% (12/92)**
P*	**<0,05**	
R²**	0,084	
КПсред	0,043±0,008	0,48±0,035
Анти-ВГD % (N поз./N общ.)	100% (92/92)	**0% (0/92)**
p*	**<0,05**	
r^2**	Не рассчитывали	
КПсред	Не рассчитывали	Не рассчитывали

Примечание. * - критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия при сравнении между образцами сыворотки крови и слюны одного года сбора ($p < 0,05$). ** - коэффициент корреляции сравниваемых величин.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-95-99

Таблица 2

Частота выявления HBsAg, анти-HBcore, анти-ВГD в парных образцах сыворотки крови и сухой капле крови (СКК) от пациентов с хроническим гепатитом В + D (3 года и 1 год хранения)

Маркер инфицирования	Тип образца			
	Сыворотка крови (3 года хранения)	СКК (3 года хранения)	Сыворотка крови (1 год хранения)	СКК (1 год хранения)
HBsAg (%), (Nпоз/Nобщ)	100% (80/80)	**75% (60/80)**	100% (117/117)	94,9% (111/117)
*p**	**<0,05**		>0,05	
r^2**	0,02		0,02	
КПсред	25,33±2,69	5,95±6,87	18,93±7,03	10,44±7,62
Анти-HBcore %, (Nпоз./Nобщ.)	Не исследовали	Не исследовали	100% (117/117)	**19,7% (23/117)**
*p**	Не рассчитывали		**<0,05**	
r^2**			0,028	
КПсред			0,12±0,14	0,49±0,24
Анти-ВГD % (N поз./N общ.)	Не исследовали	Не исследовали	100% (117/117)	**0% (0/117)**
*p**	Не рассчитывали		**<0,05**	
r^2**			Не рассчитывали	
КПсред				

Примечание. * - критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия при сравнении между образцами сыворотки крови и СКК одного года сбора ($p < 0,05$). ** - коэффициент корреляции сравниваемых величин.

нения, за исключением образцов, хранящихся при положительных температурах. В то же время образцы, хранившиеся при -20°С или -70°С показали минимальные изменения в выявлении HBsAg и анти-HBcore вплоть до конечной точки времени (200 дней) хранения [23]. Chee Eng Lee и соавт. [24] показали хорошую корреляцию при определении HBsAg в сыворотке крови и свежих образцах СКК ($r^2 = 0,432$; $p < 0.001$). В нашем исследовании, несмотря на высокие показатели совпадения выявления HBsAg в парных образцах СКК и сыворотки крови, было показано отсутствие корреляционной зависимости между показателями коэффициента позитивности в парах образцов что, по всей вероятности, можно объяснить длительностью хранения этих образцов (1-3 года).

Чувствительность выявления анти-HBcore в образцах СКК также зависит от длительности хранения образцов. Так, по данным L.M. Villar и соавт. [20], уже к 63 дню наблюдения образцов, хранившихся при температуре 22-25°С, происходит значительный рост оптической плотности до значений, соответствующих отрицательным результатам. Нами впервые исследованы архивные образцы СКК, хранившиеся в течение года при комнатной температуре, на наличие анти-HBcore. Полученные результаты показали низкую стабильность данного маркера при длительном хранении образцов СКК, так как только в 19,7% образцов был получен положительный результат при частоте выявления 100% в парных образцах сыворотки крови.

Ранее было показано, что метод элюции образцов СКК не оказывает влияния на результаты выявления маркеров ГВ [21]. Таким образом, именно длительность хранения при комнатной температуре является причиной снижения клинической чувствительности выявления маркеров ГВ в образцах СКК.

Для диагностики вирусного ГВ обычно используют образцы сыворотки крови, что требует венопункции, специального персонала и строгого соблюдения условий биологической безопасности. Как альтернатива могут использоваться образцы слюны, к сбору которых нет таких строгих требований [13, 25-27]. Постановка образцов слюны для выявления HBsAg в тест-системах ИФА обычно проводится без изменений относительно стандартного протокола для образцов сыворотки крови, эксперименты по увеличению периода инкубации показали отсутствие преимущества данного подхода [25, 30]. В данной работе при исследовании образцов слюны методом ИФА на маркеры ГВ+D нами также применялись стандартные протоколы, рекомендованные производителем тест-систем для тестирования образцов сыворотки крови.

По данным литературы, клиническая чувствительность выявления HBsAg методом ИФА в слюне серопозитивных пациентов варьирует от 93,6% до 100%, а специфичность – от 92,6% до 100% [25, 28, 29]. Нами также показано выявление HBsAg в 95,7% образцов слюны по сравнению с образцами сыворотки крови этих пациентов при температуре хранения -70°С в течение года, что свидетельствует о возможности использования образцов слюны в качестве альтернативы образцам сыворотки крови при тестировании на данный маркер. В этих же образцах частота выявления анти-HBcore составила всего 13,04%, что значительно отличается от литературных данных – частота выявления этого маркера у серопозитивных лиц обычно составляет 96-100% [14]. Интересно, что у больных, коинфицированных ВГВ/ВИЧ, наблюдается низкая частота выявления анти-HBcore в образцах альтернативных типов [30]. Возможно, что отмеченная в нашем исследовании низкая частота выявления анти-HBcore в образцах слюны у больных хроническим гепатитом В с дельта агентом в также связана именно наличием двух вирусов в организме.

В отличие от маркеров ГВ, определение анти-ВГD в образцах СКК и слюны ранее не проводилось. Нами впервые описано отсутствие анти-ВГD в этих образцах, полученных от больных хроническим гепатитом В и дельта. В то же время, анти-ВГD в сыворотке крови присутствовали в 100% образцов, хранившихся 2-3 года при -70°С. Отсутствие положительных случаев выявления анти-ВГD при успешном выявлении анти-HBcore у части серопозитивных пациентов (13% в образцах слюны и 19,7% в образцах СКК), возможно, обусловлено тем, что белок core вируса гепатита В является более сильным иммуногеном, приводящим к выработке анти-HBcore в высокой концентрации. Известно, что после перенесенной инфекции эти антитела остаются пожизненно [31]. Вероятно, концентрация анти-ВГD значительно ниже, что объясняет отсутствие этих антител в слюне и СКК у больных ХГ В+D.

Заключение. Слюна и СКК могут служить альтернативным материалом для выявления HBsAg при скрининге и в научных сероэпидемиологических исследованиях. Определение анти-HBcore в образцах этих типов у пациентов с хронической инфекцией В+D, на наш взгляд, является нецелесообразным ввиду высокой вероятности получения ложноотрицательных результатов. По той же причине серологическая диагностика ГD с использованием альтернативных типов образцов не представляется возможной в связи с получением ложноотрицательных результатов в образцах СКК и слюны по сравнению с сывороткой крови. Ввиду высокой вероятности суперинфицирования вирусом ГD больных с ХГВ на эндемичных территориях, в случае выявлении HBsAg в альтернативных клинических материалах (слюна, СКК) маркеры инфицирования ВГD следует определять в сыворотке крови.

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Финансирование. *Исследование выполнено в рамках Государственного задания по теме: Разработка современной системы диагностики, лечения и профилактики вирусных гепатитов B, C и D.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-12, 14, 18-30 см. REFERENCES)

13. Асратян А.А., Павлова И.П., Рейзис А. Р., и др. Маркёры вирусных гепатитов в образцах слюны больных острыми гепатитами А, В and С. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии.* 1997; 6: 43–7.
15. Кожанова Т. В., Ильченко Л. Ю., Клушкина В. В. и др. Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов среди «условно» здорового населения Республики Тыва. *Медицинская вирусология*. 2013; XXVII (2): 74–88.
16. Исаева О.В., Ильченко Л.Ю., Кожанова Т.В. и др. Влияние вакцинации против гепатита В на распространенность гепатита дельта в эндемичном регионе. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8, 2 (29): 36-42.
17. Исаева О.В., Кюрегян К.К. Вирусный гепатит дельта: недооцененная угроза. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2019; 8, 2 (29): 72-9.
31. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. *Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика).* Москва: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2003.

REFERENCES

1. Alfaiate D., Deny P, Durantel D. Hepatitis delta virus: from biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antivir Res.* 2015; 122: 112–29.
2. Wedemeyer H., Manns M. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. Nat. Rev. *Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 7: 31–40.
3. Sureau C., Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol.* 2016; 64: 102-16.
4. Hirtz Christophe, Sylvain Lehmann. “Blood sampling using “dried blood spot”: a clinical biology revolution underway?.” *Annales de biologieclinique.* 2015; 73(1).
5. Snijdewind Ingrid JM. “Current and future applications of dried blood spots in viral disease management.” *Antiviralresearch.* 2012; 93 (3): 309-21.
6. McDade Thomas W., Sharon Williams, J. Josh Snodgrass. “What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research.” *Demography.* 2007; 44.4: 899-925.
7. Villa E. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research. *Journal of Clinical Pathology.* 1981; 34.7: 809.
8. Lira R., Maldonado-Rodrigues A., Rojas-Montes O. et al. Use of dried blood samples for monitoring hepatitis B virus infection. *Virol. J.* 2009; 6: 153.
9. Cruz H.M., E. F. da Silva, C. A. Ville la-Nogueira et al. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2011; 25 (2): 134–41.
10. Hutse V., Verhaegen E., De Cock L., et al. Oral fluid as a mediumfor the detection of Hepatitis B surface antigen. *J Med Virol.* 2005; 77: 56–63.
11. Thieme T., Yoshihara P., Piacentini S., BellerM. Clinical evaluationof oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1076–9.
12. Zhevachevsky N.G., Nomokonova N.Y., Beklemishev A.B., Belov G.F. Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: Diagnostic and epidemiological significance. *J. Med. Virol.* 2000; 61: 433–8.
13. Asratyan A.A., Pavlova I. P., Re˘ızis A. R. et al. Viral hepatitis markers in saliva specimens from patients with acute hepatitis A, B and C. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, I immunobiologii.* 1997; 6: 43–7. (in Russian)
14. Villar L., Bezerra C., Cruz H., Portilho M., Flores G. Applicability of oral fluid and dried blood spot for hepatitis B virus diagnosis. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2019; 2019: 1.
15. Kozhanova T. V., Ilchenko L. Yu., Klyushkina V. V. et al. Serological markers of hepatitis virus infection among the “conditionally” healthy population of the Republic of Tyva. *Meditsinskaya virusologiya.* 2013; XXVII (2): 74-88. (in Russian)
16. Isaeva O. V., Ilchenko L. Yu., Kozhanova T. V. et al. Influence of vaccination against hepatitis B on the prevalence of hepatitis Delta in the endemic region. *Infektsionnye bolezny: novosty, mneniya, obucheniye.* 2019; 8, 2 (29): 36-42. (in Russian)
17. Isaeva O. V., Kyuregyan K. K. Viral hepatitis Delta: an underestimated threat. *Infektsionnye bolezny: novosty, mneniya, obuchenie.* 2019; 8, 2(29): 72-9. (in Russian)
18. Lukacs Z., Dietrich A., Ganschow R., Kohlschutter A., Kruithof R. Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots–a feasibility study using a multi-analyte immunoassay. *Clin.Chem. Lab. Med.* 2005; 43: 141–5.
19. Forbi J.C., Obagu J.O., Gyar S.D., Pam C.R., Pennap G.R. et al. Application of dried blood spot in the sero-diagnosis of hepatitis B infection (HBV) in an HBV hyperendemic nation. *Ann. Afr. Med.* 2010; 9: 44–5.
20. Villar L.M., de Oliveira J.C., Cruz H.M., Yoshida C.F., Lampe E. et al. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *J .Med Virol*. 2011; 83: 1522–9.
21. Villa E., Cartolari R., Bellentani S., Rivasi P., Casolo G., Manenti F. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool.for epidemiological research. *J. Clin. Pathol* .1981; 34: 809–12.
22. Mendy M., Kirk G.D., Van der Sande M., Jeng-Barry A., Lesi O.A., Hainaut P., Sam O., McConkey S., Whittle H. Hepatitis B surface antigenaemia and alpha-foetoprotein detection from dried blood spots: Applications to field-based studies and to clinical care in hepatitis B virus endemic areas. *J. Viral. Hepat*. 2005; 12: 642–7.
23. McAllister S., Shepherd K. ,Templeton C., Aitken, R. Gunson. Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates. *Journal of Clinical Virology.* 2015; 71: 10–7.
24. Chee Eng Lee, Ponnampalavanar S., Omar S., Mahadeva S. et al. Evaluation of the Dried Blood Spot (DBS) Collection Method as a Tool for Detection of HIV Ag/Ab, HBsAg, anti-HBs and anti-HCV in a Malaysian Tertiary Referral Hospital. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 2011; 40: 448-53.
25. Noppornpanth S., Sathirapongsasuti N., Chongsrisawat V., and Poovorawan Y. Detection of HBsAg and HBV DNA in serum and saliva of HBV carriers. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 2000; 31 (2): 419–21.
26. Clemmons R. M., Stewart C., Davis G. et al. Development of a Prototype, Rapid Saliva Test for Hepatitis B Surface Antigen (HBSAg) Utilizing a «Dipstick». *Method, Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993; 694 (1): 272-3.
27. Richards A. L., Perrault J. G., Caringal L. T. et al. A noninvasive assessment of hepatitis B virus carrier status using saliva samples. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1996; 27 (1): 80–4.
28. Cruz H. M., da Silva E. F., Villela-Nogueira C. A. et al. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2011; 25 (2): 134–41.
29. Khadse S. V., Bajaj G., Vibhakar P., Nainani P., Ahuja R., Deep G. Evaluation of specifcity and sensitivity of oral fuid for diagnosis of hepatitis B. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2016; 10, 1: BC12–BC14.
30. Geane Lopes Flores, Helena Medina Cruz, Denise Vigo Potsch et al. Evaluation of HBsAg and anti-HBC assays in saliva and dried blood spot samples according HIV status. *Journal of Virological Methods*. 2018; 2018; 90(12): 1863.
31. Shahgildyan I. V., Mikhailov M. I., Onishchenko G. G. Parenteral viral hepatitis (epidemiology, diagnosis, prevention). Moscow: GOU VUNMC MZ RF; 2003. (in Russian)

Поступила 15.12.19
Принята к печати 26.12.19

Селезнева И. А.[1], Гильмиярова Ф. Н.[1], Бородина И. А.[1], Ерещенко А. А[1]., Гильмияров Э. М.[1], Карташов В. В.[2]

КЛИНИКО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИНДИКАТОРЫ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ПОЛОСТИ РТА ПРИ ПАРОДОНТИТЕ У ЛИЦ С РАЗЛИЧНОЙ ГРУППОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬЮ КРОВИ

[1]ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия
[2]Лечебно-учебный центр профессора А. В. Шумского, 443030, Самара, Россия

В целях поиска связи между альтерацией тканей полости рта и генетической предрасположенностью к воспалительно-деструктивным процессам в оральных средах определён цитокиновый профиль ротовой жидкости клинически здоровых лиц при различной групповой принадлежности крови по системе АВ0. Выявлены группоспецифические особенности лиц с В(III) группой крови: увеличение на 32,5% содержания ИЛ-6 и на 63,1% содержания ИЛ-8 по сравнению с аналогичными данными лиц с 0(I), А(II), АВ(IV) групп крови, что может предрасполагать к наибольшей активности воспалительного процесса в полости рта у лиц с носительством антигена В. Подтверждением данного факта является увеличение содержания антител к глиадину класса IgA в крови среди пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом, имеющих В(III) группу крови, до 5,00 Ед/мл (p<0,01), что свидетельствует о процессах острого воспаления, а наряду с ростом титра антител IgG к трансглутаминазе в крови по сравнению с группой клинически здоровых лиц служит показателем повреждения соединительной ткани организма на молекулярном уровне. При обследовании стоматологического статуса обнаружены выраженные клинические проявления хронического генерализованного пародонтита у пациентов с А(II) группой крови, молекулярным фундаментом которых является наиболее высокое содержание в ротовой жидкости антител классов IgA и IgG к трансглутаминазе (1,18±0,69 и 3,84±2,40 Ед/мл), что способствует активации разрушающих пародонт воспалительно-деструктивных процессов, очевидно, с тенденцией к хроническому течению заболевания. Проведённые исследования позволили проанализировать у клинически здоровых лиц предрасположенность к альтеративным процессам в оральных средах при использовании градации по групповой принадлежности крови.

Ключевые слова: *группы крови; ротовая жидкость; интерлейкины; IgA антитела к трансглутаминазе и глиадину; IgG-антитела к трансглутаминазе и глиадину; хронический генерализованный пародонтит.*

Для цитирования: *Селезнева И.А., Гильмиярова Ф.Н., Бородина И.А., Ерещенко А.А., Гильмияров Э.М., Карташов В.В. Клинико-молекулярные индикаторы воспалительно-деструктивных поражений полости рта при пародонтите у лиц с различной групповой принадлежностью крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 100-105. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-100-105*

Selezneva I.A.[1], Gilmiyarova F.N.[1], Borodina I.A.[1], Ereshchenko A.A.[1], Gilmiyarov E.M.[1], Kartashov V.V.[2]

CLINIC-MOLECULAR INDICATORS OF INFLAMMATORY DESTRUCTIVE DAMAGE OF THE ORAL CAVITY IN PERIODONTITIS IN PERSONS WITH VARIOUS GROUP ACCESSORIES OF BLOOD

[1]Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia;
[2]Medical Training Center of Professor A.V. Shumsky, 443030, Samara, Russia

In order to find a connection between the alteration of oral tissues and genetic predisposition to inflammatory and destructive processes in oral media, the cytokine profile of the oral fluid of clinically healthy individuals was determined for various blood group affiliations according to the AB0 system. The group-specific features of individuals with B(III) blood group were revealed: an increase of 32,5% in the content of interleukin-6 and 63,1% in the content of interleukin-8 compared with similar data for people with 0(I), A(II), AB(IV) blood groups, which can predispose to the greatest activity of the inflammatory process in the oral cavity in individuals with antigen B. Confirmation of this fact is an increase of IgA antibodies to gliadin in the blood among patients with chronic generalized periodontitis with B(III) blood group, up to 5,00 U/ml (p<0,01), which indicates the processes of acute inflammation, and along with an increase in blood IgG antibodies to transglutaminase in comparison with a group of clinically healthy individuals, it serves as an indicator of damage to the body's connective tissue at the molecular level. When examining the dental status, pronounced clinical manifestations of chronic generalized periodontitis were found in patients with A(II) blood group, the molecular foundation of which is the highest content of IgA and IgG antibodies to transglutaminase in the oral fluid (0,35 U/ml and 0,45 U/ml), which contributes to the activation of periodontal-destroying inflammatory and inflammatory processes, obviously, with a tendency to the chronic course of the disease. The studies performed allowed us to analyze in clinically healthy individuals a predisposition to alternative processes in oral environments, using gradation by group blood affiliation.

Keywords: *blood groups; oral fluid; interleukins; IgA antibodies to transglutaminase and gliadin, IgG antibodies to transglutaminase and gliadin, chronic generalized periodontitis.*

For citation: *Selezneva I.A., Gilmiyarova F.N., Borodina I.A., Ereshchenko A.A., Gilmiyarov E.M., Kartashov V.V. Clinic-molecular indicators of inflammatory destructive damage of the oral cavity in periodontitis in persons with various group accessories of blood. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 100-105 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-100-105*

For correspondence: *Selezneva I.A.,* PhD, docent of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics, e-mail: bio-sam@yandex.ru

Для корреспонденции: *Селезнёва Инна Александровна*, канд.мед.наук, доц. каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: bio-sam@yandex.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-100-105

Information about authors:

Selezneva I.A., https://orcid.org/000-0001-6647-5330
Gilmiyarova F.N., http://orcid.org/0000-0001-5992-3609
Borodina I.A., https://orcid.org/0000-0001-7115-6430
Ereshchenko A.A., https://orcid.org/0000-0002-4221-4440
Gilmiyarov E.M., https://orcid.org/0000-0003-4761-4379
Kartashov V.V., https://orcid.org/0000-0002-8671-2898

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 10.01.2020
Accepted 20.01.2020

Введение. Воспалительно-деструктивные заболевания полости рта являются актуальной проблемой стоматологии, поскольку являются причиной снижения качества жизни и здоровья населения. Их распространённость, рост заболеваемости, рецидивирующий характер течения, ведущий к развитию вторичной адентии, определяют необходимость углублённого изучения не только процессов, происходящих в тканях пародонта, но и в организме в целом [1]. Персистирующий антигенный инфекционный стимул неизбежно обусловливает аллергическую сенсибилизацию организма, что ещё более нарушает равновесие иммунной системы больных, оказывая на неё угнетающее и дезорганизующее влияние. Закономерным является вопрос о состоянии механизмов местной и общей резистентности организма при данной стоматологической патологии. Хронический генерализованный пародонтит (ХГП) – обратимый воспалительный процесс, развитие которого вызвано присутствием микроорганизмов в биоплёнке вблизи края десны [2]. Присутствие бактериальных липополисахаридов запускает воспалительный ответ хозяина, активируя полиморфноядерные лейкоциты и секрецию медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины [3], что сопровождается изменениями состояния иммунных механизмов защиты ротовой полости, проявляющиеся в местных изменениях не только состава клеток крови десны, но и содержания в слюне иммуноглобулинов. Из механизмов защиты полости рта, включающих генерацию активных форм кислорода и других свободных радикалов, ферментативный гидролиз полисахаридных компонентов клеточных стенок микроорганизмов лизоцимом, аутофлору слизистых оболочек, противостоящую колонизации организма патогенными микроорганизмами, иммуноглобулинам принадлежит особая роль [4]. В условиях снижения способности лимфоцитов к пролиферации и уменьшения содержания связанных с ними иммуноглобулинов, защитные реакции в тканях пародонта начинаются не с активации лимфоцитов антигенами микробов зубной бляшки [5], а с нейтрофильного хемотаксиса – увеличения числа нейтрофилов в зубодесневой борозде. В этом процессе особая роль принадлежит ИЛ-8, который является важным хемокином, контролирующим активацию и миграцию нейтрофилов первой линии защиты от пародонтопатогенных бактерий из периферической крови в ткани десен [6]. Экспрессия ИЛ-8 указывает на наличие воспалительного процесса, сигнализирующего о прогрессировании заболевания пародонта [7]. В ответ на воспалительные и инфекционные стимулы высвобождаются провоспалительные цитокины, в числе которых ИЛ-6, причём в более высоких концентрациях в слюне у людей с заболеваниями пародонта, в результате чего наблюдается дисбаланс цитокинового профиля ротовой жидкости. В литературе отсутствуют сведения о содержании провоспалительных цитокинов в ротовой жидкости клинически здоровых лиц в зависимости от групповой принадлежности их крови, что, несомненно, важно для определения наличия риска и фазы перехода между десной здоровой и поражённой воспалительным процессом [8]. Любые изменения медиаторов воспаления, присутствующих в слюне, отражают изменения, происходящие в ткани десны. Интактный пародонт представляет эффективный барьер для бактерий, где инвазии пародонтопатогенов препятствует не только сам эпителий полости рта, но и комплекс факторов иммунной защиты. Поскольку ферменту тканевой трансглутаминазе и белку глиадину отводится роль маркёров состояния соединительнотканной линии защиты [9], то они представляют интерес для определения связанных с ними антител в качестве показателей состояния соединительнотканных структур пародонтального комплекса.

Цель работы – оценить содержание провоспалительных цитокинов и молекулярных маркёров воспалительно-деструктивного повреждения слизистой оболочки полости рта при различной групповой принадлежности крови по системе АВ0 у клинически здоровых лиц и пациентов с ХГП.

Материал и методы. Исследование проводилось на базе кафедр фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой, терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. В исследовании приняли участие 259 человек, из них 170 человек – клинически здоровые лица (38% – мужчины и 62% – женщины, средний возраст 24±2,5 года), и 89 человек больных ХГП. Диагноз подтвержден в ходе клинического обследования, рентгенологических и функциональных исследований (из них мужчин – 28%, женщин – 72%, средний возраст 39±2,8 лет).

Клиническое обследование пациентов включало сбор анамнеза и внешнего осмотра полости рта. Оценивались характер изменения цвета слизистой оболочки десны; степень кровоточивости десен Мюллемана (Muhlemaim, 1971) в модификации Коуэлл (Cowell I., 1975), глубина пародонтальных карманов, наличие патологической подвижности зубов (Fleszar T.J. et al., 1980). Оценивалось гигиеническое состояние полости рта с применением гигиенического индекса Green-Vermillion (1964), определение рецессии десны проводили по шкале Miller (1985) и пародонтальному индексу (Russel A., 1967). Рентгенологическое исследование пародонта включало внутриротовые контактные снимки отдельных групп зубов и ортопантомографию, по которым оценивалось состояние зубов, периапикальной области, нижнечелюстного канала, структура и объём костной ткани.

Таблица 1

Содержание ИЛ-6 в ротовой жидкости клинически здоровых лиц при различной групповой принадлежности крови, пг/мл

Группы крови	M±m	Me	Min	Max	95% CI
0(I)	1,19±0,49	0,21	0	6,53	0-0,65
A(II)	0,99±0,37	0,46	0	4,67	0,23-1,77
B(III)	1,51±0,5	0,64	0,08	5,14	0,19-2,63
AB(IV)	0,43±0,19	0,49	0	0,76	0,18-1,04
Генеральная совокупность	1,14±0,24	0,41	0	6,53	0,19-0,70

Примечание. Здесь и в табл. 2-6: M±m – среднее значение и стандартная ошибка среднего; Me – медиана; Min- минимальное значение в выборке; Max - максимальное значение в выборке; 95% CI – 95% доверительный интервал; Q1-Q3 - значения 25% нижнего и 75% верхнего квартилей; * – p<0,05; ** - p<0,01.

Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная с применением вакуумных систем взятия крови, ротовая жидкость, собранная в стерильный пластиковый одноразовый контейнер путём сплевывания. Перед сбором ротовой жидкости все участники исследования ознакомлены с правилами подготовки и процедуре сбора ротовой жидкости. Ротовую жидкость собирали с утра, перед приёмом пищи, не ранее чем через 15 мин после чистки зубов. За один час перед взятием ротовой жидкости ротовую полость прополаскивали кипяченой водой. Перед сбором ротовой жидкости исключались физические и эмоциональные нагрузки, курение. Образцы с примесью крови исключались из исследования. Определение группы крови проводили перекрестным методом на плоскости с использованием моноклональных антител эритротест-цоликлоны анти-А, анти-В, анти-D Супер ООО «Гематолог» и набора стандартных эритроцитов 0(I), A(II), B(III) групп производства ГБУЗ «Самарская областная клиническая станция переливания крови». В крови и ротовой жидкости проводили определение ИЛ-6, ИЛ-8, антител к трансглутаминазе и глиадину классов IgA и IgG методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия): «Интерлейкин-6-ИФА-Бест», «Интерлейкин-8-ИФА-Бест», «IgA-трансглутаминаза-ИФА-Бест», «IgG-трансглутаминаза-ИФА-Бест», «IgA-Глиадин-ИФА-Бест», «IgG-Глиадин-ИФА-Бест».

Статистическую обработку результатов проводили с помощью статистического пакета SPSS Statistics 21. Использованы стандартные методы описательной статистики. Изучены формы распределения исследуемых показателей. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Использовался непараметрический U критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони в качестве альтернативы t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследования в ротовой жидкости клинически здоровых лиц определяли содержание цитокинов, в частности, ИЛ-6 – провоспалительного цитокина, потенциально полезного для понимания патогенеза, прогнозирования и диагностики инфекционного, травматического, аутоиммунного повреждения тканей, оценки эффективности терапии [10]. Продуцентами ИЛ-6 являются иммунокомпетентные клетки, эндотелиоциты, эпителиоциты, фибробласты. Локальные альтеративные процессы могут сопровождаться повышением уровня ИЛ-6 в крови и в биологических субстратах зоны поражения, в том числе в полости рта. Имеются немногочисленные разноречивые оценки концентрации ИЛ-6 в крови, слюне, десневой жидкости при патологии периодонта и слизистой оболочки полости рта; приводятся данные о росте содержания ИЛ-6 в слюне при генерализованном периодонтите, красном плоском лишае слизистой оболочки полости рта, и его отсутствие при гингивите и афтозном стоматите [11].

В ротовой жидкости клинически здоровых обследованных содержание ИЛ-6 находится в пределах 0-6,53 пг/мл, составляя в среднем 0,41 (1,14±0,24) пг/мл (табл. 1).

Наибольшее содержание ИЛ-6 определено у лиц с B(III) группой крови: 0,64 (1,51±0,5) пг/мл. ИЛ-6 является цитокином с широким спектром функций, производство которого стимулируется инородными телами, включая бактерии, эндотоксин, частицы пыли. Экспрессия ИЛ-6 повышается при воспалительных реакциях, вызванных травмой, стрессом, инфекцией, при таких воспалительных заболеваниях, как ревматоидный артрит и болезнь Крона [12].

ИЛ-6 побуждает организм вырабатывать С-реактивный белок и фибриноген во время воспаления, что может способствовать тромбозу и в связи с этим играет важную роль в возникновении и развитии клеточной дифференцировки. ИЛ-6 оказывает эффект хемотаксиса на другие клетки воспаления при воспалительных реакциях, включая лимфоциты и мононуклеарные макрофаги [13]. По-видимому, лица с B(III) группой крови в силу генетических особенностей предрасположены к более выраженному воспалительному процессу в слизистой оболочке ротовой полости. Наименьшее значение ИЛ-6 выявлено у лиц 0(I) группы – 0,21 (1,19±0,49) пг/мл), что, возможно, предрасполагает к минимальным воспалительным реакциям при заболеваниях полости рта и адекватному ответу на проводимую при этом противовоспалительную терапию.

Диапазон содержания в ротовой жидкости клинически здоровых лиц ИЛ-8 находился в пределах 7,04-424,32 пг/мл, и в среднем составлял 127,57 (158,12±20,4) пг/мл (табл. 2).

Наибольшее содержание ИЛ-8 (p<0,05) определено у представителей B(III) группы крови: 218,51 пг/мл. Экспрессия ИЛ-8 указывает на наличие воспалительного процесса, сигнализирующего о прогрессировании заболевания пародонта [14]. ИЛ-8 способствует привлечению иммуннокомпетентных клеток к тканям, особенно нейтрофилов, можно предположить, что у носителей антигена В нейтрофильный хемотаксис позволяет быстрее достигать заражённой или поврежденной области по сравнению с представителями других групп крови, вызывая фагоцитоз и разрушение микроорганизмов, повышая при этом продукцию активных форм кислорода и протеолитических ферментов [15]. Наименьшее содержание ИЛ-8 в ротовой жидкости наблюдалось лиц с 0(I) группой крови. Уменьшение экспрессии ИЛ-8 в слюне может свидетельствовать о снижении рекрутирования нейтрофилов и последующем разрешении воспалительного процесса за счёт других механизмов иммунного ответа.

Содержание провоспалительных цитокинов в ротовой жидкости клинически здоровых лиц неоднородно, имеется связь между их количеством и эндогенным генетическим маркёром – групповой принадлежностью крови по системе AB0.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-100-105

Таблица 2

Содержание ИЛ-8 в ротовой жидкости клинически здоровых лиц при различной групповой принадлежности крови, пг/мл

Группы крови	M±m	Me	Min	Max	95% CI
0(I)	119,09±29,87	78,56	7,04	420,09	28,05-155,91
A(II)	127,86±31,14	66,05	9,04	395,47	33,07-233,60
B(III)	257,86±45,07	218,51*	15,17	417,83	132,12-408,44
AB(IV)	172,92±85,64	110,64	46,08	424,32	99,64-445,48
Генеральная совокупность	158,12±20,4	127,57	7,04	424,32	63,32-169,73

Таблица 3

Клинические характеристики больных ХГП с различными группами крови

Показатели	0(I)	A(II)	B(III)	AB(IV)
Индекс кровоточивости по Мюллеману	2 степень	2 и 3 степень	1 и 2 степень	2 степень
Подвижность по шкале Флезар	1 и 2 степень	2 степень	1 степень	1 и 2 степень
Рецессия десны	13%	33%	3%	20%
Глубина пародонтальных карманов	4,52±0,10	5,46±0,08	4,45±0,11	5,14±0,26
Упрощенный индекс гигиены полости рта Грин-Вермильон	3,28±0,05	4,00±0,01	2,83±0,04	3,77±0,08
Пародонтальный индекс Рассела	2,89±0,05	3,56±0,06	2,24±0,08	3,20±0,11

Чтобы установить наличие взаимосвязи между принадлежностью группы крови с такими маркёрами деструктивных поражений полости рта как антитела к трансглутаминазе и глиадину исследована ротовая жидкость клинически здоровых лиц и больных ХГП средней степени тяжести. Предварительно оценили стоматологический статус обследуемых: кровоточивость дёсен регистрировалась в 93% случаев, подвижность зубов 1 и 2 степени в 53% и 47% соответственно; глубина пародонтальных карманов составляла от 4,0±0,2 до 6,0±0,3 мм, рецессия десны наблюдалась у 69%, расширение периодонтальной щели; снижение высоты межальвеолярных перегородок – у 50%. На ортопантомограммах визуализировались остеопороз, деструкция костной ткани, атрофия, остеосклероз. Изучена зависимость клинических проявлений ХГП в зависимости от групповой принадлежности крови по системе AB0 (табл. 3).

Групповое распределение пациентов с пародонтитом оказалось следующим: 0(I) группа крови – 25,8%, A(II) группа крови – 43,8%, B(III) группа крови – 22,4%, AB(IV) группа крови – 8,0%. ХГП характерен для обладателей A(II) группы крови. Клинические проявления ХГП отмечаются у больных с A(II) группой крови: индекс кровоточивости по Мюллеману – 3 степени; подвижность зубов по шкале Флезар – 2 степени; рецессия десны – 33%; глубина пародонтальных карманов 5,46±0,08мм; пародонтальный индекс Рассела 3,56±0,06.

Проведен сравнительный анализ уровня молекулярных индикаторов воспалительно-деструктивных процессов (антител, специфичных к глиадину и трансглутаминазе) в ротовой жидкости клинически здоровых лиц и пациентов с ХГП (табл. 4).

При ХГП в ротовой жидкости появляются IgA и IgG, что можно расценить как ответную реакцию на воспалительно-деструктивный процесс. Самый высокий уровень IgG к глиадину отмечен у пациентов 0(I) и A(II) групп крови (4,57±1,23 и 4,86±1,57Ед/мл соответственно), что отражает активацию вторичного иммунного ответа. IgG способны проникать через гематосаливарный барьер в ротовую жидкость, тем самым обеспечивая иммунную защиту. Наиболее низкий уровень IgG к глиадину отмечен у пациентов с AB(IV) группой крови и составляет 1,33±1,08Ед/мл. B(III) группа занимает промежуточное положение. У всех пациентов 0(I)-AB(IV) групп в ротовой жидкости определяются IgA к глиадину, превышающие по содержанию уровень в контроле в 3-8 раз.

Антитела к трансглутаминазе класса IgA у больных с ХГП обнаруживаются в ротовой жидкости в сопоставимых уровнях у представителей всех групп крови, кроме B(III): в данном случае IgA к трансглутаминазе практически отсутствуют. Наиболее высокое содержание антител классов IgA и IgG к трансглутаминазе выявлено у пациентов с A(II) группой крови (3,84±2,40 Ед/м и 1,18±0,69Ед/м соответственно). Вероятно, данная закономерность отражает наибольшую выраженность повреждения тканей пародонта с тенденцией к хроническому течению заболевания у пациентов с A(II) группой крови.

У всех обследованных контрольной группы обнаруживаются IgA к глиадину, у лиц с A(II), AB(IV) группами крови – IgA к трансглутаминазе, у клинически здоровых обследованных с B(III) группой крови иммуноглобулины к трансглутаминазе в ротовой жидкости отсутствуют. IgA синтезируются в лимфоидной ткани, откуда поступают в полость рта, где обеспечивают местный иммунитет. IgA агглютинирует бактерии, нейтрализуети вирусы, преципитирует растворимые антигены, усиливает действие лактоферрина и лизоцима, неспецифических факторов защиты тканей и органов полости рта.

Поскольку ХГП относится к системным заболеваниям организма, интересно определить антитела к трансглутаминазе и глиадину в крови пациентов в сравнении с клинически здоровыми лицами. Содержание IgG и IgA к глиадину в крови пациентов с заболеваниями пародонта при различной AB0-принадлежности крови представлены в табл. 5.

В сыворотке крови пациентов с пародонтитом – носителей 0(I) группы крови – отмечено достоверное снижение содержания антител IgG к глиадину по сравнению с группой клинически здоровых лиц: 2,00 Ед/мл и 5,65 Ед/мл соответственно. У данной группы обследованных отмечена тенденцию к снижению содержания IgA к глиадину по сравнению с группой клинически здоровых лиц: 3,00 Ед/мл и 3,50 Ед/мл соответственно. Глиадин

Таблица 4

Антитела к глиадину, трансглутаминазе классов IgA и IgG в ротовой жидкости клинически здоровых лиц и пациентов с ХГП при различной АВ0-принадлежности (M±m, Ед/мл)

Показатели	Группа обследованных	Генеральная совокупность	0(I)	A(II)	B(III)	AB(IV)
IgA к ГЛ	Здоровые	0,31±0,03	0,30±0,03	0,45±0,04	0,30±0,03	0,20±0,02
	Больные	4,40±1,82	2,13±0,74	7,06±4,03	2,40±0,96	2,37±1,13
IgG к ГЛ	Здоровые	0	0	0	0	0
	Больные	4,20±0,87	4,57±1,23	4,86±1,57	3,54±2,02	1,33±1,08
IgA к ТРГЛ	Здоровые	0,13±0,02	0,05±0,006	0,25±0,03	0	0,25±0,02
	Больные	1,22±0,52	2,14±1,67	1,18±0,69	0,49±0,43	0,57±0,37
IgG к ТРГЛ	Здоровые	0	0	0	0	0
	Больные	1,87±1,09	0,34±0,10	3,84±2,40	0,31±0,90	0,13±0,06

Примечание. Здесь и в табл.6: ГЛ-глиадин; ТРГЛ-транслутаминаза.

Таблица 5

Антитела к глиадину (Ед/мл) в крови пациентов с заболеваниями пародонта при различной АВ0-принадлежности крови

Группа крови	Класс Ig	M±m	Me	Min	Max	95% CI	Q1-Q3
0(I)	IgG	1,74±0,32	2,00*	0,5	3,0	0,99-2,49	0,70-2,30
	IgA	3,93±0,99	3,00	1,50	11,4	1,66-6,21	2,45-4,50
A(II)	IgG	1,97±0,64	0,75*	0,10	10,0	0,60-3,34	0,55-2,60
	IgA	3,38±0,47	2,70	1,40	7,5	2,37-4,38	1,55-4,83
B(III)	IgG	1,19±0,36	0,75	0	3,0	0,34-2,03	0,55-1,95
	IgA	6,59±2,18	5,0**	0,80	18,0	1,43-11,74	1,63-11,60
AB(IV)	IgG	0,33±0,28	0,10*	0	0,9	0,89-1,56	0-2,20
	IgA	0,87±0,09	0,90	0,70	1,0	0,49-1,25	0,70-1,00
Генеральная совокупность	IgG	1,61±0,31	0,80	0	10,0	0,97-2,24	0,50-2,20
	IgA	4,02±0,62	2,70	0,70	18,0	2,77-5,27	1,50-4,75

является сложным белком-гликопротеином, компонентом злаковых растений и, соответственно, входит в состав нашего пищевого рациона. Нарушение выработки антител к пищевым белкам ведёт к развитию заболеваний желудочно-кишечного тракта, в частности, целиакии, однако, выработка антител к пищевым гликопротеинам может встречаться и при отсутствии целиакии, как следствие изменения иммунных реакций организма и обозначается как «антитела без целиакии».

Для лиц с ХГП со А(II) группой крови в крови отмечено снижение IgG к глиадину (0,75 Ед/мл) по сравнению с группой клинически здоровых лиц (5,00 Ед/мл). Выявленные изменения иммунного статуса могут приводить к снижению протективных свойств организма (в том числе антибактериальных, противовирусных, антитоксических) при ХГП.

У больных с В(III) в крови отмечены группоспецифические особенности изменений показателей гуморального иммунитета: значимое достоверное увеличение (p<0,01) содержания IgA к глиадину по сравнению с группой клинически здоровых лиц: 5,00 Ед/мл и 2,60 Ед/мл соответственно.

Учитывая, что сывороточный IgA преимущественно играет роль регулятора иммунных процессов, взаимодействуя с иммуннокомпетентными клетками, реализующими клеточно-ассоциированные защитные функции, такие, как фагоцитоз, цитотоксические эффекты, с гуморальными факторами врождённого иммунитета (комплемент, лактоферрин, лизоцим), увеличение его содержания в крови у пациентов с В(III) группой крови может свидетельствовать о повышенной интенсивности процесса острого воспаления в слизистой оболочке.

Характерным признаком для больных пародонтитом с В(III) группой крови оказалось увеличение содержания антител IgG к трансглутаминазе по сравнению с группой клинически здоровых лиц: 2,55 и 1,40 Ед/мл соответственно. Изоферменты к трансглутаминазе широко представлены в организме. В образовании нормальной соединительной ткани ведущая роль принадлежит изоформам 1, 3, 5, которые катализируют формирование ковалентной связи между остатками глутамина, лизина и двух молекул фибронектина с коллагеном и другими белками внеклеточного матрикса [16]. Увеличение содержания IgG к трансглутаминазе можно расценить как признак молекулярного повреждения соединительной ткани и развитие иммунного ответа на данное повреждение. IgG составляют основную массу антител при вторичном иммунном ответе. IgG проходят через гематотканевые барьеры, обеспечивая антибактериальную и антитоксическую защиту, увеличение их содержания отражает хронический характер течения патологического процесса, что наряду с увеличением IgA свидетельствует о более высокой, чем у пациентов 0(I) и А(II) групп крови, иммунорезистентности.

У лиц с АВ(IV) группой крови, при высоком уровне антител класса IgA к глиадину у клинически здоровых обследованных этой группы крови содержание IgA у пациентов с пародонтитом оказалось низким: 4,50 Ед/

Таблица 6

Коэффициенты корреляции между содержанием антител к глиадину и трансглутаминазе в крови при пародонтите

Показатели	IgA к ГЛ, сыворотка	IgG к ГЛ, сыворотка	IgA к ТРГЛ, сыворотка	IgG к ТРГЛ, сыворотка
IgG к ГЛ, сыворотка	0,49**			
IgA/IgG к ГЛ, сыворотка		-0,71**		
IgA к ГЛ / IgA к ТРГЛ, сыворотка	0,39*		-0,69**	
IgA/IgG к ТРГЛ, сыворотка			0,78**	
IgG к ГЛ /IgG к ТРГЛ, сыворотка	0,48**	0,82**		-0,51**

мл и 0,90 Ед/мл соответственно, уровень IgG к глиадину у пациентов этой группы оказался в сорок раз ниже конторольной группы: 4,00 Ед/мл и 0,10 Ед/мл ($p<0,05$). Проанализированы корреляционные взаимозависимости между изученными показателями (табл. 6).

При ХГП значимо меняется характер корреляций. Показательным примером являются корреляции с IgG к трансглутаминазе: у клинически здоровых лиц с этим показателем выявлено три коэффициента корреляции различной силы, два из которых имеют отрицательную величину, у больных ХГП только одна отрицательная корреляционная зависимость средней силы. При пародонтите по сравнению с клинически здоровыми лицами выявлено на 25% меньше коэффициентов корреляции, что свидетельствует о том, что при данной патологии ослабевают взаимодействия различных факторов гуморального иммунитета, характерные для здорового организма. Такое разобщение отражает снижение потенциала иммунной защиты организма.

Заключение. Проведённые исследования позволили проанализировать у клинически здоровых лиц предрасположенность к альтеративным процессам в оральных средах, использовав градацию по групповой принадлежности крови. Определение содержания ИЛ-6 и 8 в ротовой жидкости лиц с В(III) группой крови может рассматриваться в качестве неинвазивных маркёров для выявления риска развития деструктивно-воспалительных процессов в ротовой полости. Данные особенностей стоматологического статуса при ХГП могут быть применены в качестве фактического материала, позволяющего персонифицировать характер клинических проявлений. В качестве молекулярного фундамента обнаруженных изменений выступают маркёры деструктивного повреждения пародонтального комплекса – иммуноглобулины к трансглутиаминазе и глиадину, установлено, что их концентрация в крови и ротовой жидкости зависит от групповой принадлежности крови по системе АВ0. Наиболее значимые изменения по комплексу клинических и иммунных нарушений в крови и ротовой жидкости выявлены у обследованных с А(II) и В(III) группами крови, в связи с этим данной группе лиц может быть рекомендовано регулярное наблюдение пародонтолога.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 5-16 см. REFERENCES)

4. Кунин А.А., Ипполитов Ю.А., Лепехина Л.И., Быков Э.Г. Клиническая гистохимия барьерной функции слизистой оболочки десны при пародонтите. *Стоматология.* 2001; 1: 13-6.

REFERENCES

1. Sheiham A., Netuveli G. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000*. 2002; 29:104-21.
2. Madianos P., Bobetsis Y., Kinane D.. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *Journal of Clinical Periodontology.* 2005; 32: 57-71.
3. Yucel-Lindberg T., Bage T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2013; 15: e7.
4. Kunin A.A., Ippolitov Yu.A., Lepehina L.I., Bykov Ye.G. Clinical histochemistry of the barrier function of the gingival mucosa during periodontitis. *Stomatologiya.* 2001; 1: 13-6. (in Russian)
5. Donlon W. Immunology in dentistry. *The Journal of the American Dental Association.* 1980; 100(2): 220-31.
6. Zhang N., Xu Y., Zhang B., Zhang T., Yang H., Zhang B. et al. Analysis of interleukin-8 gene variants reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for chronic periodontitis in the Han population. *PLoS One.* 2014; 9(8): e104436.
7. Ertugrul A., Sahin H., Dikilitas A., Alpaslan N., Bozoglan A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research.* 2013; 48(1): 44-51.
8. Santos M., Diniz M., Guare R., Ferreira M., Gutierrez G., Gorjao R. Inflammatory markers in saliva as indicators of gingival inflammation in cerebral palsy children with and without cervical motor control. *International Journal of Paediatric Dentistry.* 2017; 27(5): 364-71.
9. Belkin A., Zemskov E., Hang J., Akimov S., Sikora S. et al. Cell-surface-associated tissue transglutaminase is a target of MMP-2 proteolysis. *Biochemistry.* 2004; 43(37):11760-9.
10. Mozaffari H., Sharifi R., Sadeghi, M. Interleukin-6 levels in the serum and saliva of patients with oral lichen planus compared with healthy controls: a meta-analysis study. *Central-European journal of immunology.* 2018; 43(1): 103-8.
11. Boronat-Catala M., Catala-Pizarro M., Bagan-Sebastian J. Salivary and crevicular fluid interleukins in gingivitis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry.* 2014 ; 6(2): e175-9.
12. Kim W., An H., Kim J., Gwon M., Gu H., Lee S. et al. Apamin inhibits TNF-α- and IFN-γ-induced inflammatory cytokines and chemokines via suppressions of NF-κB signaling pathway and STAT in human keratinocytes. *Pharmacological Reports.* 2017; 69(5): 1030-5.
13 Luo Q., Ma X., Wahl S., Bieker J., Crossley M., Montaner L. Activation and repression of interleukin-12 p40 transcription by erythroid Kruppel-like factor in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279(18): 18451-6.
14. Ertugrul A., Sahin H., Dikilitas A., Alpaslan N., Bozoglan A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research.* 2013; 48(1): 44-51.
15. Noh M., Jung M., Kim S., Lee S., Park K., Kim D. et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF-α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2013; 6(3): 847-51.
16. Nurminskaya M., Kaartinen M. Transglutaminases in mineralized tissues. *Frontiers in Bioscience*. 2006; 11: 1591-1606.

Поступила 10.01.20
Принята к печати 20.01.20

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Сапожкова Ж.Ю. [1,2], Еремин К.И. [1]

МОДИФИКАЦИЯ ПРОТОКОЛА АНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА СПЕРМОГРАММЫ

[1]Международная школа цитологии, 111674, Москва, 196641, Санкт-Петербург, Россия;
[2]Подольский диагностический центр, 142117, Подольск, Московская область, Россия

Лабораторное руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека (5-е издание, 2010 г.) содержит стандартизированные, основанные на фактических данных процедуры, которым рекомендовано следовать при выполнении анализа. Несмотря на это, существуют некоторые разночтения в толковании этого документа. В России протокол ВОЗ по определению концентрации пероксидазо-позитивных клеток и сперматозоидов, а также оценке их жизнеспособности и морфологии не полностью соответствует протоколам других стран. Большинство российских руководств по анализу спермы человека содержит не актуальную информацию из 4-ого издания ВОЗ от 1999г. Сложившаяся ситуация привела к отсутствию единого подхода к аналитическому этапу спермограммы. В целях стандартизации, разработан набор реагентов (ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА, ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия), позволяющий структурировать протокол исследования, получить необходимую точность и полноту анализа в оценке фертильности мужчин. Такой подход представляется крайне важным для надлежащей клинико-лабораторной оценки в целях сохранения здоровья как мужчины, так и семьи в целом.

Ключевые слова: *анализ спермы человека; спермограмма; пероксидазо-положительные клетки; концентрация сперматозоидов; подвижность сперматозоидов; жизнеспособность сперматозоидов; нормальная и аномальная морфология сперматозоидов.*

Для цитирования: *Сапожкова Ж.Ю. , Еремин К.И. Модификация протокола аналитического этапа спермограммы. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 106-110. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110*

Sapozhkova Zh.Yu.,[1,2], Eremin K.I[1].

UPDATES IN PROTOCOL FOR HUMAN SEMEN EXAMINATION

[1] International Cytology School, Moscow, Saint Petersburg, Russia;

[2] Centre of Laboratory Diagnostics in Podolsk, Russia

Currently, the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th edition, 2010) provides updated, standardized, evidence-based procedures and recommendations for laboratory managers, scientists and technicians to follow in examining human semen in a clinical or research setting. Despite the fact, there are several gaps and limitations in the interpretation of this compendium. Mostly, the WHO-protocol of estimation of peroxidase-positive cells and spermatozoa, as well as evaluation of their viability and morphology are not so affordable and applicable in Russia due to peculiarities of laboratory market. Furthermore, most of Russian manuscripts do not reflect a unified approach to the analytical stage of semen analyses. In order to standardize the protocol for human semen examination which adopted to Russian lab it was developed packing of reagents (GEMSTANDART-SEMEN ANALYSES, LLC 'GEMSTANDART', Saint Petersburg, Russia) allowing to obtain an accuracy and completeness of the examination. In summary, this approach is a necessary step in male fertility evaluation. Together with a clinical information, it is indispensable for planning the appropriate clinical management and tacking care in male health.

Key words: *semen analysis; peroxidase-positive cells; sperm concentration; sperm motility; sperm vitality; normal and abnormal sperm morphology.*

For citation: *Sapozhkova Zh.Yu., Eremin K.I. Updates in protocol for human semen examination. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 106-110. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110*

For correspondence:.*Sapozhkova Zh.Yu.,* MD,PhD, Master, Head of the International Cytology School, Head of Clinical Lab; e-mail: jannet72@mail.ru

Information about author:

Sapozhkova Zh.Yu., https://orcid.org/0000-0003-3068-2260

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 19.12.2019
Accepted 20.12.2019

Для корреспонденции: *Сапожкова Жанна Юрьевна*, канд.мед.наук, рук. Международной школы цитологии, зав. КДЛ; e-mail: jannet72@mail.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110

В настоящее время руководство ВОЗ (5-е издание, 2010 г.) регламентирует исследование и обработку эякулята человека для установления фертильности и мониторинга сперматогенеза мужчины [3,14]. Несмотря на то, что этот документ содержит отличные от прежних значений референсные диапазоны [15-17], существуют определенные сложности и ограничения в использовании его в России. В руководстве ВОЗ рекомендуется применение ряда реагентов и приборов, не зарегистрированных в России и содержащих канцерогенные прекурсоры. Сегодня нет единого подхода к аналитическому лабораторному этапу исследования спермограммы, как следствие - разночтение результатов, неверная диагностика и лечение. Концентрация истинных лейкоцитов/пероксидазо-положительных клеток (ППК), сперматозоидов, а также оценка их жизнеспособности и морфологии, ошибочное определение которых не допустимо, остаются одними из проблемных параметров анализа эякулята. Предлагается стандартизация протокола спермограммы, который заложен в наборе реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (Санкт-Петербург, Россия).

Материал и методы. За период с мая по ноябрь 2019 г. на учебной базе Международной Школы Цитологии (Москва) проведен корреляционный анализ результатов клинического анализа спермы от 200 мужчин 29-65 лет. Исследования выполнены в клинико-диагностической лаборатории сети медицинских клиник г. Подольска двумя способами.

Способ 1. Используются растворы, приготовленные согласно прописям рекомендаций и протоколов по анализу спермы человека, представленных в широком доступе в интернете [1-4,7,10-17]. Прописи содержат вещества, обладающие канцерогенным, мутагенным действием (насыщенный раствор формальдегида, орто-толуидин).

Способ 2. Используется набор реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (далее Набор) для комплексной оценки показателей спермограммы. Инновационная составляющая Набора – комбинированный подход к измерению концентрации ППК и сперматозоидов в эякуляте человека на основе цитохимического окрашивания. В состав набора входят следующие компоненты: Реагент №1 - проявитель: смесь натрия фосфорнокислого двузамещенного, калия фосфорнокислого однозамещенного, аммония хлористого, динатриевой соли этилендиаминотетрауксусной кислоты и бензидина; Реагент №2 - перекись водорода 30 %; Реагент № 3 - раствор эозина, 5 % водный; Реагент № 4 раствор нигрозина, 10 % водный; Реагент № 5 - краситель азур-эозин по Романовскому; Реагент №6 - фиксатор-краситель эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду; Реагент № 7 - фосфатно-солевой раствор бромелайна. Набор не содержит тканей, клеток и биологических веществ человеческого или животного происхождения; в нем нет веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным или влияющим на репродуктивную деятельность человека действием.

Принцип действия и назначение Набора реагентов в способе 2.

Реагенты №1 и Реагенты №2, входящие в состав Набора, при обработке образца спермы окрашивают в коричневый цвет клетки, содержащие пероксидазу (нейтрофильные лейкоциты). Клетки, не содержащие пероксидазу (сперматозоиды, клетки сперматогенеза, лимфоциты, моноциты, макрофаги, спермиофаги, гистиоциты, эритроциты, липоидные тельца, эпителий), остаются бесцветными. В качестве положительного контроля при определении окраски ППК образцов эякулята используется цельная кровь, результаты окраски оценивают микроскопией.

Реагент №2 Набора позволяет использовать рабочий раствор реагента при разведении спермы 1:10 как для подсчета концентрации ППК, так и фиксировать подвижные клетки для последующего подсчета концентрации сперматозоидов в больших квадратах камеры Горяева, используя соответствующие формулы. Определение двух важнейших параметров спермограммы (концентрация ППК и сперматозоидов) в одной пробирке важно для оптимизации производственного процесса, сокращения времени оборота теста в лаборатории (TAT - turn around time). Подсчет концентрации круглых клеток (КК) не проводится, необходима только предварительная качественная оценка наличия КК в препарате.

Реагент № 3 и Реагент № 4 предназначены для определения процентного соотношения живых и мертвых сперматозоидов. В результате взаимодействия 10 мкл спермы с 20 мкл Реагента № 3 в течение 5 с и 30 мкл Реагента № 4 в течение последующих 5 с на предметном стекле, отчетливо визуализируются окрашенные эозином в красный цвет мертвые сперматозоиды и неокрашенные (бесцветные) живые сперматозоиды. Строгое соблюдение указанных дозировок в аликвотировании эякулята и реагентов позволяет произвести качественное окрашивание, безошибочно идентифицировать и определить процентное соотношение живых и мертвых сперматозоидов.

Реагент № 5 и Реагент № 6 идентифицируют внутриклеточные субстанции эякулята. Принцип действия основан на том, что они имеют разную pH и связываются с красителем с противоположной реакцией. Ацидофильные структуры окрашиваются в разные тона красного цвета, базофильные структуры – в тона от пурпурового до синего. Ядра клеток богаты нуклеиновыми кислотами, имеют кислую реакцию и окрашиваются азур-эозином в сине-фиолетовый цвет. Головки сперматозоидов окрашиваются в синий цвет с сиреневой или фиолетовой акросомальной частью. Хвосты сперматозоидов окрашиваются в нежно-сиреневый цвет. Цитоплазматическая капля и шейка сперматозоида окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

Реагент № 7 используется для разжижения вязкого эякулята. Он представляет собой раствор бромелайна на фосфатном буфере Дульбеко, разжижает эякулят в короткий срок (до 10 мин в термостате при температуре 37°С 10 минут).

Приготовление рабочего раствора из реагентов 1 – 2. К флакону с Реагентом № 1 осторожно добавить 10 мкл Реагента №2 и перемешать. Рабочий раствор использовать в течение 24 часов при хранении при 0-5°С. Остатки неизрасходованного рабочего раствора аликвотировать по 500 мкл в сухие микропробирки типа Эппендорф и заморозить. Допускается 1 месяц хранения в морозильной камере с последующим однократным размораживанием перед проведением исследования. Реагенты №№3–7 готовы к использованию.

Проведение анализа. Если разжижение эякулята не наступает в течение 60 минут, в пробирку со всей порцией эякулята вносят пипеткой Пастера равное количество Реагента № 7 в соотношении 1+1 (1:2), размешивают, не допуская образования пузырьков, инкубируют пробирку в термостате при температуре 37°С 10 минут. Процедура разжижения влияет на биохимические показатели эякулята, подвижность и морфологию сперматозоидов, поэтому использование процедуры указывается дополнительно в протоколе исследования. Разведение 1+1 (1:2) следует учитывать при расчете концентрации сперматозоидов и лейкоцитов.

Окрашивание и подсчет ППК в эякуляте

1. Тщательно перемешать образец спермы, не допуская образования пузырьков и пены.
2. В пробирку поместить аликвоту из 20 мкл спермы и 180 мкл рабочего раствора (разведение 1:10) – готовая смесь исследуемого препарата.
3. Аккуратно перемешать суспензию в течение 10 сек стеклянной палочкой и инкубировать при 37°С 30 минут.
4. После предварительного аккуратного повторного перемешивания суспензии заполнить две стороны камеры Горяева.
5. Для осаждения клеток, удерживать камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре.
6. Оценить заполненные камеры в световом микроскопе при увеличении ×200 или ×400.
7. Подсчитать число ППК в больших квадратах камеры Горяева с помощью лабораторного счетчика. Рекомендуется считать 2-3 раза с последующим определением среднего значения ППК.

Расчет концентрации ППК проводить согласно двум вариантам в зависимости от результатов предварительной визуальной оценки КК.

Подсчет концентрации лейкоцитов/ППК. Если КК располагаются в монослоях (не большое/малое количество при визуальной оценке микроскопией), ППК считать в 100 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 4 малых.

Расчет проводить по формуле 1:

L =(a×250×10)/(100×1000) [млн/мл] (*формула 1*),

где L – ППК в 1 мл эякулята, *а* – ППК в 100 больших квадратах, 250 - 1/250 -объем одного большого квадрата, 10 – степень разведения спермы, 1000 – пересчет 1 мкл в 1 мл, 100 – количество больших квадратов.

Сокращенный вариант формулы 1:

L=a/40 [млн/мл].

Если КК располагаются в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), считать ППК в 40 больших квадратах (20 квадратов вверху сетки и 20 – внизу).

Расчет проводить по формуле 2:

L=(a×250×10×1000)/(40×1000000) [млн/мл] (*формула 2*),

где *а* – ППК в 40 больших квадратах, 250 - 1/250 - объем одного большого квадрата, 10 – степень разведения спермы, 1000 - пересчет из 1 мкл в 1 мл эякулята, 40 – количество больших квадратов.

Сокращенный вариант формулы 2:

L=a×0,0625 [млн/мл]

Подсчет концентрации сперматозоидов. Если сперматозоиды лежат в монослоях (малое количество после предварительной визуальной оценки), то разводить эякулят следует в соотношении 1:10.

Определение концентрации сперматозоидов проводить в 5 больших квадратах камеры Горяева, разделенных на 16 малых, по диагонали.

Расчет проводить по формуле 3:

C=a×500 000 [млн/мл] (*формула 3*),

где С – концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята, *а* – количество сперматозоидов в 5 больших квадратах по диагонали.

Если сперматозоиды лежат в мультислоях (большое количество после предварительной визуальной оценки), то увеличить разведение до 1:20 и более путем добавления в пробирку №1 еще 200 мкл рабочего раствора. В случае, если требуется разведение 1:40, 1:80, то добавить в пробирку №1 с существующим разведением каждый раз по 200 мкл рабочего раствора, соответственно. После предварительного аккуратного повторного перемешивания суспензии заполнить камеру Горяева. При расчете в формулу 3 внести коэффициент, соответствующий дополнительному разведению эякулята.

Для осаждения клеток удерживать камеру Горяева горизонтально не менее 4 минут при комнатной температуре. Оценить заполненную камеру в свето-оптическом микроскопе при увеличении ×200 или ×400. Подсчитать число сперматозоидов с помощью лабораторного счетчика.

Процедура анализа эякулята. В Способе 1 процедура анализа эякулята состояла из трех этапов: 1) определение концентрации сперматозоидов; 2) окрашивание и определение доли живых/мертвых сперматозоидов; 3) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов и определения доли нормальных и патологических форм. Этап окрашивания и определения концентрации ППК был заменен на определение концентрации нейтрофильных гранулоцитов путем субъективной их оценки («на глаз») по косвенным идентификационным признакам. Разжижения вязкого эякулята не проводили: образцы либо отбраковывали с пометкой «оценка концентрации и общего количества сперматозоидов невозможна ввиду высокой вязкости биоматериала, исследование повторить», либо происходило неполноценное аликвотирование 20 мкл вязкого эякулята с потерей объема последнего.

В Способе 2 процедура анализа эякулята состояла из четырех или пяти этапов (в зависимости от вязкости эякулята): 1) разжижение вязкого эякулята, если вязкость превышала пороговое значение ≥20 мм; 2) окрашивание и определение концентрации ППК; 3) определение концентрации сперматозоидов; 4) окрашивание и определение доли живых/мертвых сперматозоидов; 5) окрашивание в целях дифференцировки морфологии сперматозоидов и определение доли нормальных и патологических форм.

Результаты и обсуждение. Способом 1 и Способом 2 параллельно было исследовано 200 образцов эякулята по четырем важным диагностическим параметрам: концентрация лейкоцитов и сперматозоидов, жизнеспособность эякулята и морфология сперматозоидов. Оценивалось количество образцов, в которых показатели не соответствовали референсным значениям, указанным в 5-м руководстве ВОЗ (см.таблицу).

Результаты таблицы свидетельствуют, что при оценке свойств эякулята Способом 1 из 200 исследованных образцов в 136 (68 %) выявлены отклонения, выходящие за референтные значения; в Способе 2 патологические отклонения выявлены в 37 % тех же образцах эякулята. Как видно из таблицы, высокий процент выявленных отклонений Способом 1 – это преимущественно пиоспермия. Согласно данным литературы [5,6,8,9], умеренные уровни ППК в эякуляте (<1млн/ мл) являются физиологической нормой; при более высоких концентрациях (от 1-2,5 млн/мл) сперма может оставаться фертильной.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-106-110

Сравнительные результаты выявления показателей эякулята использованными способами, выходящие за референсные значения, указанные в 5-м руководстве ВОЗ

Выявленная патология (анализировано 200 образцов эякулята)	Способ 1, результат	Способ 2, результат
Пиоспермия (концентрация ППК (лейкоцитов) > 1 млн/мл)	96	55
Некрозооспермия (количество живых сперматозоидов < 58%)	21	10
Олигозооспермия (концентрация сперматозоидов < 15 млн/мл)	11	5
Тератозооспермия (количество патологических форм >4%)	8	4
Всего категория патологии, n	136	74

Необходимо обращать внимание на критично высокий уровень ППК (>2,5 млн/мл), частота наступления беременности при котором уже может снижаться. В этой связи, урологу-андрологу крайне важно иметь это в виду, а специалисту КДЛ не допускать ложную пиоспермию, так как необоснованно назначенное антибактериальное лечение может необратимо спровоцировать патологию остальных главных показателей эякулята.

Главным источником расхождений было отсутствие в Способе 1 обработки спермы реагентами для цитохимического окрашивания нейтрофильных гранулоцитов, которые окрашивают круглые клетки (КК), содержащие пероксидазу, в коричневый цвет. За основу подсчета лейкоцитов Способом 1 была принята известная методика количественной оценки содержания КК (концентрации) без цитохимического окрашивания ППК (нейтрофильных лейкоцитов) в эякуляте [1]. Недостатки методики следующие: 1) производится оценка и определение концентрации всех КК, а не только нейтрофильных гранулоцитов/ППК; 2) применяются косвенные идентификационные признаки ППК путем субъективной оценки (округлая форма, сегментированные ядра, микроворсинчатая поверхность, средний размер), что не соответствует рекомендациям ВОЗ. Очевидно, что методика не приемлема для мониторинга содержания лейкоцитов в сперме, так как не дает представления об истинном содержании ППК. Как результат, происходила ошибочная интерпретация и излишний подсчет концентрации бесцветных (неокрашенных) лейкоцитов: за ППК были приняты все КК, не содержащие пероксидазу, наряду с истинными лейкоцитами, содержащими пероксидазу. Все эти клетки были отнесены к лейкоцитам по их субъективным признакам, что привело к ложной пиоспермии.

Согласно Руководству ВОЗ, 5-е издание, оценку и вычисление концентрации лейкоцитов в эякуляте осуществляют с помощью метода цитохимического окрашивания токсичным, канцерогенным и мутагенным раствором на основе орто-толуидина[3, 14]. Использование этого протокола в России затруднено, так как: 1) отсутствует коммерчески доступный набор для окрашивания; составить набор из 6 реагентов затруднительно, так как орто-толуидин является прекурсором и в свободном доступе отсутствует; 2) в медицинских лабораториях запрещено использование самостоятельно приготовленных реагентов, к тому же современные лаборатории не имеют необходимого поверенного оборудования: весов, оборудования для титрования; в КДЛ России используют готовые наборы реагентов; 3) результаты считают в усовершенствованном гемоцитометре Нейбауэра, который отсутствует на российском лабораторном рынке оборудования с регистрационным удостоверением; 4) формула подсчета адаптирована к гемоцитометру Нейбауэра, что вызывает определенные трудности.

В соответствии с различными вариациями протоколов спермограммы [1-4,7,10-17], широкое применение в практике КДЛ нашла еще одна методика оценки и вычисления концентрации ППК в эякуляте. При ее осуществлении используют полуколичественную оценку содержания лейкоцитов в эякуляте на тест-полоске с помощью иммунохроматографического метода (без цитохимического окрашивания), основанного на ферментативной активности лейкоцитарной эстеразы [2]. Недостатки методики заключаются в следующем: 1) позволяет осуществить только приблизительное определение концентрации лейкоцитов в эякуляте (полуколичественный метод определения – метод сухой химии на тест- полоске (> или <$1x10^{6}$); 2) методика основана на цветовой индикации в зоне тест-полоски, что может приводить к ложной пиоспермии, так как лейкоцитарная эстераза появляется в биожидкости также и при разрушении лейкоцитов; 3) методика не дает истинного представления о наличии или отсутствии воспалительного процесса у мужчины.

Основная причина расхождения одиннадцати (11) результатов в определении некрозооспермии Способами 1 и 2 (Таблица 1) - это отсутствие точного дозирования при аликвотировании компонентов при суправитальной окраске по Блюму для дальнейшего цитохимического окрашивания сперматозоидов.

Необходимо подчеркнуть, что все результаты, указывающие на некрозооспермию Способа 2, входили в число случаев некрозооспермии Способа 1. Методика Способа 1 регламентирует окрашивание в течение 30 с на предметном стекле 1-й капли эякулята и равного количества 5% водного эозина. В результате, живые сперматозоиды должны оставаться бесцветными, а мертвые - окрашиваться в красный цвет [2]. Неточное дозирование компонентов и несоблюдение времени окрашивания может приводить к перекрашиванию сперматозоидов.

Существует методика оценки живых и мертвых сперматозоидов, описанная Е.Е. Брагиной [1], где рекомендовано окрашивание смеси 1 капли неразведенного перемешанного эякулята с 1 каплей красящего раствора из 5% водного эозина и 10% нигрозина в течении 30 секунд. Основной недостаток такого подхода – также отсутствие точного дозирования при аликвотировании компонентов. Как результат - перекрашивание сперматозоидов и ложная некрозооспермия.

В отличие от вышеупомянутых методик дифференцировки жизнеспособности эякулята, протокол окрашивания Набора (Способ 2) определяет строгое соблюдение дозирования аликвот, в результате достигается надлежащее качество окраски как фона препарата, так мертвых и живых сперматозоидов.

Причина расхождения результатов установленной олигозооспермии в шести (6) пробах (см.таблицу) рассматривается в отсутствии этапа разжижения вязкого эякулята необходимым для этой процедуры реагентом. Как результат, неполноценное аликвотирование 20 мкл вязкого эякулята в узкую часть наконечника дозатора. В итоге, потеря объема спермы во время дозирования приводила к потере концентрации сперматозоидов.

Возможная причина четырех (4) расхождений в Способах 1 и 2 при оценке нормальных и патологических форм сперматозоидов (см.таблицу) - применение методикой быстрого окрашивания эякулята Diff-Quik, рекомендованной ВОЗ [3,14]. С одной стороны, применение экспресс-окрашивания снижает ТАТ, что оптимизирует производственный процесс. С другой стороны, получаются препараты более низкого качества по сравнению с мазками, окрашенными традиционным методом по Романовскому, что предлагает Набор. Отмечается, что анализ морфологии сперматозоидов достаточно субъективен и трудно поддаётся стандартизации [3,14] даже при окраске традиционным методом. Констатируем, что использование Реагента № 5 и Реагента № 6 Набора повышает качество окрашивания, что дает возможность улучшить должную оценку эякулята.

Заключение. Ошибочное определение главных параметров анализа спермы человека, таких как концентрация ППК, сперматозоидов, а также определение их жизнеспособности и морфологии, крайне недопустимы для понимания истинной фертильности мужчины. Технологические возможности предлагаемых реагентов для комплексного исследования спермы человека, позволяют исключить ошибки аналитического этапа спермограммы. Подтверждена идентичность полученных результатов окрашивания с помощью Набора реагентов «ГЕМСТАНДАРТ-СПЕРМОГРАММА» (ООО «ГЕМСТАНДАРТ», С.-Петербург, Россия) аналогичным по составу прописям реагентов, рекомендованным ВОЗ для исследования эякулята (Руководство ВОЗ по исследованию и обработке спермы человека, 5-я редакция (2010 г.)) и другим российским рекомендациям. Внедрение в практику КДЛ Набора, наряду с профильным повышением квалификации специалистов, – это шаг на пути к стандартизации протокола спермограммы и дальнейшей правильной диагностике и лечению мужчин с бесплодием.

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-17 см. REFERENCES)

1. Брагина Е.Е. Протокол проведения спермиологического исследования. *Андрология и генитальная хирургия*. 2014; 1: 24.
2. Долгов В.В., С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко, И.И. Миронова, Е.К. Назарова, Н.Г. Ракова и др. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. М.-Тверь: Триада; 2006.
3. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. М.: Капитал-Принт; 2012.
4. Шатохина И.С., Кузнецова В.С. Исследование эякулята. Учебное пособие. М.: МОНИКИ; 2014.

REFERENCES

1. Bragina E.E. Semen analyses protocol [Protocol provedeniya spermiologicheskogo issledovaniya]. *Andrologiya I genital´naya khyrurgiya*. 2014; 1: 24. (in Russian)
2. Dolgov V.V., Lugovskaya S.A., Fanchenko N.D., Mironova I.I., Nazarova E.K., Rakova N.G. et al. Laboratory diagnostics of male infertility [Laboratornaya diagnostika muzhskogo besplodiya]. Moscow-Tver´: «Triada»; 2006. (in Russian)
3. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. WHO [Rukovodstvo po issledovanyu i obrabotke eyakulyata cheloveka]. Moscow: Capital Print; 2012. (in Russian)
4. Shatokhina I.S., Kuznetsova V.S. Semen analyses manual WHO [Uchebnoe posobie po issledovaniyu eyakulyata]. Moscow: MONIKI; 2014. (in Russian)
5. Aitken R.J., Baker H.W. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum. Reprod*. 1995;10:1736–9.
6. Aitken R.J., West K., Buckingham D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. *J. Androl*. 1994;15:343–52.
7. Cao X.-W., Lin K., Li C.-Y., Yuan C.-W. A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Zhonghua nan ke xue - National journal of andrology*. 2011;17(12):1059–63.
8. Esfandiari N., Sharma R.K., Saleh R.A., Thomas A.J., Jr. Agarwal A. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J. Androl.* 2003;24: 862–70.
9. Virginie Barraud-Lange, Jean-Christophe Pont, Ahmed Ziyyat, Khaled Pocate, Christophe Sifer, Isabelle Cedrin-Durnerin, Bouchra Fechtali, Beatrice Ducot, and Jean Philippe Wolf. Seminal leukocytes are Good Samaritans for spermatozoa. *J. Androl.* Fertil Steril ® 2011; 96:1315–9. ©2011 by American Society for Reproductive Medicine.
10. Kvist U., Björndahl L. Manual on Basic Semen Analysis. Oxford: Oxford University Press; 2002.
11. Masha Ahadi, Fereshte Aliakbari et al. Evaluation of the Standardization in Semen Analysis Performance According to the WHO Protocols Among Laboratories in Tehran, Iran. 2019; Spring; https://www.researchgate.net/journal/17355303_Iranian_Journal_of_Pathology 14(02): 142–7. Published online 2019 Jun 10. doi: 10.30699/IJP.14.2.142 PMCID: PMC6679670.
12. Menkveld R. The basic semen analysis. In: Oehringer S, Kruger TF, editors. Male Infertility. Ch. 9. Oxford: Informa Healthcare, UK; 2007:141–70.
13. Suresh C. Sikka, Wayne J.G. Hellstrom. Current updates on laboratory techniques for the diagnosis of male reproductive failure. *Asian J. Androl*. 2016 May-Jun; 18(3): 392–401. Published online 2016 Apr 8. doi: 10.4103/1008-682X.179161 PMCID: PMC4854088 PMID: 27056346.
14. WHO. Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
15. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.
16. 16. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1992.
17. WHO. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1987.

Поступила 19.12.19

Принята к печати 21.12.19

МИКРОБИОЛОГИЯ

Лямин А.В.

РЕДКИЕ ВИДЫ В СТРУКТУРЕ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА *ACTINOMYCETALES*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

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

Приведены данные о структуре кислотоустойчивых представителей порядка Actinomycetales и редких видах, выделенных и идентифицированных с использованием различных методов. В исследование включены штаммы нетуберкулезных микобактерий (НТМ), выделенные из клинического материала при обследовании на туберкулёз в период с 2016 по 2019 годы. Общее количество образцов, с признаками роста НТМ, составило 316 проб. Первичное выделение на средах Левенштейна-Йенсена, Финн II, MGIT и идентификация НТМ методом ДНК-гибридизации. Все штаммы, которые не идентифицированные до вида и культуры, определённые как микроорганизмы с высоким содержанием G+C (High GC GR+) реидентифицированы с использованием MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT (Bruker®). Методом ДНК-гибридизации успешно идентифицировано до вида 188 штаммов, выделенных НТМ, что составило 59,5% от всех выделенных культур. Среди выделенных видов преобладали представители медленнорастущих НТМ (M. avium complex, M. gordonae, M. kansasii), которые составили в совокупности 67,0% от всех идентифицированных до вида штаммов НТМ. Среди культур, для которых методом ДНК-гибридизации не удалось провести приемлемую идентификацию оказались преимущественно НТМ, среди которых доминировали M. gordonae, M. avium, M. kansasii. Ряд НТМ представлены редкими видами: M. iranicum и M. pseudoshottsii. Среди данной группы микроорганизмов выделены другие кислотоустойчивые аэробные актиномицеты, в том числе имеющие потенциальное клиническое значение: Gordonia spp., Tsukamurella spp., Rhodococcus spp., Nocardia spp. При идентификации культур, с высоким содержанием Г+Ц выявлено наибольшее количество микробных ассоциаций, в том числе состоящих из двух видов НТМ (M. monacense + M. flavescens, M. avium + M. kansasii), ассоциации M. gordonae со стафилококками. В эту же группу попали редкие виды НТМ: M. fredericbergense, M. szulgai, M. malmoense, M. bohemicum, M. septicum, представители родов Nocardia, Gordonia, Tsukamurella.

Ключевые слова: *нетуберкулезные микобактерии; кислотоустойчивые актиномицеты; редкие виды.*

Для цитирования: *Лямин А.В. Редкие виды в структуре кислотоустойчивых представителей порядка Actinomycetales выделенных из клинического материала. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 111-115. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-111-115*

Lyamin A.V.

RARE SPECIES IN THE STRUCTURE OF ACID-RESISTANT MEMBERS OF THE ORDER ACTINOMYCETALES ISOLATED FROM CLINICAL MATERIAL

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

The article presents data on the structure of acid-resistant members of the order Actinomycetales and rare species that have been isolated and identified using various methods. The study included strains of non-tuberculous mycobacteria (NTM) isolated from clinical material during examination for tuberculosis in the period from 2016 to 2019. The total number of samples with signs of NTMs growth that were included in the study was 316 samples. Primary isolation on Levenshtein-Jensen, Finn II, and MGIT media and NTMs identification by DNA-hybridization. All strains that were not identified prior to the species and culture, identified as microorganisms with a high G+C content (High GC GR +) were re-identified using a MALDI-ToF Microflex LT mass spectrometer (Bruker®). By the method of DNA-hybridization, 188 strains isolated by NTM were successfully identified to form 58.5% of all selected cultures. Among the selected species, representatives of slowly growing NTMs (M. avium complex, M. gordonae, M. kansasii) predominated, which amounted to 67.0% of all NTM strains identified to the species. Among the cultures for which DNA hybridization failed to carry out acceptable identification, predominantly NTMs were found, among which M. gordonae, M. avium, M. kansasii dominated. A number of NTMs were represented by rare species: M. iranicum and M. pseudoshottsii. Among this group of microorganisms, other acid-resistant aerobic actinomycetes were isolated, including those of potential clinical significance: Gordonia spp., Tsukamurella spp., Rhodococcus spp., Nocardia spp. When identifying cultures containing high concentrations of G+C, the maximum number of microbial associations was revealed, including those consisting of two types of NTMs (M. monacense + M. flavescens, M. avium + M. kansasii), as well as associations of M. gordonae with staphylococci. The same group included rare NTM species: M. fredericbergense, M. szulgai, M. malmoense, M. bohemicum, M. septicum, as well as representatives of the genera Nocardia, Gordonia, Tsukamurella.

Key words: *non-tuberculous mycobacteria; acid-resistant actinomycetes; rare species.*

For citation: *Lyamin A.V. Rare species in the structure of acid-resistent members of the order Actinomycetales isolated from clinical material. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020;65 (2): 111-115. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-111-115*

Для корреспонденции: *Лямин Артём Викторович*, канд.мед.наук, доц. каф.общей и клин. микробиологии, иммунологии и аллергологии ; e-mail: avlyamin@rambler.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-111-115

For correspondence: *Lyamin Artem Viktorovich,* MD, Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology; e-mail: avlyamin@rambler.ru

Information about authors:

Lyamin A.V., https://orcid.org/0000-0002-5905-1895

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 02.12.2019
Accepted 09.12.2019

Введение. Кислотоустойчивые аэробные актиномицеты – разнообразная группа микроорганизмов, особенностью которых является строение клеточной стенки, обеспечивающее устойчивость к различным факторам окружающей среды. С точки зрения клинической микробиологии наибольший интерес среди них вызывают представители родов *Nocardia* spp., *Gordonia* spp., *Rhodococcus* spp., *Tsukamurella* spp. и нетуберкулезные микобактерии (НТМ) [1,2]. Данная группа микроорганизмов практически не попадает в поле деятельности врачей-бактериологов, за исключением НТМ, выделение и идентификация которых проводится в микробиологических лабораториях противотуберкулёзной службы. В отношение представителей других родов из порядка *Actinomycetales* алгоритмы лабораторной диагностики практически не разработаны, но диагностика микобактериозов на сегодняшний день становится всё более доступной. Микобактериозы – группа заболеваний различной локализации, этиологическим фактором развития которых являются НТМ. Интерес к данной группе заболеваний возрастает с каждым годом, что обусловлено увеличением количества пациентов с факторами риска по развитию патологических процессов, вызванных НТМ [3]. Исторически сложилось так, что диагностикой микобактериозов в России занимаются в микробиологических лабораториях противотуберкулёзной службы. Среди методов видовой идентификации НТМ, которые рекомендованы ВОЗ широко используется метод ДНК-гибридизации, предложенный компанией «Hain Lifescience» (Германия). Данный метод позволяет проводить идентификацию наиболее часто выделяемых из клинического материала видов НТМ, представителей микобактерий из туберкулёзного комплекса (МТВс). При использовании двух ДНК-стрипов возможна идентификация 28 видов НТМ [4]. Известно значительно большее количество видов НТМ, по данным некоторых авторов до 200, среди которых для более чем 50 видов описана этиологическая роль в развитии патологических состояний у человека [5]. Возникает вопрос о необходимости оценки распространённости видов НТМ в клиническом материале, идентификация которых невозможна при использовании метода ДНК-гибридизации.

Использование метода ДНК-гибридизации исключает идентификацию других представителей порядка *Actinomycetales* за исключением НТМ. При проведении исследования с использованием тест-системы «Hain Lifescience» возможно определение микроорганизмов, которые условно относятся к группе грамположительных микроорганизмов с высоким содержанием гуанина и цитозина (Г+Ц) в геноме, для основной массы представителей кислотоустойчивых аэробных актиномицет данный признак является стабильным и может быть использован в качестве условного скрининга при работе с первичными посевами для отбора культур для дальнейшей идентификации.

В последние десятилетия в рутинной микробиологической практике стал широко использоваться метод идентификации микроорганизмов, основанный на MALDI-ToF масс-спектрометрии, который позволяет идентифицировать типичные и редкие виды из порядка *Actinomycetales*, включая НТМ. Библиотеки различных масс-спектрометров содержат данные, позволяющие достаточно точно проводить видовую идентификацию более 160 различных представителей рода *Mycobacterium* [6].

Цель работы - оценка распространённости и описание структуры редких видов кислотоустойчивых актиномицет, выделенных из клинического материала, видовая идентификация которых невозможна при использовании метода ДНК-гибридизации.

Материал и методы. В исследование включены штаммы НТМ, выделенные из клинического материала при обследовании на туберкулёз в период с 2016 по 2019 годы. Общее количество образцов, с признаками роста НТМ, которые были включены в исследование составило 316 проб. Первичное выделение на средах Левенштейна-Йенсена, Финн II, MGIT и идентификация НТМ методом ДНК-гибридизации проводилась на базе бактериологической лаборатории ГБУЗ «Самарский областной клинический противотуберкулёзный диспансер им. Н. В. Постникова». Все штаммы, не идентифицированные до вида и культуры, определенные как микроорганизмы с высоким содержанием Г+Ц (High GC GR+) реидентифицированы на базе микробиологического отдела КДЛ клиник ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России с использованием MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT (Bruker®). Для идентификации использован метод экстракции бактериальных белков муравьиной кислотой. Если видовую идентификацию не удалось провести напрямую из пробирки с плотной яичной питательной средой, или из пробирки с жидкой питательной средой MGIT, культура пересевалась на 5% кровяной агар и универсальную хромогенную среду (BioRad). Посевы инкубировались в течение 7 сут при температуре 37° С, в случае отсутствия роста на первом этапе культивирования, посевы дополнительно инкубировали при 28° С в течение 14 сут. Идентификацию всех выросших микроорганизмов проводили с использованием MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT ((Bruker®) методом прямого нанесения или расширенного нанесения с муравьиной кислотой.

Результаты. Методом ДНК-гибридизации успешно идентифицировано до вида 188 штаммов, выделенных НТМ, что составило 59,5% от всех выделенных культур. Среди выделенных видов преобладали представители медленнорастущих НТМ (*M. avium* complex, *M. gordonae*, *M. kansasii*), которые составили в совокупности 67,0% от всех идентифицированных до вида штаммов НТМ. Среди быстрорастущих НТМ доминирующим видом была *M. fortuitum* (21,8% от общего количества

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-111-115

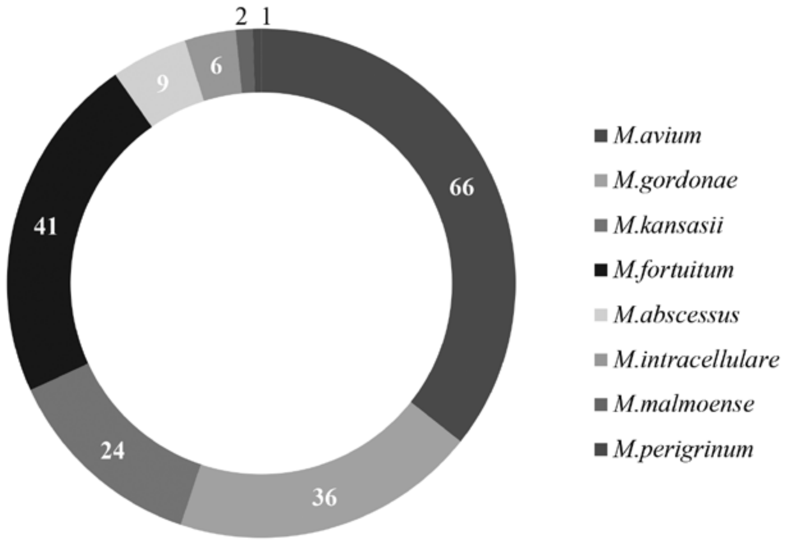

Рис. 1. Спектр нетуберкулёзных микобактерий, идентифицированных до вида с использованием метода ДНК-гибридизации (абсолютные значения).

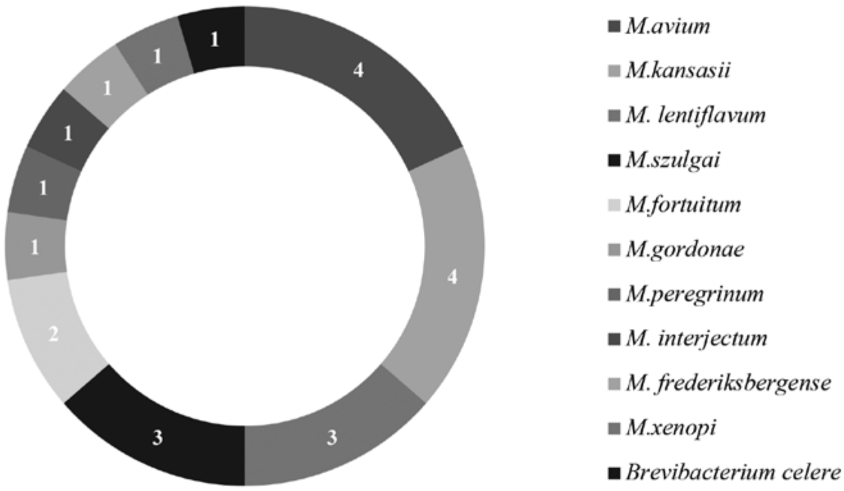

Рис. 2. Спектр микроорганизмов, первично идентифицированных до рода *Mycobacterium* (абсолютные значения).

идентифицированных до вида НТМ). Остальные виды НТМ представлены единичными штаммами (рис. 1).

Общее количество образцов, из которых культуры удалось идентифицировать до рода составило 22 (7% от всех образцов, включенных в исследование). Для 67 образцов (21,2% от всех образцов, включенных в исследование) не удалось провести идентификацию выделенных культур с использованием метода ДНК-гибридизации. Для 39 штаммов (12,3% от всех образцов) идентифицированы грамположительные микроорганизмы с высоким содержанием Г+Ц.

При реидентификации штаммов, отнесённых к роду *Mycobacterium* методом MALDI ToF масс-спектрометрии для всех штаммов определена видовая принадлежность. 1 штамм оказался представителем другого рода – *Brevibacterium celere*. Преобладающими видами в данной группе оказались медленно растущие НТМ: *M. kansasii, M. avium* (в совокупности 36,4%). Кроме одного штамма, идентифицированного как представитель рода *Brevibacterium*, в данной группе идентифицирован 1 штамм НТМ, который не мог быть идентифицирован до вида с использованием тест-системы Hain Lifescience – *M. frederiksbergense* (рис. 2).

Из 67 образцов, для которых не удалось провести приемлемую идентификацию выделено и идентифицировано 68 штаммов микроорганизмов. В данной группе микроорганизмов выявлено значительное разнообразие (рис. 3).

Доминировали представители рода *Mycobacterium,* они составили 70,6% от всех выделенных микроорганизмов, первичная идентификация которых с использованием метода ДНК-гибридизации не дала результатов. Среди НТМ выделены: 14 штаммов *M. gordonae*, по 11 штаммов *M. avium* и *M. kansasii*, 6 штаммов *M. fortuitum*,

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-111-115

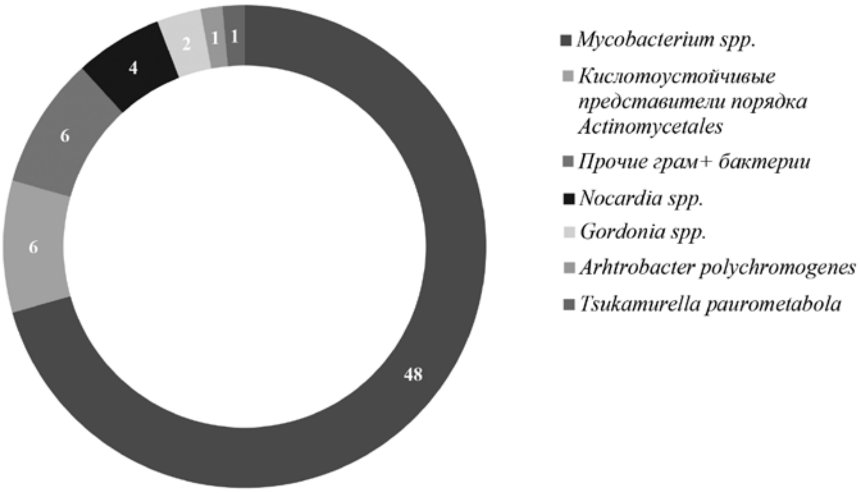

Рис. 3. Спектр микрофлоры не идентифицированной с использованием метода ДНК-гибридизации по группам (абсолютные значения).

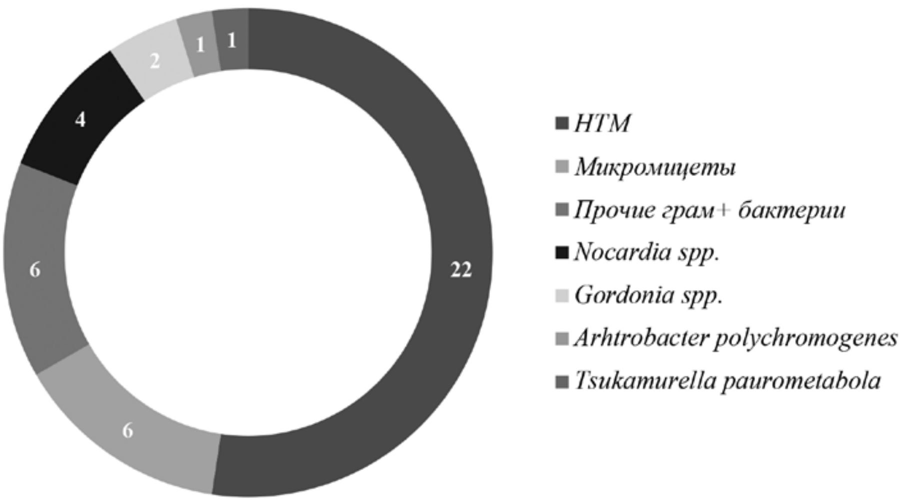

Рис. 4. Спектр микрофлоры, идентифицированной как грамположительные микроорганизмы, с высоким содержанием Г+Ц (абсолютные значения).

по 1 штамму *M. abscessus*, *M. bovis*, *M. chimaera/intracellulare*, *M. iranicum*, *M. pseudoshottsii*, *M. peregrinum*.

Второй по численности группой микроорганизмов, которые не были идентифицированы на первом этапе исследования оказались грамположительные палочки – представители родов *Corynebacterium* и *Bacillus*, которые составили 11,8%. Идентифицировано 3 штамма *Corynebacterium amycolatum*, по 1 штамму *Corynebacterium kroppenstedii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus oleoronius*, *Paenibacillus lactis*.

В данной группе микроорганизмов кроме НТМ оказались и другие кислотоустойчивые представители порядка *Actinomycetales*. Идентифицировано 3 штамма *Gordonia rubipertincta* и по 1 штамму *Tsukamurella paurometabola*, *Rhodococcus equi*, *Streptomyces phaeochromogenes*.

Кроме бактерий в группе неидентифицированных микроорганизмов оказались 4 штамма грибов, два из которых не удалось идентифицировать с помощью масс-спектрометрии до вида: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus* spp., *Ulocladium* spp., *Trichosporon asahii*.

Единственная микробная ассоциация, выявленная в данной группе микроорганизмов представлена *M. fortuitum* и *S. phaeochromogenes*.

В 39 образцах при проведении исследования методом ДНК-гибридизации получен результат свидетельствующий о принадлежности выделенной культуры к группе грамположительных микроорганизмов с высоким содержанием Г+Ц. Из образцов данной группы выделено и идентифицировано 42 штамма бактерий и грибов. Спектр выделенных микроорганизмов представлена на (рис. 4). В одном случае рост культуры при использовании описанного в исследовании метода отсутствовал, в 4 случаях выделена ассоциация, состоящая из 2 микроорганизмов.

В спектре НТМ преобладали медленно растущие виды. Идентифицировано: *M. gordonae* – 5 штаммов, *M. avium* и *M. chimaera*/*intracellulare* по 3 штамма, *M. kansasii* и *M. abscessus* по 2 штамма. Остальные виды НТМ идентифицированы по одному штамму: *M. fredericbergense*, *M. monacense*, *M. flavescens*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. bohemicum*, *M. septicum.* Среди кислотоустойчивых представителей порядка *Actinomycetales* кроме НТМ выделены: 3 штамма *Nocardia farcinica*, по 1 штамму *Gordonia rubripertincta*, *Gordonia sputi*, *Nocardia brevicatena*, *Tsukamurella paurometabola*.

Грибы представлены в основном *Candida albicans* (4 штамма), по 1 штамму *Magnusiomyces capitatus*, *Penicillium chrysogenum*.

Остальные микроорганизмы представлены грамположительными бактериями: 2 штамма *Kocuria marina*, по 1 штамму *Arhtrobacter polychromogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Stapylococcus lugdunensis*, *Corynebacterium amycolatum*.

Обсуждение. Анализируя полученные результаты можно выявить определённые закономерности, связанные с ограничением использования метода ДНК-гибридизации в отношении некоторых видов НТМ. Данным методом идентифицировано около 60% штаммов. Структура идентифицированных микобактерий совпадает данными других исследований [2, 7]. Преобладают медленно растущие НТМ, среди которых лидируют представители *M. avium* complex, *M.gordonae, M. kansasii*. Среди быстро растущих НТМ преобладают *M. fortuitum.*

Используемая в исследовании тест-система исключает идентификацию микобактерий, виды которых в неё не включены. По нашим результатам при её использовании не удалось провести видовую идентификацию и для тех видов, которые должны были быть идентифицированы. Из 22 образцов, в которых микобактерии идентифицированы до рода в 20 с использованием метода масс-спектрометрии определены виды, которые входят в перечень тест-системы. При этом один вид оказался не относящимся к роду *Mycobacterium*.

Среди культур, для которых методом ДНК-гибридизации не удалось провести приемлемую идентификацию оказались преимущественно НТМ, среди которых доминировали *M. gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*. Ряд НТМ представлен редкими видами: *M. iranicum, M. pseudoshottsii*. Важно то, что среди данной группы микроорганизмов выделены другие кислотоустойчивые аэробные актиномицеты, в том числе имеющие потенциальное клиническое значение: *Gordonia rubipertincta*, *Tsukamurella paurometabola, Rhodococcus equi* [8, 9].

Такие результаты могут быть обусловлены несколькими причинами: значительной вариабельностью внутри и между отдельными видами НТМ, что может приводить к неточной идентификации с использованием метода ДНК-гибридизации; практическим ограничением возможности разделения микст-культур и микробных ассоциаций в условиях микробиологических лабораторий противотуберкулёзной службы; отсутствием возможности выделения «прихотливых», труднокультивируемых и других микроорганизмов в рамках проведённого исследования, которые могли затруднять идентификацию.

Интересны результаты идентификации культур, содержащих высокие концентрации Г+Ц. Среди данной группы выявлено максимальное количество микробных ассоциаций, в том числе состоящих из двух видов НТМ (*M. monacense* + *M. flavescens*, *M. avium* + *M. kansasii*), ассоциации *M. gordonae* со стафилококками. В эту же группу попали редкие виды НТМ: *M. fredericbergense*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. bohemicum*, *M. septicum* и представители родов *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella*.

Заключение. Кислотоустойчивые представители порядка *Actinomycetales*, в том числе и нетуберкулёзные микобактерии представляют разнообразную группу микроорганизмов, имеющих ряд сходств и различий, способных значительно затруднять идентификацию указанных патогенов до вида. Использование методов, основанных на ДНК-гибридизации, с одной стороны, позволяет достаточно точно идентифицировать часть наиболее часто встречающихся видов НТМ, с другой стороны, имеет значительные ограничения идентификации в отношении редких видов. Отсутствие результатов по видовой идентификации части видов, которые включены в тест-систему требует проведения дополнительны исследований и поиска причин полученных результатов идентификации. MALDI-ToF масс-спектрометрия является важным методом, позволяющим проводить идентификацию до вида для большинства видов представителей порядка *Actinomycetales*. Необходимы алгоритмы, позволяющие стандартизировать методы их выделения из клинического материала и рекомендации по интерпретации полученных результатов и оценке клинического значения выделенных культур.

Конфликт интересов. *Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов*.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-6, 8,9 см. REFERENCES)

1. Чучалин А.Г. Респираторная медицина: в 2 т. (Т. 1). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
2. Майорова А.А., Степаншина В.Н., Коробова О.В., Шемякин, И.Г., Лазовская А.Л., Ильина Е.А. Видовая идентификация микобактерий нетуберкулезного комплекса методом амплификации и секвенирования генов 16S рРНК. *Журнал молекулярной генетики, микробиологии, вирусологии*. 2004; 3: 11-20.
7. Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю., Устинова В.В., Черноусова Л.Н. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GeoType Mycobacterium CM /AS (Hain Lifescience, Германия). *Туберкулез и болезни легких*. 2017; 5: 54-9.

REFERENCES

1. Chuchalin A.G. *Respiratory medicine* [Respiratornaya meditsina. T.2]. Moscow: GEOTAR - Media; 2007. (in Russian)
2. Maiyorova A.A., Stepanshina V.N., Korobova O.V., Shemyakin I.G., Lazovskaya A.L., Il'ina E.A. Specific identification of mycobacteria of a non-tuberculosis complex by amplification and sequencing of 16S rRNA genes. *Zhurnal molekulyarnoy genetiki, mikrobiologii, virusologii*. 2004; 3: 11-20. (in Russian)
3. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax*. 2016; 71: 1-22.
4. Springer B. Stockman L., Tescher K. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic method. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 296-303.
5. Daley C.L., Griffith C.L. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*. 2010; 14(6): 665-71.
6. Rodriguez-Temporal D., Perez-Risco D., Struzka E.A, Mas M., Alcaide F. Evaluation of Two Protein Extraction Protocols Based on Freezing and Mechanical Disruption for Identifying Nontuberculous Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from Liquid and Solid Cultures. *J. Clin. Microbiol*. 2018; 56(4): e01548-17.
7. Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Andrievskaya I.Ju., Ustinova V.V., Chernousova L.N. Monitoring of species diversity of nontuberculous mycobacteria in different areas using Geo-Type Mycobacterium CM / AS DNA strips (Hain Lifescience, Germany). *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2017; 5: 54-9.(in Russian)
8. McNeil M.M., Brown J.M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1994: 7(3); 357-417.
9. Safaei S., Fatahi-Bafghi M., Pouresmaeil O. Role of Tsukamurella species in human infections: first literature review. *New Microbes New Infect*. 2017; 22: 6-12.

Поступила 02.12.19
Принята к печати 09.12.19

Чеботарь И. В.[1], Бочарова Ю. А.[2], Гурьев А. С.[3,4], Маянский Н. А.[1]

СТРАТЕГИИ ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ КОНТАКТА С АНТИБИОТИКАМИ

[1]ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, 119571, Москва, Россия;
[2]ФГАУ «НМИЦ Здоровья детей» Минздрава РФ, 119296, Москва, Россия;
[3]ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, 129110, Москва, Россия;
[4]ООО «Медтехнопарк», 117292, Москва, Россия

Выживание бактерий в условиях антимикробной терапии является глобальной проблемой здравоохранения. Обзор отражает сложность и многоликость механизмов нейтрализации антибиотиков бактериями. Поиск источников для анализа проблемы выполнялся по базам данных PubMed, Российской научной электронной библиотеке eLIBRARY, поисковым система Всемирной организации здравоохранения, Европейского общества микробиологии и инфекционных болезней (ESCMID). Анализ стратегий выживания в условиях воздействия антибиотиков позволил предложить новую классификацию устойчивых бактерий. Критерии классификации включают способность к размножению в условиях действия антибиотиков, наличие эволюционной закреплённости признака в рамках вида и наличие специализированных генов, детерминирующих переход в состояние с пониженным/выключенным метаболизмом. Две основные группы представлены резистентными бактериями и бактериями с пониженным или приостановленным метаболизмом (БППМ), которые выживают, но не размножаются в присутствии антибиотика. Первая группа включает две подгруппы: бактерии с природной резистентностью и бактерии с адаптивной резистентностью. Вторая группа включает (1) бактерии, несущие специализированные гены трансформации клетки в состояние с пониженным или приостановленным метаболизмом, (2) бактерии, трансформирующиеся в состояние с пониженным или приостановленным метаболизмом без участия специализированных генов, (3) клеточные формы с особым морфологическим строением - споры, цисты, цистоподобные клетки. Описаны полезные свойства предлагаемой классификации, к которым относятся: улучшение понимания взаимосвязей между выживаемостью бактерий в присутствии антибиотиков и молекулярными механизмами подавления клеточного метаболизма, наличие или отсутствие мишеней для применения молекулярно-генетических методов определения варианта устойчивости бактерий, возможность разработки методов рациональной противомикробной терапии.

Ключевые слова: *бактерии; антибиотики; резистентность; персистенция; толерантность; дормантные бактерии.*

Для цитирования: *Чеботарь И. В., Бочарова Ю. А., Гурьев А. С., Маянский Н. А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 116-121. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121*

Chebotar I. V.[1], Bocharova Yu. A.[2], Gur'ev A. S.[3,4], Mayansky N. A.[1]

BACTERIA SURVIVAL STRATEGIES IN CONTACT WITH ANTIBIOTICS

[1]Pirogov Russian National Research Medical University, 119571, Moscow;
[2]National Medical Research Center for Children's Health, 119296, Moscow;
[3]M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), 129110, Moscow;
[4]Medtechnopark Ltd., 117292, Moscow,Russia

Bacteria survival in the conditions of antimicrobial therapy is the global problem of health care. This review highlights the complexity and diversity of mechanisms used by bacteria to neutralize antibiotics. To analyze the problem, the search was made using PubMed database, Russian scientific electronic library eLIBRARY, search system of World Health Organization and European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Based on the analysis of survival strategies in the conditions of antibiotics action we propose new classification of resistant bacteria. Classification criteria include the ability to divide under antibiotics action, the survival strategies application as a species trait, the presence of specialized genes determining the transition to the state with reduced/stopped metabolism. Two main groups are resistant bacteria and bacteria with reduced/stopped metabolism, which survive but do not divide in the presence of antibiotic. The first group includes two subgroups: bacteria with intrinsic and adaptive resistance. The second group includes (1) bacteria with specialized genes responsible for cell transformation to the state with reduced/stopped metabolism, (2) bacteria transforming to the state with reduced/stopped metabolism without involvement of special genes, and (3) cell forms with special morphology – spores, cysts and cyst-like cells. We described the usefulness of proposed classification including improved understanding of the correlation between bacteria survival in the presence of antibiotics and molecular mechanism of cell metabolism inhibition, presence or absence of targets for using molecular-genetic methods of bacteria resistant variant determination, the possibility for development of rational antimicrobial therapy methods.

Key words: *bacteria; antibiotics; resistance; persistence; tolerance; dormant bacteria.*

For citation: *Chebotar I. V., Bocharova Yu. A., Gur'ev A. S., Mayansky N. A. Bacteria survival strategies in contact with antibiotics. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 116-121 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121*

For correspondence: *Bocharova Yu. A.,* MD, PhD, Microbiological laboratory; e-mail: ivrin7@gmail.com

Для корреспонденции: Бочарова Юлия Александровна, канд. мед. наук, лаб. микробиологии; e-mail: ivrin7@gmail.com

Information about authors:

Chebotar I., http://orcid.org/0000-0002-6691-2171
Bocharova Yu., http://orcid.org/0000-0003-0197-0255
Gur'ev A., https://orcid.org/0000-0001-8823-7819
Mayansky N., http://orcid.org/0000-0001-8077-5313

Acknowledgment. *The investigation was supported by RFBR grant, research project № 18-015-00301.*

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

Received 21.10.2019
Accepted 30.10.2019

Устойчивость бактерий к антибиотикам становится одной из самых важных проблем современной медицины. Глобальные масштабы и высокая степень опасности, связанные с антибиотикорезистентностью, стали расцениваться как угрозы для всего человечества [1, 2]. Международные организации начали проведение комплексных мероприятий по сдерживанию распространения резистентности, которые включают мониторинг резистентности, сохранение и анализ полученных данных, принятие и реализацию оптимальных управленческих и законодательных решений. Перечисленные мероприятия должны базироваться на научном понимании всех аспектов, связанных с феноменом резистентности. Не случайно в глобальный план действий ВОЗ по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам (WHO Global action plan on antimicrobial resistance) среди стратегических задач программы на первое место поставлена задача «улучшения понимания вопросов устойчивости к противомикробным препаратам» (WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015. Avaiable at: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/ (accessed 1 October 2019)).

Представление о резистентности у практических микробиологов зачастую ограничивается лишь поверхностным знанием правил оценки адаптивной резистентности, изложенных в соответствующих рекомендациях. Научные статьи изобилуют примерами незнания авторами природной резистентности (intrinsic resistance) бактерий [3, 4]. Подобные факты свидетельствуют о том, что многие очень важные аспекты выживания бактерий при контакте с антибиотиками остаются неизвестными для медицинских работников. Это касается даже элементарного вопроса о том, что такое резистентность? Оказывается, смысл термина «резистентность» не имеет однозначного толкования. Отечественные эксперты определяют микроорганизм как резистентный, если он «имеет механизмы резистентности к данному препарату, и при лечении инфекций, вызванных этим возбудителем, нет клинического эффекта от терапии даже при использовании максимальных терапевтических доз антибиотика» [5]. Эксперты Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) выражают ту же мысль более коротко в сугубо клиническом понимании: «Микроорганизм классифицируется как резистентный, когда существует высокая вероятность терапевтической неудачи даже при усиленной экспозиции антибиотика» (Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. Avaiable at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints (accessed 1 October 2019)). Такое определение соответствует всем устойчивым формам бактерий, включая толерантные и персистирующие (персистеры). И толерантность, и персистенция могут быть причиной терапевтических неудач даже при использовании антибиотиков в высоких дозах и длительном применении [6]. При этом толерантные и персистирующие формы не могут быть детектированы общепринятыми методами оценки антибиотикорезистентности - методом серийных разведений и дискодиффузионным методом.

Эксперты ВОЗ трактуют резистентность иначе: «Резистентность – способность размножаться в присутствии концентраций лекарств, превышающих терапевтические концентрации при лечении человека» (WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015. Avaiable at: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/ (accessed 1 October 2019)). Такое определение содержит противопоставление между резистентностью и персистенцией/толерантностью, так как минимальные подавляющие концентрации (МПК) для популяции, содержащей толерантные или персистирующие бактерии, не отличаются от МПК чувствительных бактерий.

Выживание бактерий в условиях контакта с антибиотиками – многоликий феномен, демонстрирующий эффективность различных бактериальных стратегий ускользания от антибиотиков. Немалое место среди устойчивых форм занимают бактерии с пониженным либо приостановленным метаболизмом (БППМ). Проблеме БППМ посвящено большое количество научных работ и монографий [6 - 9]. Несмотря на это, феномен БППМ остается ещё неизвестным явлением для большинства врачей-практиков. Непонимание связано с двумя главными причинами. Во-первых, в медицинском сообществе нет массового осознания клинической значимости БППМ и необходимости количественной оценки этого феномена для корректировки терапии. Во-вторых, отсутствуют валидированные методы, при помощи которых можно количественно оценить присутствие БППМ в исследуемых пробах и интерпретировать клиническое значение полученных результатов. Возникает порочный круг, который включает следующую цепь событий: «отсутствует осознание клинической значимости БППМ → не разрабатываются основанные на лабораторных данных методы терапевтической элиминации БППМ → отсутствует интерес компаний-производителей диагностических систем, что связано с отсутствием потребности лабораторий в их использовании → не разрабатываются и не производятся валидированные тест-системы для оценки феномена БППМ в клинических пробах → не накапливается информация, подтверждающая клиническую значимость БППМ → отсутствует осознание клинической значимости БППМ».

Первый шаг, который мог бы разорвать этот порочный круг, должен быть направлен на информирование медицинской общественности о важности исследования всех форм устойчивости бактерий к антибиотикам, не ограничиваясь изучением адаптивной резистентности в понимании экспертов EUCAST или ВОЗ. Для этого следует решить следующие задачи: 1) исключить неоднозначность понимания терминов, обозначающих разные формы устойчивости к антибиотикам; 2) разработать классификацию, отражающую сходство и различия основных стратегий выживания бактерий в присутствии антибиотиков; 3) добиться общественного понимания опасности БППМ для пациентов с бактериальными инфекциями.

Предложено разделить все варианты устойчивости к антибиотикам на три группы по двум признакам – МПК и выживаемости в присутствии антибиотиков [9]. В качестве индикатора выживаемости авторы использовали оригинальный критерий – минимальное время киллинга (МВК, в *англ*. транскрипции MDK от «the minimum duration for killing») бактерий. К первой группе они отнесли бактерии, которые размножались в присутствии антибиотиков в высоких концентрациях и названы «резистентными». Во вторую группу включены толерантные бактерии, которые не отличались от чувствительных по значениям МПК, но 99% из них имели МВК значительно больше, чем МВК чувствительных бактерий. Третью группу составили персистирующие бактерии (персистеры), которые не отличались от чувствительных по значениям МПК, но 99,99% из них имели МВК значительно больше, чем МВК толерантных бактерий. Недостатком этой классификации является отсутствие учёта специфических генов-детерминант резистентности и эволюционной закреплённости описываемых феноменов. В группу толерантных бактерий попали и функциональные формы (дормантные бактерии из «состарившихся» культур с приостановленным метаболизмом), и бактерии-носители генов, детерминирующих переход бактерий в толерантное состояние. В классификации A.Brauner и соавт. отсутствует упоминание об очень важной форме эволюционно закрепленной видоспецифичной устойчивости – природной резистентности. Содержание более поздней работы направлено в большей степени на клиническую трактовку форм персистенции, а согласно авторским определениям, термины «толерантность» и персистенция» фактически являются синонимами [10]. Акцент сделан на анализе отличий группы «жизнеспособных, но некультивируемых бактерий» от других форм БППМ [11].

Предлагается новый вариант классификации бактерий, способных выживать в присутствии антибиотиков, которая учитывает вышеперечисленные нюансы (см.рисунок).

В основу классификации положены следующие критерии: способность к размножению в условиях воздействия антибиотика, эволюционная закрепленность признака в рамках вида, наличие специализированных генов, детерминирующих переход в состояние с пониженным/выключенным метаболизмом.

Все стратегии выживания в условиях контакта с антибиотиками в предлагаемой классификации разделены на две большие группы по признаку способности размножаться в присутствии антибиотиков. К первой группе относятся бактерии с нормальным метаболизмом, которые способны размножаться в присутствии антибиотика при концентрациях, превышающих МПК чувствительных (диких) штаммов. Эта группа включает две подгруппы – бактерии с природной (intrinsic) резистентностью и бактерии с приобретённой (adaptive) резистентностью. Природная резистентность – эволюционно-закрепленное для данного вида бактерий свойство выживать, расти и размножаться в присутствии определённых антибиотиков. Природная резистентность чаще базируется на комплексных механизмах, сочетающих (в разных вариантах для разных бактерий) отсутствие мишеней для некоторых групп антибиотиков, наличие

Классификация бактерий, способных выживать в присутствии антибиотиков. На схеме показаны группы и подгруппы, объединенные согласно следующим критериям: способности к размножению в условиях действия антибиотиков, наличию эволюционной закрепленности признака в рамках вида и наличию специализированных генов, детерминирующих переход в состояние с пониженным/выключенным метаболизмом.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121

естественно продуцируемых ферментов, инактивирующих антибиотики, отсутствием проницаемости, гиперфункцией эффлюкс-помп [12]. Наличие природной резистентности к конкретному антибиотику означает клиническую неэффективность применения этого антибиотика в отношении всех представителей вида. Природная резистентность – видовой признак. Обладая природной резистентностью, вид демонстрирует резистентность лишь к определённым антибиотикам, перечень которых устанавливается экспертами CLSI, EUCAST, CA-SFM в качестве аксиом для практических микробиологов. Природная резистентность у каждого изолята бактерий к конкретному перечню антибиотиков может сочетаться с наличием у некоторых штаммов того же вида адаптивной резистентности к другим антибиотикам.

Под термином адаптивная или приобретенная резистентность следует понимать свойство штамма бактерий выживать, расти и размножаться в присутствии определённых антибиотиков, которые могут подавлять рост и размножение диких (чувствительных) штаммов того же вида. Адаптивная резистентность, в отличие от природной, не определяется видовой принадлежностью, а является свойством лишь некоторых штаммов вида, обладающих генетически индуцируемыми механизмами защиты от действия антибиотиков. Генетическое детерминирование адаптивной резистентности возникает не только из-за приобретения генов резистентности за счёт горизонтального переноса и мутаций, нарушающих восприимчивость к антибиотикам. Реализация адаптивной резистентности может происходить без структурных изменений генома, а исключительно за счёт регуляции экспрессии генов, приводящей к активации (эффлюкс-механизмы) либо угнетению (проницаемость) механизмов взаимодействия антибиотика с клеткой. Молекулярные механизмы адаптивной резистентности похожи на механизмы природной резистентности и сводятся к тем же феноменам - исчезновение мишени для антибиотика, продукция ферментов, инактивирующих антибиотики, снижение проницаемости, гиперфункция эффлюкс-помп [13]. Главное отличие заключается в том, что при адаптивной резистентности они не являются эволюционно закреплёнными. Для лабораторной оценки адаптивной резистентности используются постоянно обновляемые сложные алгоритмы, детально описанные в рекомендациях CLSI, EUCAST, CA-SFM.

Вторая группа стратегий выживания в условиях контакта с антибиотиками объединяет формы БППМ, которые способны выживать, но не размножаться в присутствии антибиотика. К этой группе относятся: 1) бактерии, несущие специализированные гены трансформации клетки в состояние с пониженным или приостановленным метаболизмом; 2) бактерии, трансформирующиеся в состояние с пониженным или приостановленным метаболизмом без участия специализированных генов; 3) клеточные формы с особым морфологическим строением - споры, цисты, цистоподобные клетки.

Под специализированными генами трансформации клетки в состояние с пониженным или приостановленным метаболизмом следует понимать генетическую пару «токсин-антитоксин», функция которой подробно описана ранее [14]. В условиях стресса продукция антитоксина может частично подавляться, что не приводит к необратимой гибели клетки, но трансформирует её в персистирующее состояние. Способность модулировать персистирующее состояние доказана для 27 вариантов пары «токсин-антитоксин» в отношении самых разнообразных бактерий [6]. Эта стратегия не является облигатным признаком вида, ей могут воспользоваться только особи, являющиеся носителями генов «токсин-антитоксин» или их аналогов. Как правило, персистеры нечувствительны практически ко всем антибиотикам. Количество потенциальных персистеров в исследуемой бактериальной популяции может быть важным прогностическим признаком течения инфекционного процесса [8].

Самые многообразные варианты ингибирования метаболизма присутствуют при формировании БППМ без участия специализированных генов. В литературе используется множество терминов, характеризующих состояние пониженного или приостановленного метаболизма бактерий. Большинство терминов не учитывает механизмы формирования БППМ, а лишь фиксирует выраженность внешнего проявления феномена. Отсюда возникли названия: дормантные (покоящиеся), анабиотические, криптобиотические, «спящие» («somni cells»), персистирующие, «жизнеспособные, но некультивируемые», «активные, но некультивируемые», «нерастущие, но метаболически активные», «условно жизнеспособные», «ещё некультивируемые» [7, 11, 15 - 21]. Не исключено, что разные термины отражают количественные степени подавления метаболизма, запускаемые одним и тем же механизмом. Относительно стратегий формирования пула БППМ имеется несколько теорий. Наиболее популярна теория стресс-ответа бактерии на негативное изменение условий внешней среды [22]. Это подтверждается фактами усиления экспрессии генов, участвующих в регуляции разнообразных вариантов ответа на повреждающие воздействия. У *Escherichia coli* стресс может индуцировать активацию регулона стационарной фазы *rpoS*, который объединяет около 50 генов в единый функциональный инструмент подавления бактериального метаболизма [23, 24]. Наличие аналогичных генетических ансамблей подтверждено и у других бактерий. Гены, участвующие в подавлении метаболизма, не являются узко специализированными регуляторами дормантных состояний. Часть из них в разных комбинациях используется для реализации других клеточных функций, поэтому мы вправе говорить о неспецифичности этих генов. Существует точка зрения, согласно которой конечный эффект от активации стресс-генов зависит не только от характера стресса (голодание, действие антибиотиков, экстремальные температуры, водно-солевой или кислотный дисбаланс, воздействие кислородных радикалов и т. д.), но и от того, в какой фазе клеточного цикла находится бактерия в момент стресса. Существует и другая теория, основанная на стохастичности физиологических состояний клеток в бактериальной популяции [25]. Её сторонники полагают, что в популяции растущих бактерий постоянно присутствует пул клеток с подавленным метаболизмом, флуктуации внешней среды могут ещё в большей степени угнетать физиологических процессы этих клеток. Воздействие антибиотиков не оказывает на клетки БППМ губительного эффекта. Этим объясняются эксперименты, которые доказали, что доля устойчивых к пенициллину клеток в популяции чувствительного штамма стафилококка не возрастает при попытке избирательного культивирования изолятов из резистентных колоний [26]. Считаем, что теория стохастичности не противоречит теории стресса, а, скорее, дополняет её. Можно предположить, что формирование пула покоящихся бактерий является фазой клеточного цикла, при которой флуктуации играют роль стресс-факторов, индуцирующих дальнейшее ингибирование метаболизма и трансформацию клетки в ту или иную форму БППМ. В процесс формирования БППМ вовлекаются все основные метаболические пути, включая обмен углерода, энергетический метаболизм, процессы массообмена (проницаемость и эффлюкс-системы) и катаболизма [27]. Степень этих изменений может быть различной. Исследователи не пришли к окончательному выводу о том, является ли дормантное состояние формой активного существования бактерий в период воздействия стресс-факторов или стресс является только триггером, который трансформирует клетку в неактивное состояние [28]. Формирование БППМ без участия специализированных генов представляет собой стратегию, не являющуюся облигатным признаком вида.

Феномен БППМ может быть не только функциональным, он может сочетаться с особым морфологическим строением, при котором клетки не только приостанавливают метаболизм, но и кардинально меняют свою архитектуру и химический состав. Типовыми формами этой когорты БППМ являются споры (эндоспоры), цисты, цистоподобные клетки. Способность к спорообразованию, формированию цист, цистоподобных клеток является эволюционно закреплённым процессом и контролируется ансамблями специализированных генов [29, 30].

Предлагаемая классификация бактерий, способных выживать в присутствии антибиотиков, имеет теоретическое и практическое значение. Она помогает осознать, что устойчивость бактерий к антибиотикам не ограничивается только адаптивной и природной резистентностью. Взгляд через призму предлагаемой классификации позволяет увидеть не только рутинно выявляемую резистентность, но и обратить внимание на стратегии выживания бактерий, которые представляют собой «тёмную сторону» резистентности.

Классификация позволяет увидеть варианты устойчивости, связанные с существованием специфических генетических детерминант, а следовательно, - перспективных мишеней для выявления молекулярно-генетическими методами. Естественно, что диагностика должна иметь клиническое значение и служить основой для разработки методов рациональной противомикробной терапии. В литературе обсуждается более 60 субстанций, которые могут убивать БППМ [31]. Надеемся, что предлагаемая классификация поможет рационализировать подходы к терапевтической эрадикации возбудителя в зависимости от его стратегии выживания в условиях воздействия антибиотика.

Заключение. Детальное изучение резистентных возможностей бактерии показывает множественность механизмов нейтрализации действия антибиотиков на бактерии. Проблема усугубляется отсутствием единого толкования терминов «резистентность, «толерантность», «персистенция». Как всякий феномен, включающий в себя разнородные явления, устойчивость к антибиотикам требует классификации, основанной на объективных и понятных критериях. Анализ вариантов выживания позволил определить оптимальные критерии классификации устойчивых к антибиотикам бактерий, а именно (1) способность к размножению в условиях действия антибиотиков, (2) наличие эволюционной закреплённости признака в рамках вида, (3) наличие специализированных генов, детерминирующих переход в состояние с пониженным/выключенным метаболизмом. Построенная на этих критериях классификация является логичной для понимания основных стратегий выживания бактерий в условиях антибактериальной терапии. Надеемся, что изложенный в обзоре материал заинтересует не только микробиологов, но и станет полезным для производителей диагностических систем в разработке новых подходов к оценке устойчивости бактерий к антибиотикам. Пришло время задуматься о создании и внедрении воспроизводимых и доступных методов исследования микробных изолятов, нацеленных на выявление их толерантных и персистирующих свойств. Мы осознаем, что предложенная классификация может быть несовершенной, поэтому приглашаем к дискуссии всех заинтересованных специалистов, работающих в области клинической микробиологии.

Финансирование. *Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку со стороны РФФИ (проект №18-015-00301 «Реактивность нейтрофилов при взаимодействии с грамотрицательными бактериями-персистерами»).*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 6, 9 – 31 см. REFERENCES)

3. Кузьменко С.А., Брежнева Н.И., Гончаров А.Е., Тутельян А.В. Характеристика свойств внутрибольничной популяции *Klebsiella pneumoniae*. Фундаментальная и клиническая медицина. 2019; 4(2): 58-65.
4. Щукин П.П., Стрельникова Н. В., Кольцов И.П. Клинически значимые штаммы микроорганизмов при хронических послеоперационных остеомиелитах грудины. *Тенденции развития науки и образования*. 2019; 47(5): 73-6.
5. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Смоленск: Изд-во НИИАХ СГМА; 2007.
7. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романов Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина; 2005.
8. Евдокимова Н. В., Чёрненькая Т. В. Персистирующие клетки микроорганизмов – новый взгляд на старую проблему. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15(3):192-7.

REFERENCES

1. Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti F. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*. 2016; 109(7): 309-18.
2. Klein E.Y., Van Boeckel T.P., Martinez E.M., Pant S., Gandra S. et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 115(15): E3463-E3470.
3. Kuzmenko S.A., Brezhneva N.I., Goncharov A.E., Tutelyan A.V. Features of nosocomial Klebsiella pneumoniae population. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina*. 2019; 4(2): 58-65. (in Russian)
4. Schukin P.P., Strelnikova N.V., Koltsov I.P. Clinically significant strains of bacteria in chronic postoperative osteomyelitis of the sternum. *Tendentsii razvitiya nauki i obrazovaniya*. 2019; 47(5): 73-6. (in Russian)
5. Strachunsky L.S., Belousov Yu.B., Kozlov S.N. Practical guidance on anti-infectious chemotherapy. [Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii]. Smolensk: Izd-vo NIIAKh SGMA; 2007. (in Russian)
6. Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels, J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017; 41(3): 219-51.
7. Bukharin O. V., Ginzburg A. L., Romanov Yu. M., El-Registan G.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121

I. Mechanisms of survival in bacteria. [Mekhanizmy vyzhivaniya bakteriy]. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
8. Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V. Persister microbial cells: a novel view on the old problem. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2013; 15(3):192-7. (in Russian)
9. Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*. 2016; 14(5): 320-30.
10. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*. 2017; 15(8): 453-64.
11. Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J.D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *Journal of bacteriology*. 2018; 200(20): e00249-18. Avaiable at: https://doi.org/10.1128/JB.00249-18 (accessed 1 October 2019).
12. Cox G., Wright G.D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*. 2013; 303(6-7): 287-92.
13. Sandoval-Motta S., Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine.* 2016; 8(3): 253-67.
14. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology.* 2007; 5(1): 48-58.
15. Clegg J.S. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. *Biochemistry and Molecular Biology*. 2001; 128(4): 613-24.
16. Kell D., Potgieter M., Pretorius E. Individuality, phenotypic differentiation, dormancy and 'persistence' in culturable bacterial systems: commonalities shared by environmental, laboratory, and clinical microbiology. F1000Research. 2015; 4: 179. Avaiable at: https://doi.org/10.12688/f1000research.6709.2 (accessed 1 October 2019).
17. Kamruzzaman M., Udden S.M., Cameron D.E., Calderwood S.B., Nair G.B., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental Vibrio cholerae. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2010; 107(4): 1588-93. Avaiable at: https://doi.org/10.1073/pnas.0913404107 (accessed 1 October 2019).
18. Manina G., McKinney J.D. A single-cell perspective on nongrowing but metabolically active (NGMA) bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2013; 374: 135-61.
19. Nelson E.J., Chowdhury A., Flynn J., Schild S., Bourassa L. et al. Transmission of Vibrio cholerae is antagonized by lytic phage and entry into the aquatic environment. *PLoS Pathog.* 2008; 4:e1000187. Avaiable at: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000187 (accessed 1 October 2019).
20. Potgieter M., Bester J., Kell D.B., Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol Rev*. 2015; 39: 567-91.
21. Helaine S., Kugelberg, E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends in microbiology*. 2014; 22(7): 417-24.
22. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. *Current opinion in microbiology*. 2011; 14(5): 593-8.
23. Loewen P., Hu B., Strutinsky J., Sparling R. Regulation in the rpoS regulon of Escherichia coli. *Canadian journal of microbiology*. 1998; 44(8): 707-17.
24. Battesti A., Majdalani, N., Gottesman S. The RpoS-mediated general stress response in Escherichia coli. *Annual review of microbiology*. 2011; 65: 189-213.
25. Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004; 305(5690):1622-5.
26. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet.* 1944; 244: 497-500.
27. Wilmaerts D., Windels E.M., Verstraeten N., Michiels J. General mechanisms leading to persister formation and awakening. *Trends in Genetics*. 2019; 35(6): 401-11.
28. Wood T.K., Knabel S.J., Kwan B.W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol*. 2013; 79(23): 7116-21.
29. Jedrzejas M.J., Huang, W.J. Bacillus species proteins involved in spore formation and degradation: from identification in the genome, to sequence analysis, and determination of function and structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2003; 38(3): 173-98.
30. Wharton D.A. Life at the Limits: Organisms in Extreme Environments. Cambridge and New York: Cambridge University Press; 2002.
31. Defraine V., Fauvart M., Michiels J. Fighting bacterial persistence: Current and emerging antipersister strategies and therapeutics. *Drug Resistance Updates*. 2018; 38: 12-26.

Поступила 21.10.19

Принята к печати 30.10.19

Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Шемякин И.Г., Шепелин А.П.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТБ ТЕСТ-НАБОРА ДЛЯ УСКОРЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M. TUBERCULOSIS*

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, п. Оболенск, Московская обл., Россия

Приведены результаты сравнительного тестирования чувствительности клинических штаммов M. tuberculosis к изониазиду, стрептомицину, рифампицину, этамбутолу с использованием разработанного в ГНЦ ПМБ (Оболенск) ТБ тест-набора и метода абсолютных концентраций; ТБ тест-набора и автоматизированной системы BACTEC MGIT 960. Тестированы 629 и 220 штаммов M. tuberculosis, соответственно. Показана высокая степень совпадения результатов: 89,1-98,6% для изониазида, 96,2-98,0% для рифампицина, 91,5-98,2% для стрептомицина, 89,1-95,9% для этамбутола. Наименьшее количество расхождений результатов получено при сравнении ТБ тест-набора и BACTEC MGIT 960.
Проведён анализ несовпадающих результатов методами пропорций, ПЦР-секвенирования, или повторного тестирования на новых сериях ТБ тест-набора и среды Левенштейна-Йенсена с противотуберкулёзными препаратами, после которого чувствительность, специфичность и эффективность ТБ тест-набора превысили 95% для всех противотуберкулёзных препаратов.
Время получения результатов с ТБ тест-набором (среднее 9,25-9,9 дней, диапазон от 8 до 13 дней) значительно короче, чем с использованием метода абсолютных концентраций (среднее 21-23 дней, диапазон от 20 до 28 дней) и соизмеримо с временем получения результатов с BACTEC MGIT 960 (среднее 7,2 дней, диапазон от 5 до 12 дней). ТБ тест-набор прост в использовании, не требует дорогостоящего оборудования и специальной подготовки персонала.

Ключевые слова: *ТБ тест-набор; лекарственная чувствительность M. tuberculosis; изониазид; стрептомицин; рифампицин; этамбутол; метод абсолютных концентраций; нитратредуктазный метод; BACTEC MGIT 960.*

Для цитирования: *Домотенко Л.В., Морозова Т.П., Шемякин И.Г., Шепелин А.П. Опыт использования ТБ тест-набора для ускоренного определения лекарственной чувствительности M. tuberculosis. Клиническая лабораторная диагностика.2020; 65 (2): 122-130. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130*

Domotenko L. V., Morozova T.P., Shemyakin I.G., Shepelin A. P.

EXPERIENCE OF USING TB TEST KIT FOR THE RAPID DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF *M. TUBERCULOSIS*

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia

The results of the comparative testing of the susceptibility of M. tuberculosis clinical strains to isoniazid, streptomycin, rifampicin and ethambutol using the TB test kit, developed in SCRAMB, (Obolensk) and the absolute concentrations method; the TB test kit and the BACTEC MGIT 960 automated system are presented in the study. A total of 629 and 220 strains, respectively, were tested. A high degree of agreement of the results was shown: 89.1-98.6% for isoniazid, 96.2-98.0% for rifampicin, 91.5-98.2% for streptomycin and 89.1-95.9% for ethambutol. The smallest number of discrepancies in the results was obtained when comparing the TB test kit and BACTEC MGIT 960. The discrepant results analysis was performed by the proportion method, PCR sequencing, or re-testing on new lots of the TB test kit and Lowenstein-Jensen medium with anti-tuberculosis drugs, after which the sensitivity, the specificity and the efficiency of the TB test kit have exceeded 95 % for all anti-tuberculosis drugs.
The turnaround time with the TB test kit (median 9.25–9.9 days, ranged from 8 to13 days) was significantly shorter than that with the absolute concentration method (median 21-23 days, ranged from 20 to 28 days) and is commensurate with the turnaround time with BACTEC MGIT 960 (average 7.2 days, ranged from 5 to 12 days).
The TB test kit is easy to use, does not require expensive equipment and special staff training.

Keywords: *TB test kit; drug susceptibility testing of M. tuberculosis; isoniazid; streptomycin; rifampicin; ethambutol; the absolute concentration method; nitrate reductase assay; BACTEC MGIT 960.*

For citation: *Domotenko L. V., Morozova T.P., Shemyakin I.G., Shepelin A. P. Experience of using TB test kit for the rapid drug susceptibility testing of M. tuberculosis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 122-130. (in Russ.)*

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130

For correspondence: *Domotenko L.V.,* Lied Researcher, Laboratory of Nutrient Medium Development; e-mail: domotenko@obolensk.org

Information about authors:

Domotenko L.V., http://orcid.org/0000-0002-4785-6418
Morozova T.P., https://orcid.org/0000-0002-1891-9918
Shemyakin I.G., http://orcid.org/0000-0001-9667-1674.
Shepelin A.P., http://orcid.org/0000-0002-8253-7527

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 26.12.2019
Accepted 04.01.2020

Для корреспонденции: *Домотенко Любовь Викторовна*, вед науч. сотр. лаб. разработки питательных сред; e-mail: domotenko@obolensk.org

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130

Введение. Туберкулёз (ТБ) остается серьёзной проблемой здравоохранения в мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2018 г. в мире около 10 млн человек заболели туберкулёзом, умерли от данной болезни 1,2 млн ВИЧ-отрицательных и 251 000 ВИЧ-инфицированных людей [1]. Сохраняется угроза лекарственно-устойчивого туберкулёза. В 2018 г. зарегистрировано около полумиллиона новых случаев туберкулёза с устойчивостью к рифампицину (из которых 78% имели туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью). В мире 3,4% новых случаев туберкулёза и 18% ранее пролеченных случаев имели туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью или рифампицин-резистентный туберкулёз, причём самые высокие показатели (>50% в ранее пролеченных случаях) на постсоветском пространстве.

В Российской Федерации в 2018 г. зарегистрировано почти 64,7 тыс. новых случаев туберкулёза, показатель заболеваемости составил 44,06 на 100 тыс. населения, достигая в некоторых территориях очень высокого уровня: например, 187,56 (Чукотский автономный округ), 139,63 на 100 тыс. населения (Республика Тыва) [2]. В учреждениях уголовно-исполнительной системы показатель заболеваемости впервые выявленным туберкулёзом составил 856,41 на 100 тыс.человек.

Лечение лекарственно-устойчивого туберкулёза требует быстрой диагностики. Быстрое обнаружение лекарственной устойчивости является главной задачей для снижения риска распространения резистентных штаммов возбудителя. Общепринятые методы определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis*, такие как метод абсолютных концентраций, длительны и требуют 3-4 нед для получения результатов [3]. Автоматизированные системы, такие как BACTEC MGIT 960[4-5] и молекулярные тесты, такие как молекулярные биочипы, Xpert MTB/RIF и др. более быстрые и существенно ускоряют тестирование лекарственной чувствительности [6-9]. Современные коммерческие молекулярные тесты могут определять лишь определённое количество детерминант устойчивости и геномных областей, что ограничивает клиническую ценность анализов. Полное геномное секвенирование (WGS) может предоставить почти полную информацию о возбудителе, но затраты и проблемы интерпретации данных в настоящее время не позволяют широко его использовать в клинической практике [10].

ВОЗ одобрила использование новых экономически эффективных и быстрых методов определения лекарственной чувствительности для выявления больных с МЛУ-ТБ, среди них, нитратредуктазный метод (НРМ) [11]. В РФ нитратредуктазный метод (более известный как метод Грисса) известен давно [12] и рекомендован к использованию Методическими рекомендациями по совершенствованию диагностики и лечения туберкулёза органов дыхания[1], утвержденными приказом Минздрава Российской Федерации № 951 от 29 декабря 2014 г.

Принцип метода заключается в способности микобактерий туберкулёза восстанавливать нитраты в нитриты, что применяется при биохимической идентификации видов микобактерий. Присутствие нитратов легко выявляется специфическим реагентом (реактивом Грисса), взаимодействие которых даёт цветную реакцию. НРМ для определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* представляет вариант метода абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена, содержащей нитраты калия или натрия, но позволяющий получать результаты через 8-12 дней после посева культуры.

Показано хорошее совпадение результатов определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* НРМ в сравнении с традиционными методами и отмечено, что НРМ является недорогим, довольно быстрым и легко выполнимым методом определения лекарственной чувствительности [13-15].

В ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск) разработана технология промышленного изготовления ряда препаратов, основанных на НРМ, для определения чувствительности микобактерий туберкулёза к препаратам 1 и 2 ряда, включая пиразинамид: ТБ тест-набор, PZA-тест и XDR-тест. Все препараты зарегистрированы как медицинские изделия и выпускаются промышленными сериями.

ТБ тест-набор предназначен для ускоренного определения лекарственной чувствительности и первичной идентификации *M. tuberculosis* (регистрационное удостоверение № 2007/03366). Определение лекарственной чувствительности с его помощью основано на обнаружении ингибирующего действия противотуберкулёзных препаратов первого ряда с помощью НРМ. ТБ тест-набор представляет собой комплект из восьми готовых к применению яичных питательных сред во флаконах, каждая из которых содержит один из препаратов в критических концентрациях – изониазид (1 мкг/мл), рифампицин (40 мкг/мл), стрептомицин (10 мкг/мл), этамбутол (2 мкг/мл), натрия салицилат (1000 мкг/мл), тиофенкарбоксигидразид (ТКГ, 2 мкг/мл), два контрольных флакона со средой, не содержащей препараты. В состав набора входит реактив Грисса для учёта результатов, шприцы для посева и внесения реактива Грисса. ТБ тест-набор дополнительно укомплектован цветной шкалой для учёта результатов.

Цель исследования – сравнить результаты лекарственной чувствительности *M. tuberculosis,* полученные с использованием ТБ тест-набора, метода абсолютных концентраций и автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 в нескольких бактериологических лабораториях противотуберкулёзных учреждений**.**

Материал и методы. *Биоэтические требования.* Материалы, использованные в работе, не содержат персональных данных пациентов, т. к. полученные от них клинические изоляты промаркированы без указания фамилии, даты рождения, адреса проживания, номера истории болезни, личных документов и других именных материалов. В соответствии с требованиями биоэтического комитета Российской Федерации, каждый пациент при поступлении в клинику заключал договор с лечебным учреждением, содержащий согласие на проведение лечения и лабораторного обследования.

Штаммы. В испытаниях исследованы свежевыделенные штаммы из клинических образцов (мокрота, промывные воды бронхов, моча), полученных от впервые выявленных и ранее лечившихся больных с различными формами туберкулёза в учреждениях, в которых проходили испытания.

Дизайн исследования. Испытания проводили в трёх бактериологических лабораториях противотуберку-

[1] Приказ Минздрава РФ от 29.12. 2014 г. № 951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулёза органов дыхания».

лёзных учреждений (Новосибирском научно-исследовательском институте туберкулёза (лаборатория № 1), Тульском областном противотуберкулёзном диспансере (лаборатория № 2), Московском городском научно-практическом центре борьбы с туберкулёзом (Лаборатория № 3) в равнозначных условиях при одновременном анализе штаммов с использованием ТБ тест-набора и метода абсолютных концентраций. В одной из лабораторий лекарственную чувствительность изолятов определяли параллельно с использованием ТБ тест-набора, метода абсолютных концентраций и автоматического анализатора BACTEC MGIT 960.

В 1-й лаборатории проанализировано 198 изолятов, во 2-й – 211, в 3-ей – 220 изолятов *M. tuberculosis.* В ходе испытаний определена их чувствительность к изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу.

Методика определения лекарственной чувствительности M. tuberculosis. Бактериальные суспензии для проведения испытаний готовили суспендированием изолятов в 0,3 мл 0,2%-ного стерильного раствора твина-80 в 10-мл пробирках на Vortex со стеклянными бусами диаметром 1 мм. Мутность суспензий доводили до 5 ЕД по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-86 П, содержащем примерно 5×10^8 микробных клеток в 1 мл, и затем разводили 1:10 стерильным 0,9%-ным раствором натрия хлорида.

При определении лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* с использованием ТБ тест-набора по 0,2 мл суспензии каждого изолята *M. tuberculosis* инокулировали в каждый флакон ТБ тест-набора с помощью шприца путём прокалывания резиновой пробки или с помощью пипетки. Перед посевом пипеткой все флаконы ТБ тест-набора, содержащие питательные среды, вскрывали, удаляя алюминиевые колпачки, и заменяли резиновые пробки на стерильные конические медицинские пробки. Засеянные флаконы укладывали в наклонном положении в упаковочную коробку, которую затем помещали в термостат при температуре (36±1)° С. Через 8 сут инкубации добавляли 0,5 мл 7,5%-ного раствора реактива Грисса, приготовленный из сухого реактива, в один из двух контрольных флаконов. В случае появления в нём интенсивной розовой или красной окраски (не менее 3+ по цветовой шкале) вносили по 0,5 мл 7,5%-ного раствора реактива Грисса во все оставшиеся флаконы и проводили визуальный учёт результатов по появлению окраски. Если в контрольном флаконе окраска меньше чем 3+, этот флакон уничтожали, остальные продолжали инкубировать до 10-12 сут, затем вносили раствор реактива Грисса в оставшиеся флаконы и проводили учёт результатов по наличию окраски.

Культура считалась чувствительной к конкретному противотуберкулёзному препарату, если во флаконе с лекарственным препаратом не наблюдалось появления окраски (при интенсивной окраске в контрольном флаконе). Культура считалась устойчивой при появлении окраски (от 1+ до 5+) во флаконе с противотуберкулёзным препаратом. Положительным контролем окраски при анализе *M. tuberculosis* служил флакон с ТКГ, в котором происходило появление красной или розовой окраски; отрицательным контролем – флакон с салицилатом натрия, в котором красная или розовая окраска не появлялась. Схема проведения анализа лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* с использованием ТБ тест-набора представлена на рисунке.

Определение лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* методом абсолютных концентраций проводили на среде Левенштейна-Йенсена, содержащей противотуберкулёзные препараты, которую готовили в каждой лаборатории самостоятельно в соответствии с требованиями Приложения № 11 к Приказу Минздрава РФ от 21.03.03 № 109[2].

Анализ результатов. При анализе результатов оценивали диагностические характеристики ТБ тест-набора: чувствительность (способность определять истинную лекарственную устойчивость), специфичность (способность определять истинную лекарственную чувствительность), эффективность (доля правильных результатов к общему числу результатов) [16]. Диагностические характеристики определены в каждой лаборатории для каждого из четырёх противотуберкулёзных препаратов отдельно.

Анализ несовпадающих результатов проводили с использованием метода пропорций – «золотого стандарта» в определении лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* [17] – на среде Миддлебрука 7H10 (BD Difco, Кат. № 262710) с добавкой OADC (BD BBL, Кат. № 211886) и глицерина (ГОСТ 6824-96). В лаборатории № 2 лекарственную чувствительность изолятов с несовпадающими результатами повторно тестировали с использованием новых серий ТБ тест-набора и среды Левенштейна-Йенсена с противотуберкулёзными препаратами. Устойчивость культур с несовпадающими результатами к изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу подтверждали наличием мутаций в генах *katG; rpoB*; *rpsL и 16SrRNA; embB,* соответственно, методом ПЦР-секвенирования [18].

Результаты. *Характеристика культур*. Использованные для сравнительных испытаний 629 изолятов *M. tuberculosis* имели различный спектр лекарственной устойчивости. 32,4% (*n*=204) из них являлись чувствительными. Устойчивость к изониазиду обнаружена у 54,4% (*n*=342), рифампицину у 40,9% (*n*=257), стрептомицину у 54,2% (*n*=341), этамбутолу у 26,3% (*n*=167) изолятов.

Сравнение результатов определения лекарственной чувствительности. В результате проведённого исследования получен высокий процент совпадения результатов. В первой лаборатории при тестировании 198 изолятов *M. tuberculosis* обнаружено, что спектр чувствительности к четырём противотуберкулёзным препаратам, определённый с использованием ТБ тест-набора и методом абсолютных концентраций совпадал для 182 изолятов, т. е. в 91,9% случаев. Для изониазида результаты совпадали в 98,5% (*n*=195) случаев, для рифампицина – в 98,0% (*n*=194), для стрептомицина – в 97,4% (*n*=193), для этамбутола – в 94,9% случаев (*n*=188). Диагностические характеристики ТБ тест-набора, полученные в ходе испытаний в данной лаборатории, приведены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, в лаборатории № 1 чувствительность ТБ тест-набора составила 97,5% для изониазида, 94,9% для рифампицина, 96,9% для стрептомицина, 94,9% для этамбутола; специфичность для изониазида и рифампицина – 100%, для стрептомицина – 98,6% и для этамбутола – 95,1%.

Время, затраченное на определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* с помощью ТБ тест-набора в данной лаборатории, составило 9,89 сут (диапазон 8-13), методом абсолютных концентраций – 21 сут (табл. 2).

[2]Приказ МЗ РФ от 21.03.03 № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации».

В ходе тестирования выявлено 16 изолятов с несовпадающими результатами хотя бы к одному из четырёх противотуберкулёзных препаратов. При дальнейшем субкультивировании на среде Левенштейна-Йенсена 5 изолятов оказались контаминированы. Поэтому анализ несовпадающих результатов выполнен методом пропорций для 11 изолятов (всего *n*=16 тестов). Результаты анализа, полученные методом пропорций и ПЦР-секвенирования, представлены в табл. 3.

Результаты определения лекарственной чувствительности методом пропорций для четырёх изолятов *M.tuberculosis* (76, 228, 272, 440) совпали с первоначальными результатами, полученными на ТБ тест-наборе, для остальных изолятов *M. tuberculosis* – с результатами, полученными методом абсолютных концентраций (табл.2). Результаты определения устойчивости к изониазиду, рифампицину, стрептомицину дополнительно подтверждены наличием мутаций в генах *katG, rpoB, rpsL* и *16SrRNA,* соответственно. У изолятов, устойчивых к этамбутолу, равно как и у чувствительных изолятов к данному препарату, выявлены мутации в кодоне 306 *embB* гена. Мутации в указанном кодоне встречаются с равной вероятностью у устойчивых и у чувствительных к этамбутолу штаммов, и не могут быть маркёром устойчивости к этамбутолу [19]. Окончательный вывод о лекарственной чувствительности изолятов с несовпадающими результатами сделан на основании данных метода пропорций.

С учётом полученных данных при анализе несовпадающих результатов заново определена точность определения лекарственной чувствительности с помощью ТБ тест-набора в сравнении с методом абсолютных концентраций (табл. 4). Для изониазида и стрептомицина результаты не изменилась. Для рифампицина значение чувствительности возросло с 94,9% до 97,4%, эффективности – с 98,4% до 99,0%. Значение специфичности не изменилось и сохранилась на уровне 100%. Для этамбутола значения всех параметров возросли; так, значение чувствительности увеличилось до 97,5%, специфичности – до 96,6%, эффективности – 97,0%.

При проведении испытаний в лаборатории № 2 посев 211 анализируемых культур во флаконы ТБ тест-набора осуществляли с помощью пипетки. При данном технике посева в процессе инкубации иногда выскакивали пробки из флаконов, нарушалась герметичность, что вело к подсыханию среды или контаминации посевов.

В процессе испытаний выполнено 844 тестов по определению чувствительности каждого изолята к четырём противотуберкулёзным препаратам. Полное совпадение результатов получено в 772 (91,5%) тестах. Диагностические характеристики ТБ тест-набора представлены в табл. 1.

Время получения результатов лекарственной чувствительности тестированных изолятов во второй лаборатории составило в среднем 9,25 сут (диапазон 8-13), метод абсолютных концентраций обеспечивал получение результатов в среднем через 23,0 сут (см.табл. 2).

Из 211 культур результаты лекарственной чувствительности, полученные с использованием ТБ тест-набора и метода абсолютных концентраций, не совпадали для 50 изолятов. Все 50 изолятов повторно тестированы с использованием новых серий ТБ тест-набора и среды Левенштейна-Йенсена с противотуберкулёзными препаратами. Результаты повторного тестирования лекарственной чувствительности данных изолятов представлены в табл. 5.

Два изолята контаминированы при переконтроле, и их лекарственная чувствительность не уточнена. Для 29 изолятов спектр лекарственной чувствительности совпал с первоначальным, полученным на ТБ тест-наборе, для 16 изолятов – с первоначальными данными, полученными методом абсолютных концентраций. Для трёх изолятов *M. tuberculosis* (№ 1711, 3273, 4516) новые данные, полученные с использованием ТБ тест-набора и метода абсолютных концентраций, не совпали между собой, но повторили первоначальные результаты каждого метода. Расхождения результатов для данных изолятов связаны с устойчивостью к стрептомицину. У указанных изолятов определяли наличие мутаций в ге-

Таблица 1

Диагностические характеристики ТБ тест-набора в сравнении с методом абсолютных концентраций и BACTEC MGIT 960

Лаборатория	Чувствительность, %	Специфичность, %	Эффективность, %
Изониазид			
Лаборатория № 1	97,5	100	98,5
Лаборатория № 2	93,9	85,0	89,1
Лаборатория № 3	99,3	97,6	98,6
BACTEC MGIT 960	97,9	100	98,6
Рифампицин			
Лаборатория № 1	94,9	100	98,0
Лаборатория № 2	92,9	98,4	96,2
Лаборатория № 3	96,9	96,7	97,3
BACTEC MGIT 960	96,9	98,4	97,7
Стрептомицин			
Лаборатория № 1	96,9	98,6	97,4
Лаборатория № 2	87,6	97,2	91,5
Лаборатория № 3	96,8	96,8	97,4
BACTEC MGIT 960	97,7	98,9	98,2
Этамбутол			
Лаборатория № 1	94,9	95,1	94,9
Лаборатория № 2	73,4	95,9	89,1
Лаборатория № 3	97,9	88,1	90,5
BACTEC MGIT 960	98,4	95,0	95,9

Таблица 2

Время (в сутках) получения результатов лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* в ходе испытаний

Лаборатория	ТБ тест-набор		Метод абсолютных концентраций		BACTEC MGIT 960	
	Среднее значение	Диапазон	Среднее значение	Диапазон	Среднее значение	Диапазон
Лаборатория № 1	9,89	8-13	21,0	20-23	-	-
Лаборатория № 2	9,25	8-13	23,0	21-28	-	-
Лаборатория № 3	9,9	8-15	21,6	21-28	7,2	5-12

Таблица 3

Результаты анализа несовпадающих результатов в лаборатории 1

ПТП	Штамм *M. tuberculosis*	Первоначальные результаты		Анализ несовпадающих результатов		Статус изолята после анализа несовпадающих результатов
		ТБ тест-набор	МАК	Метод пропорций	ПЦР-секвенирование	
Изониазид	177	S*	R**	R	*katG* - 315 AGC	R
	275	S	R	R	*katG* –315 AGC	R
Рифампицин	76	S	R	S	*rpoB* - WT***	S
	272	S	R	S	*rpoB* - WT	S
	178	S	R	R	*rpoB* - 531 TCG	R
Стрептомицин	223	R	S	S	*rpsL* -WT, *16SrRNA* - WT	S
	116	S	R	R	*rpsL* -WT, *16SrRNA* - 516 C	R
	178	S	R	R	*rpsL* - 43 AAG, *16SrRNA* – WT	R
	275	S	R	R	*rpsL* -WT, *16SrRNA* - WT	R
Этамбутол	114	S	R	R	*embB* - 306ATG	R
	177	S	R	S	*embB* - WT	S
	178	S	R	R	*embB* – 306 ATG	R
	223	R	S	R	*embB* - 306 ATG	R
	228	R	S	R	*embB* - WT	R
	440	S	R	S	*embB* - WT	S
	441	R	S	S	*embB* - WT	S

Примечание. ПТП – противотуберкулёзный препарат; S* – чувствительный; R** – устойчивый; WT*** – дикий тип.

Таблица 4

Точность определения лекарственной чувствительности с помощью ТБ тест-набора после анализа несовпадающих результатов

Лаборатория	Чувствительность, %	Специфичность, %	Эффективность, %
Изониазид			
Лаборатория № 1	97,5	100	98,5
Лаборатория № 2	98,3	99,0	98,6
Лаборатория № 3	99,8	98,8	99,5
Рифампицин			
Лаборатория № 1	97,4	100	99,0
Лаборатория № 2	97,7	100	99,1
Лаборатория № 3	98,0	100	100
Стрептомицин			
Лаборатория № 1	96,9	98,6	97,4
Лаборатория № 2	95,1	100	97,3
Лаборатория № 3	97,6	100	98,0
Этамбутол			
Лаборатория № 1	97,5	96,6	97,0
Лаборатория № 2	96,8	100	99,1
Лаборатория № 3	98,6	100	99,5

нах *16SrRNA* и *rpsL*, ответственных за устойчивость к стрептомицину. ПЦР-секвенирование не выявило мутаций ни в гене *16S rRNA,* ни в гене *rpsL*. Учитывая полученные данные и ошибки при проведении внешнего контроля качества в данной лаборатории, связанные с ложной устойчивостью к стрептомицину, решено считать все три штамма чувствительными к стрептомицину, что подтверждает результаты, полученные с использованием ТБ тест-набора.

После анализа несовпадающих результатов, снова определена точность определения лекарственной чувствительности с помощью ТБ тест-набора в сравнении с методом абсолютных концентраций (см. табл. 4). После проведения анализа несовпадающих результатов все сравнительные оценочные параметры изменились. Чувствительность ТБ тест-набора увеличилась для изониазида – с 92 до 98,3%; для рифампицина – с 91,9 до 97,7%; для стрептомицина – с 86,2 до 95,1%; для этамбутола – с 71,2 до 96,8%. Значения специфичности возросли для изониазида - с 85,8 до 99,0%; для рифампицина – с 98,5 до 100%; для стрептомицина – с 96,9 до 100%; для этамбутола – с 96,8 до 100%.

В лаборатории № 3 в испытаниях использованы 220 изолятов *M. tuberculosis*. Чувствительность ТБ тест-набора для изониазида составила 99,3%, для рифампицина – 96,9%, для стрептомицина – 96,8%, для этамбутола – 97,3%. Специфичность ТБ тест-набора составила для изониазида – 97,6%, для рифампицина – 97,6%, для стрептомицина – 96,8%, для этамбутола – 81,7%. Эффективность составила для изониазида – 98,6%, для рифампицина – 97,3%, для стрептомицина – 97,4%, для этамбутола – 84,5% (см. табл. 1).

Время получения результатов лекарственной чувствительности тестированных изолятов в лаборатории № 3 составило в среднем 9,9 сут (диапазон 8-15), в то время как метод абсолютных концентраций обеспечивал получение результатов в среднем через 21,6 сут (см.табл. 2).

При анализе результатов обнаружен 41 изолят с несовпадающими результатами. Из них, для изониазида (H) всего 3 изолята имели несовпадающие результаты: два изолята определены как H-устойчивые при исследовании с помощью ТБ тест-набора, но как H-чувствительные методом абсолютных концентраций. Один изолят дифференцирован как H-чувствительный на ТБ тест-наборе, а метод абсолютных концентраций классифицировал его как H-устойчивый. По рифампицину (R) результаты различались для 6 изолятов: ТБ тест-набор выявил три изолята как R-чувствительные, а МАК – как R-устойчивые. Три изолята определены с помощью ТБ

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130

Таблица 5

Результаты анализа несовпадающих результатов лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* в лаборатории № 2

Изолят *M. tuberculosis*	Результат на ТБ тест-наборе		Результат, полученный методом абсолютных концентраций		Окончательный статус изолятов
	Первичный	Повторное тестирование	Первичный	Повторное тестирование	
672	HSE	HSE	Чувств.	HSE	HSE
708	HRSE	HRSE	RSE	HRSE	HRSE
802	S	HS	HS	HS	HS
1416	HRSE	HRSE	RSE	HRSE	HRSE
1505	И	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
1816	HRS	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
1824	HRS	HRS	RS	HRS	HRS
1917	HRS	HRS	HRSE	HRS	HRS
1950	HSE	HSE	HRSE	HSE	HSE
2108	HRS	HRS	HRSE	HRS	HRS
2152	Чувств.	Чувств.	S	Чувств.	Чувств.
2167	H	Контаминация	R	Контаминация	Нет данных
2290	HRE	Контаминация	HRSE	Контаминация	Нет данных
2333	H	H	HRS	H	H
2402	Чувств.	Чувств.	S	Чувств.	Чувств.
2557	HRS	HRS	RS	HRS	HRS
2566	HRSE	HRSE	RS	HRSE	HRSE
2645	HRSE	HRSE	RSE	HRSE	HRSE
4718	Чувств.	HSE	HSE	HSE	HSE
6341	Чувств.	HSE	HSE	HSE	HSE
1078	HRE	HRE	Чувств.	HRE	HRE
1088	Чувств.	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
1284	RSE	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
1602	HR	HR	HRS	HR	HR
1711	Чувств.	Чувств.	S	S	*Не определен*
1728	HSE	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
3072	S	S	SE	SE	S
3173	HRS	HRS	HRSE	HRS	HRS
3253	Чувств.	HSE	HSE	HSE	HSE
3260	HRSE	HRSE	HRS	HRSE	HRSE
3273	Чувств.	Чувств.	S	S	*Не определен*
3329	HSE	HSE	S	HSE	HSE
3415	S	Чувств.	Чувств.	Чувств.	Чувств.
3458	HRE	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
3497	RSE	RS	RS	RS	RS
3651	HRS	HRS	HRSE	HRS	HRS
3715	HRS	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
3721	HRS	HRS	HRSE	HRS	HRS
3786	HS	HS	HSE	HS	HS
3846	HRSE	HRSE	RSE	HRSE	HRSE
3873	HRS	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
3879	HRS	HRSE	HRSE	HRSE	HRSE
4126	H	H	Чувств.	H	H
4179	HRS	HRS	RS	HRS	HRS
4429	Чувств.	Чувств.	S	Чувств.	Чувств.
4509	H	H	Чувств.	H	H
4516	HR	HR	HRS	HRS	*Не определен*
4519	H	H	Чувств.	H	H
4524	HRE	HRE	RE	HRE	HRE
4777	HRS	HRS	HRSE	HRS	HRS

Примечание. H – устойчивость к изониазиду, R – рифампицину, S – стрептомицину, E – этамбутолу. Чувств. – чувствительный изолят.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130

тест-набора как R-устойчивые, а методом абсолютных концентраций как R-чувствительные. По стрептомицину (S) различались результаты для 7 изолятов: четыре изолята были S-чувствительными на ТБ тест-наборе, а S-устойчивыми при анализе методом абсолютных концентраций. Три изолята были S-устойчивыми на ТБ тест-наборе, а S-чувствительными при анализе методом абсолютных концентраций. По этамбутолу (E) результаты различались для 21 изолята: Из них только один изолят определён как E-чувствительный на ТБ тест-наборе и как E-устойчивый при тестировании методом абсолютных концентраций. Оставшиеся 20 изолятов тестированы как E-устойчивые с помощью ТБ тест-набора и как E-чувствительные с помощью метода абсолютных концентраций (табл. 6).

Все изоляты с несовпадающими результатами субкультивированы на среде Левенштейна-Йенсена. В процессе субкультивирования 2 изолята (8500 и 17036) оказались контаминированы. Остальные изоляты в процессе проведения анализа несовпадающих результатов методом пропорций на агаре Миддлебрука 7Н10 и методом ПЦР-секвенирования показали следующие результаты. Для изолятов с несовпадениями по изониазиду: изолят № 1901 определён как устойчивый методом пропорций, что совпадало с первоначальным результатом на ТБ тест-наборе. Изолят № 32292 показал результаты, совпадающие с методом абсолютных концентраций, т. е. при тестировании методом пропорций выявлена устойчивость к изониазиду. При ПЦР-секвенировании *katG* генов обоих изолятов обнаружены мутации в 315 кодоне.

При тестировании методом пропорций четырёх изолятов с несовпадающими результатами по рифампицину получены результаты, совпадающие с первоначальными результатами на ТБ тест-наборе: № 30228, 1901, 3803 R-устойчивые, изолят № 3967 – R-чувствительный. Два изолята № 30232 и 32292 дали результаты, совпадающие с первоначальными результатами, полученными методом абсолютных концентраций: они определены как R-устойчивые. Полученные результаты подтверждены данными ПЦР-секвенирования. R-устойчивые изоляты № 30228, 30232, 1901, 3803 и 32292 имели мутации в *rpoB* гене. Изолят № 3967 не имел мутаций в гене *rpoB* и определён как R-чувствительный при анализе методом пропорций.

Анализ изолятов с несовпадающими результатами по стрептомицину дал следующие результаты: данные для изолятов № 22337, 1901, 7908, 377 совпали с первоначальными результатами, полученными на ТБ тест-наборе. Результаты ЛЧ изолятов № 4744 и 32292 совпали с первоначальными, полученными методом абсолютных концентраций. При ПЦР-секвенировании S-устойчивых изолятов № 22337, 4744, 377 и 32292 определены мутации 43 AGG в гене *rpsL*. В S-устойчивом изоляте № 1901 и в изоляте № 7908 не выявлены мутации, ответственные за устойчивость к стрептомицину.

При проведении испытаний наибольшее количество расхождений (n=21) наблюдали при определении чувствительности к этамбутолу. 20 изолятов устойчивы к этамбутолу при анализе с помощью ТБ тест-набора и чувствительны к этамбутолу при тестировании методом абсолютных концентраций. Фенотипическое определение чувствительности к этамбутолу является несовершенным, особенно для изолятов с мутациями в гене *embB*, что ведёт к невысокому проценту совпадения результатов при сравнительных испытаниях [20, 21]. При анализе изолятов методом пропорций 20 изолятов подтвердили первоначальные данные ТБ тест-набора; для изолята № 26738 (n=1) получены данные, совпадающие с первоначальными результатами метода абсолютных концентраций. ПЦР-секвенирование обнаружило мутации у 12 изолятов № 360, 364, 365, 368, 377, 1752, 2318, 3677, 4023, 4733, 4744, 29795 в гене *embB* в положении 406. Мутации в данном положении встреча-

Таблица 6

Несовпадающие результаты определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* в лаборатории № 3

ПТП (число несовпадений)	Штамм *M. tuberculosis*	ТБ тест-набор	Метод абсолютных концентраций	Метод пропорций	ПЦР секвенирование
Изониазид (n=3)	17036	R	S	Контаминация	Не анализировали
	1901	R	S	R	*katG* 315 AGC
	32292	S	R	R	*katG* 315 ACC
Рифампицин (n=6)	1901	R	S	R	*rpoB* 531TTG
	3803	R	S	R	*rpoB* 531 TTG
	30228	R	S	R	*rpoB* 531 TCG
	3967	S	R	S	*rpoB* – нет мутаций
	30232	S	R	R	*rpoB* 516 GTC
	32292	S	R	R	*rpoB*- нет мутаций
Стрептомицин (n=7)	22337	R	S	R	*rpsL* - 43 AGG
	1901	R	S	R	*rpsL* – нет мутаций
	7908	S	R	S	*rpsL* – нет мутаций
	377	R	S	R	*rpsL* - 43 AGG
	4744	S	R	R	*rpsL* - 43 AGG
	32292	S	R	R	*rpsL* – 43 AGG
	8500	S	R	Контаминация	Не анализировали
Этамбутол (n=34)	26738 (n=1)	S	R	R	*embB* - Нет мутаций
	360, 364, 365, 368, 377, 1752, 2318, 3677, 4023, 4733, 4744, 29795 (n=12)	Все R (n=20)	Все S (n=20)	R (n=12)	*emb* 406 GGC (n=12)
	1767, 2213, 2237, 3145, 3803, 4530, 22337, 26877, (n=8)			R (n=8)	*embB* 306 ATG (n=8)

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-122-130

ются только у культур, устойчивых к этамбутолу. У 8 изолятов № 1767, 2213, 2237, 3145, 3803, 4530, 22337, 26877 мутации выявлены в 306 кодоне. Данный тип мутаций встречается у устойчивых и чувствительных к этамбутолу штаммов *M. tuberculosis* [19].

Окончательный статус изолятов принят по данным метода пропорций. Точность определения лекарственной чувствительности изолятов *M. tuberculosis* с помощью ТБ тест-набора в лаборатории № 3 после анализа несовпадающих результатов изменилась: чувствительность ТБ тест-набора увеличилась для изониазида – с 99,3 до 99,8%; для рифампицина – с 96,9 до 98%; для стрептомицина – с 96,8 до 97,6%; для этамбутола – с 97,9 до 98,6%. Значения специфичности возросли для изониазида - с 97,6 до 98,8%; для рифампицина – с 97,6 до 100%; для стрептомицина – с 96,8 до 100%; для этамбутола – с 88,1 до 100%. Эффективность достигла 99,5% для изониазида, 99,1% для рифампицина, 98,0% для стрептомицина, 99,5% для этамбутола.

Сравнение ТБ тест-набора и BACTEC 960 MGIT. В лаборатории № 3 результаты определения лекарственной чувствительности 220 изолятов *M. tuberculosis*, полученные с использованием ТБ тест-набора, сравнивали с результатами BACTEC MGIT 960. Чувствительность ТБ тест-набора для изониазида составила 97,9%, для рифампицина – 96,9%, для стрептомицина – 97,7%, для этамбутола – 98,4%. Специфичность ТБ тест-набора составила для изониазида – 100%, для рифампицина – 98,4%, для стрептомицина – 98,9%, для этамбутола – 95,1%. Эффективность – для изониазида –98,6%, для рифампицина – 97,7%, для стрептомицина – 98,2%, для этамбутола – 95,9% (см. табл. 1).

Время получения результатов лекарственной чувствительности тестированных изолятов составило на ТБ тест-наборе в среднем 9,9 сут (диапазон 8-15). BACTEC MGIT 960 давал результаты через 7,2 сут (диапазон 5-12 сут) (см.табл. 2).

Обсуждение. Испытания разработанного в ФБУН ГНЦ ПМБ ТБ тест-набора в сравнении с методом абсолютных концентраций и автоматизированной системой BACTEC MGIT 960 продемонстрировали высокую степень совпадений полученных результатов тестирования чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулёзным препаратам 1 ряда: изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу. Показатели эффективности ТБ тест-набора (чувствительность, специфичность, эффективность) относительно метода абсолютных концентраций в лабораториях № 1 и № 3 выше, чем в лаборатории № 2, возможно, из-за альтернативной техники посева. При сравнении ТБ тест-набора и BACTEC MGIT 960 оценочные показатели превышали 95%. Результаты, полученные с коммерческим ТБ тест-набором, не уступают результатам нитратредуктазного метода, испытанного в нескольких международных лабораториях при определении чувствительности *M. tuberculosis* [22].

После проведения анализа несовпадающих результатов практически все показатели во всех трёх лабораториях превышали 95%, что соответствует требованиям ВОЗ, предъявляемым к новым анализам *M. tuberculosis* (чувствительность должна быть не менее 90% и специфичность – 95%) [23].

Время получения результатов с ТБ тест-набором короче, чем с использованием метода абсолютных концентраций и соизмеримо со временем получения результатов с BACTEC MGIT 960. ТБ тест-набор прост в использовании, не требует дорогостоящего оборудования и специальной подготовки персонала.

Благодарности. *Авторы выражают искреннюю признательность Чередниченко А.В., Левачевой В.А., Дорожковой И.Р. за помощь в проведении исследований.*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов*.

Финансирование. *Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.*

ЛИТЕРАТУРА (1, 3, 5, 7-11, 13-23 см. REFERENCES)

2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2019. 254 с. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf.
4. Иртуганова О.А., Смирнова Н.С., Мороз А.М., Литвинов В.И. Ускоренная культуральная диагностика туберкулеза с использованием автоматизированных систем BACTEC MGIT 960 и MB/BacT. *Проблемы туберкулёза*. 2002; 1: 58-62.
6. Беспятых Ю.А., Шитиков Е.А., Зименков Д.В., Кулагина Е.В., Грядунов Д.А., Носова Е.Ю. и др. Определение лекарственной устойчивости и генотипирование клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* при помощи экспериментального набора «ТБ-ТЕСТ». *Пульмонология*. 2013; 4: 77-81.
12. Голышевская В.И., Смирнова Н.С., Иртуганова О.А., Домотенко Л.В. Сравнение нитратредуктазного и автоматизированного BACTEC MGIT 960 AST методов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёза. *Проблемы туберкулёза и болезней лёгких*. 2003; 8: 34-7.

REFERENCES

1. Global tuberculosis report 2019. World Health Organisation. 2019. 283 p. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1&ua=1.
2. On the state of the sanitary-epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018: State report. Moscow: Rospotrebnadzor; 2019. 254 (in Russian)
3. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf. (in Russian)
4. Canetti G., Fox W., Khomenko A., Mahler H. T., Menon N. K., Mitchison D. A. et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programs. *Bull. WHO*. 1969; 41: 21-43.
5. Irtuganova O.A., Smirnova N.S., Moroz A.M., Litvinov V.I. Accelerated culture diagnosis of tuberculosis using the automated systems BACTEC MGIT 960 and MB/BacT. *Problemy tuberkuleza*. 2002; 1: 58-62. (in Russian)
6. Grace Lin S.-Y. G., Desmond E., Bonato D., Gross W., Siddiqi S. Multicenter Evaluation of BACTEC MGIT 960 System for Second-Line Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis Complex. *J. Clin. Microbiol*. 2009; 47 (11): 3630-4.
7. Bespyatykh Yu.A., Shitikov E.A., Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Gryadunov D.A., Nosova E.Yu. et al. Determination of drug resistance and genotyping of clinical strains of Mycobacterium tuberculosis with the experimental set of «TB-TEST». *Pul'monologiya*. 2013; 4: 77-81. (in Russian)
8. Lawn S.D., Mwaba P., Bates M., Piatek A., Alexander H., Marais B.J. et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet Infect. Dis*. 2013; 13 (4): 349-61.
9. Iram S., Zeenat A., Hussain S., Yusuf N.W., Aslam M. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay - Report from a developing country. *Pak. J. Med. Sci.* 2015; 31(1): 105-10.

10. Fradejas I., Ontañón B., Muñoz-Gallego I., Ramírez-Vela M.J., López-Roa P. The value of Xpert MTB/RIF-generated CT values for predicting the smear status of patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*. 2018; 13 (12): 9-12.
11. Miotto P, Tessema B, Tagliani E, et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2017; 50: 1701354.
12. World Health Organization. Noncommercial culture and drug susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrugresistant tuberculosis. 2011. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44601/9789241501620_eng.pdf?sequence=1.
13. Golyshevskaya V.I., Smirnova N.S., Irtuganova O.A., Domotenko L.V. Comparison of nitrate reductase assay and BACTEC MGIT 960 AST for the drug susceptibility testing of M. tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh*. 2003; 8: 34-7. (in Russian)
14. Angeby K. A., Klintz L., Hoffner S. E. Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis with a Nitrate Reductase Assay. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40 (2): 553-5.
15. Affolabi D., Odoun M., Martin A., Palomino J.C., Anagonou S., Portaels F. Evaluation of Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Rifampin Resistance by Nitrate Reductase Assay Applied to Sputum Samples in Cotonou, Benin. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45: 2123-5.
16. Kohli A., Bashir G., Fatima, A., Jan A., Wani N., & Ahmad J. Rapid drug-susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates to first-line antitubercular drugs by nitrate reductase assay: A comparison with proportion method. *International Journal of Mycobacteriology.* 2016; 5(4): 469-74.
17. Toman K. Sensitivity, specificity and predictive value of diagnostic tests. *Bull. Int. Union Tuberc.* 1981; 56: 18-28.
18. Kent P., Kubica G. Public Health Mycobacteriology. A Guide for the level III Laboratory.US DHHS: Center for Diseases Control, Atlanta; 1985.
19. Sanger F. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977; 74: 5463-5.
20. Macrousov I., Otten T., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. Detection of *embB 306* Mutations in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: Implications for Genotypic Resistance Testing. *J. Clin. Microbiol*. 2002; 40; 3810-3.
21. Walker T.M., Kohl T.A., Omar S.V., et al. Whole-genome sequencing for prediction of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis*. 2015; 15: 1193-1202.
22. Schön T., Miotto P., Köser C.U., Viveiros M., Böttger E., Cambau E.. Mycobacterium tuberculosis drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clin. Microbiol. Infect*. 2017; 23: 154-60.
23. Horne D. J., Pinto L. M., Arentz M., Lin S.-Y. G., Desmond E., Flores L. L. et al. Diagnostic Accuracy and Reproducibility of WHO-Endorsed Phenotypic Drug Susceptibility Testing Methods for First-Line and Second-Line Antituberculosis Drugs. *J. Clin. Microbiol*. 2013; 51: p. 393-401.
24. High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting. Geneva: World Health Organization; 2014. Available at: http://www.who.int/tb/publications/tpp_report/en/).

Поступила 26.12.19
Принята к печати 04.01.20

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-131-136

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Титов С.Е.[1,2,3], Анищенко В.В.[4], Полоз Т.Л.[5], Веряскина Ю.А.[1], Архипова А.А.[6], Устинов С.Н.[4]

ВОЗМОЖНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЖЕЛУДКА И ПРЕДРАКОВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ЖЕЛУДКА С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ ШЕСТИ МИКРОРНК

[1]ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, Россия;
[2]АО «Вектор-Бест», 630559, р. п. Кольцово, Россия;
[3]Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, Россия;
[4]АО Медицинский центр Авиценна, группы компаний Мать и Дитя, 630007 Новосибирск, Россия;
[5]ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Новосибирск», 630003 Новосибирск, Россия;
[6]ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №2», 630051 Новосибирск, Россия

Недостаток специфических симптомов для раннего выявления рака желудка приводит к тому, что его часто диагностируют на поздней стадии, когда прогноз является неблагоприятным. Анализ молекулярных маркеров в дополнение к стандартным диагностическим процедурам является перспективным подходом для совершенствования дооперационной диагностики как рака желудка, так и предраковых изменений слизистой. Поэтому целью нашего исследования был анализ диагностической значимости использования экспрессии микроРНК для выявления рака желудка и предраковых состояний (дисплазии) в гистологическом материале.
В работе было использовано 122 образца архивного гистологического материала в виде парафиновых блоков: 34 образца аденокарциномы желудка, 54 образца язв желудка с дисплазией и 34 образца нормальной слизистой желудка, полученных у пациентов после выполнения бариатрических операций. Уровень экспрессии микроРНК-145-5p, -150-5p, -20a-5p, -21-5p, -31-5p, -34a-5p, -375 определялся с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Стратификацию образцов на разные группы проводили с помощью алгоритма построения дерева принятия решений C-RT. В дерево решений, которое позволяет стратифицировать образцы на норму, дисплазию и рак желудка, вошли все миРНК, кроме миРНК-20а, причем норму от рака желудка можно отличить только по миРНК-34а, -21, -375. Диагностические характеристики для выявления дисплазии: специфичность – 97%, чувствительность – 87%; для выявления рака желудка: специфичность – 91%, чувствительность – 93%. Достаточно высокие значения диагностических характеристик для выявления дисплазии слизистой желудка и рака желудка, полученные в нашем исследовании, указывают на возможность использования данных об экспрессии небольшого количества микроРНК для эффективного разделения образцов с опухолевыми и предраковыми изменениями ткани желудка.

Ключевые слова: *рак желудка; дисплазия; миРНК; молекулярная диагностика.*

Для цитирования: *Титов С.Е., Анищенко В.В., Полоз Т.Л., Веряскина Ю.А., Архипова А.А., Устинов С.Н. Возможности дифференциальной диагностики рака желудка и предраковых изменений слизистой желудка с помощью анализа экспрессии шести микроРНК. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 131-136.*
DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-131-136

Titov S.E.[1,2,3], Anishchenko V.V.[4], Poloz T.L.[5], Veryaskina Yu.A.[1], Arkhipova A.A.[6], Ustinov S.N.[4]

DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF GASTRIC CANCER AND PRECANCEROUS CHANGES OF THE GASTRIC MUCOSA USING ANALYSIS OF EXPRESSION OF SIX MICRORNAS

[1]Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia;
[2]AO Vector-Best, Kol'tsovo, Russia;
[3]Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
[4]AO Medical Centre Avicenna, group of companies "Mother and Child", Novosibirsk, Russia;
[5]Private Institution of health "Road clinical hospital of Russian Railways Medicine, Novosibirsk", Novosibirsk, Russia;
[6]State Public Health Service of the Novosibirsk Region "City Clinical Hospital №2", Novosibirsk, Russia

The lack of specific symptoms for the early detection of gastric cancer leads to the fact that it is often diagnosed at a late stage, when the prognosis is unfavorable. The analysis of molecular markers in addition to standard diagnostic procedures is a promising approach for improving the preoperative diagnosis of both gastric cancer and precancerous changes in the mucosa. Therefore, the aim of our study was to analyze the diagnostic significance of using miRNA expression to diagnosis gastric cancer and precancerous conditions (dysplasia) in histological material. In this work, 122 samples of archival histological material in the form of paraffin blocks were used: 34 samples of gastric adenocarcinoma, 54 samples of gastric ulcers with dysplasia and 34 samples of normal gastric mucosa obtained from patients after bariatric surgery. The expression level of miRNA-145-5p, -150-5p, -20a-5p, -21-5p, -31-5p, -34a-5p, -375 was determined using real-time RT-PCR. Samples were stratified into different groups using the C-RT decision tree algorithm. All miRNAs, except miRNA-20a, were included in the decision tree, which allows stratification of samples for normal mucosa, dysplasia, and gastric cancer. Normal mucosa can be distinguished from gastric cancer only by miRNA-34a, -21, -375. Diagnostic characteristics for the detection of dysplasia: specificity - 97%, sensitivity - 87%; for the detection of gastric cancer: specificity - 91%, sensitivity - 93%.

Для корреспонденции: *Титов Сергей Евгеньевич*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. генетики ИМКБ СО РАН; e-mail: titovse78@gmail.com

The sufficiently high values of the diagnostic characteristics for detecting dysplasia of the gastric mucosa and gastric cancer obtained in our study indicate the possibility of using expression data of a small amount of miRNAs for the effective separation of samples with tumor and precancerous changes in the stomach tissue.

Key words: *gastric cancer; dysplasia; miRNA; molecular diagnostics.*

For citation: *Titov S.E., Anishchenko V.V., Poloz T.L., Veryaskina Yu.A., Arkhipova A.A., Ustinov S.N. Differential diagnostics of gastric cancer and precancerous changes of the gastric mucosa using analysis of expression of six microRNAS. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (2): 131-136. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-131-136*

For correspondence: *Titov S.E.,* PhD, senior researcher of the Laboratory of Molecular Genetics, IMCB SB RAS, e-mail: titovse78@gmail.com

Information about authors:

Titov S.E. https://orcid.org/0000-0001-9401-5737
Anishchenko V.V. https://orcid.org/0000-0003-1178-5205
Poloz T.L. https://orcid.org/0000-0003-4006-7560
Veryaskina J.A. https://orcid.org/0000-0002-3799-9407
Arkhipova A.A. https://orcid.org/0000-0001-5653-2960
Ustinov S.N. https://orcid.org/0000-0003-0734-8870

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 17.12.2019
Accepted 20.12.2019

Введение. Уровень заболеваемости раком желудка (РЖ) снизился за последние 50 лет, но при этом, РЖ, занимая четвертое место, остается одной из наиболее распространенных злокачественных эпителиальных опухолей в мире. Более 70% новых случаев диагностики РЖ и случаев смерти от этого заболевания происходит в развивающихся странах, при этом половина мировой смертности от РЖ приходится на Восточную Азию (в основном в Китае) [1].

Основным методом диагностики рака желудка является морфологическое исследование материала биопсии, полученного при гастроскопии. Современные эпидемиологические данные подтверждают патогенетическую модель рака желудка, включающую предраковые состояния – промежуточные стадии, к которым относят хронический гастрит и кишечную метаплазию. Из-за отсутствия специфических симптомов раннего выявления, РЖ часто диагностируют на поздней стадии, когда прогноз является неблагоприятным, так как излечение невозможно. Медиана выживаемости составляет 7-9 мес, а выживаемость через 2 года крайне редко составляет более 10%. При условии выполнения программы ранней диагностики и совершенствовании хирургических методов возможно увеличить выживаемость пациентов с РЖ [2-4]. Поскольку прогноз для пациентов различается в зависимости от стадии заболевания на момент постановки диагноза, раннее выявление РЖ имеет решающее значение. Совместное использование опухолевых маркеров, таких как α-фетопротеин, карциноэмбриональный антиген и углеводные антигены 125 и 19-9, улучшает чувствительность для диагностики распространенного рака желудка, но, в то же время, дают противоречивые результаты при использовании их для раннего выявления РЖ [5-9]. Поэтому выявление новых биомаркеров для диагностики РЖ на ранней стадии не теряет своей актуальности. В качестве таких маркеров могут выступать микроРНК (миРНК).

МиРНК относятся к классу малых (около 22 нуклеотидов) некодирующих РНК, которые принимают участие в регулировании экспрессии генов, играя важную роль в широком спектре физиологических и патологических процессов, таких как дифференцировка клеток, пролиферация и апоптоз [10-13]. Та же самая миРНК может действовать как опухолевый супрессор или как онкогенная миРНК из-за особенностей тканевой специфичности и, таким образом, может контролировать множество генов, участвующих в патогенезе злокачественных опухолей, в том числе РЖ. Например, p53-опосредованная активация миРНК-34a влияет на экспрессию генов, связанных с апоптозом [14]; а повышение уровня экспрессии миРНК-373, миРНК-520c и миРНК-10b способствуют инвазии опухоли и метастазированию [15] и т.д. Исследования последних лет показывают, что широкий спектр опухолей разных типов демонстрирует значительно отличающиеся профили экспрессии миРНК по сравнению с нормальными тканями. Поэтому в настоящее время миРНК используют для разработки различных диагностических тестов в качестве тканевых специфических биомаркеров с потенциалом для клинического определения происхождения опухоли, а также как предикторов метастазирования [16-18]. С практической точки зрения, диагностическая ценность миРНК связана с их способностью оставаться стабильными после инкубации при комнатной температуре до 24 час и выдерживать до восьми циклов замораживания-оттаивания.

Цель исследования: анализ диагностической ценности панели миРНК (-145, -150, -20a, -21, -31, -34a, -375) для выявления рака желудка и предраковых состояний (дисплазии) в гистологическом материале.

Материал и методы. *Клинический материал.* В работе было использовано 122 образца архивного гистологического материала в виде парафиновых блоков: 34 образца аденокарциномы желудка, 54 образца язв желудка с дисплазией и 34 образца нормальной слизистой желудка, полученных у пациентов после выполнения бариатрических операций. Гистологический материал был получен в соответствии с законодательством РФ, от каждого пациента было получено информированное согласие на его использование, все данные были деперсонализированы. Все диагнозы подтверждены гистологически в послеоперационном материале. До выполнения молекулярно-генетического исследования проведена независимая экспертная оценка гистологических образцов.

Выделение РНК. К 2-3 5 мкм срезам парафинового блока добавляли 1 мл белого парафинового масла (класс вязкости ISO VG 15), инкубировали в термошейкере при 65^{0}С 2 минуты. Центрифугировали при 13000 g в течение 2 минут. К осадку добавляли 700 мкл лизирующего гуанидинового буфера (4 М гуанидин изотиоцианат; 25 мМ цитрат натрия; 0,3% саркозил; 100 мМ Трис-HCl pH 6,5; 0,1% 2-меркаптоэтанол) и

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-131-136

оставляли в термошейкере при 90^0С на 60 мин. Центрифугировали при 13000 g в течение 2 мин, супернатант переносили в новые пробирки. Далее в пробирки добавляли 600 мкл изопропанола, перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Центрифугировали 10 мин при 13000 g, супернатант сливали, осадок промывали сначала 500 мкл 70% этанола, а затем 300 мкл ацетона. РНК растворяли в 200 мкл деионизованной воды.

Выбор набора молекулярных маркеров. Первичный отбор набора миРНК для анализа был осуществлен на основании доступной литературы. В итоге был сформирован список из 7 миРНК–маркеров злокачественности (миР-145-5p, -150-5p, -20a-5p, -21-5p, -31-5p, -34a-5p, -375), для которых в качестве референса использовалась малая ядерная РНК U6.

Синтетические аналоги миРНК. миРНК-олигонуклеотиды были синтезированы в ООО “Биосан” (Новосибирск, Россия). Синтетические миРНК хранили в замороженном виде в ТЕ-буфере при -20^0С, при использовании в качестве контролей их разводили на деионизованной воде и добавляли непосредственно в реакционную смесь для обратной транскрипции, минуя стадию выделения.

Олигонуклеотидные праймеры и зонды. Все олигонуклеотиды были синтезированы в АО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). Олигонуклеотиды выбирали с использованием онлайн-сервиса PrimerQuest (http://eu.idtdna.com/). Последовательности праймеров и зондов доступны по запросу. Для каждой миРНК подбирали несколько комплектов олигонуклеотидов, из которых выбирали те, которые характеризовались наиболее высокой эффективностью обратной транскрипции и ПЦР. Эффективность обратной транскрипции оценивали по значениям циклов квантификации (Cq), полученных при анализе синтетических аналогов миРНК, взятых в известной концентрации. Эффективность амплификации (Е) для каждой системы оценивали с помощью построения калибровочной кривой, построенной по разведениям РНК, выделенной клинических проб с высоким содержанием данной миРНК, на деионизованной воде. Значение Е для разных систем варьировало от 92,5% до 98,4%, с линейным диапазоном 10^8-10^2 копий миРНК в реакции, кроме миРНК-21 и -34а для которых линейный диапазон составил 10^8-10^3 копий миРНК.

Выявление микроРНК. Детекцию 7 миРНК и мяРНК U6 с помощью ОТ-ПЦР-РВ проводили для всех типов образцов. Для выявления зрелых миРНК использовали метод stem-loop ОТ-ПЦР [19]. Для каждой миРНК отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ как описано в [20]. Для каждого образца анализ проводили в одном повторе. Нормировку содержания миРНК проводили на содержание малой ядерной РНК U6 в образце с помощью метода $2^{-\Delta Cq}$ [21] с учетом эффективности реакций. Выявление мяРНК U6 проводилось по той же схеме stem-loop ОТ-ПЦР, которая использовалась для миРНК.

Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США). Сравнение двух независимых выборок по количественному признаку проводили при помощи критерия Манна-Уитни. Критический уровень значимости был принят равным 0,007 с учетом поправки Бонферрони. Стратификацию образцов на разные группы проводили методом построения дерева принятия решений C-RT (Classification and Regression Tree) [22].

Результаты. *Различия в экспрессии миРНК между нормами, дисплазиями и раком желудка.* С помощью ОТ-ПЦР-РВ мы определили экспрессию 7 классификаторных миРНК и малой РНК U6 в 122 гистологических образцах. Медианные значения циклов квантификации ПЦР (Cq), отражающие содержание всех маркеров в анализируемой выборке, а также вариация их значений представлены на рис. 1.

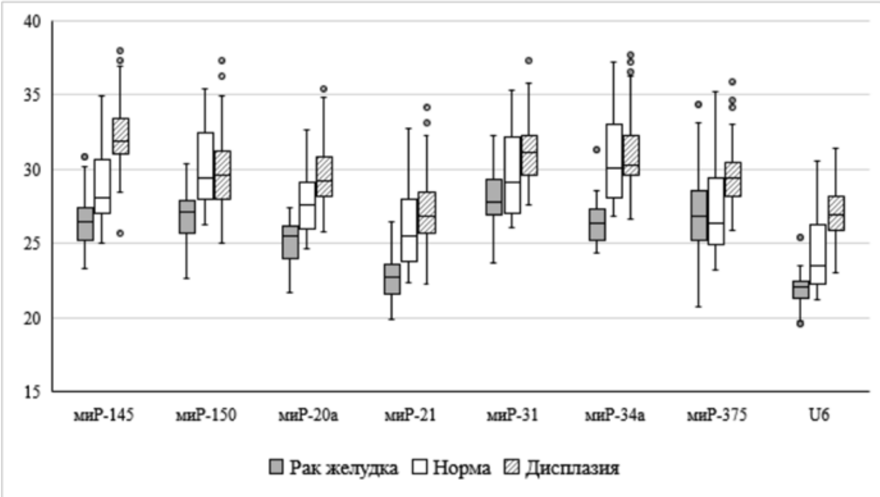

Рис. 1. Квантификационные циклы (Cq) для 7 классификаторных миРНК и малой РНК U6. Представлены: медианное значение, верхний и нижний квартили, диапазон без выбросов и выбросы, обозначенные кружками.

Относительная экспрессия 7 миРНК в разных типах образцов представлена на рис. 2.

Видно, что в большей степени разница в экспрессии между нормой и РЖ характерна для миРНК-150, -21, -31, -34а, -375. В свою очередь, для образцов с дисплазией профиль экспрессии миРНК отличается и от нормы, и от РЖ. В табл. 1 приведены данные по статистической значимости видимых различий между экспрессией миРНК в образцах разных типов. Поскольку количество образцов было невелико, то, чтобы не делать предположений о том, распределению какого типа соответствуют наши выборки, мы воспользовались непараметрическим критерием Манна-Уитни.

Как видно из табл.1, в некоторых случаях достигается достаточно высокий уровень значимости, особенно при сравнении экспрессии миРНК-21, -34а в группах РЖ/норма; миРНК-150, -31 в группах РЖ/дисплазия и миРНК-150, -21, -31, -34а в группах дисплазия/норма. Подобные уровни значимости различий в экспрессии миРНК между разными группами указывают на возможность использования данных по экспрессии для эффективного разделения образцов по разным группам [23].

Использование данных об экспрессии миРНК для стратификации образцов на разные группы. Для деления образцов на разные группы использовался алгоритм построения дерева решений C-RT, который делит исходные данные на подмножества, которые становятся все более и более гомогенными относительно определенных признаков, в результате чего формируется древовидная иерархическая структура. На рис. 3 показано получившиеся дерево.

Таким образом, в дерево решений вошли все миРНК, кроме миРНК-20а, причем норму от РЖ можно отличить только по миРНК-34а, -21, -375. Данные о диагностических характеристиках определения РЖ и дисплазии с помощью этого дерева решений на выборке образцов, использованных в работе, представлены в табл. 2.

То, как результаты стратификации по данным экспрессии миРНК соотносятся с данными гистологического анализа образцов, представлено на рис. 4.

Из 34 образцов РЖ, молекулярный классификатор отнес 31 (91%) образец к РЖ, 2 (6%) к дисплазии и один (3%) к

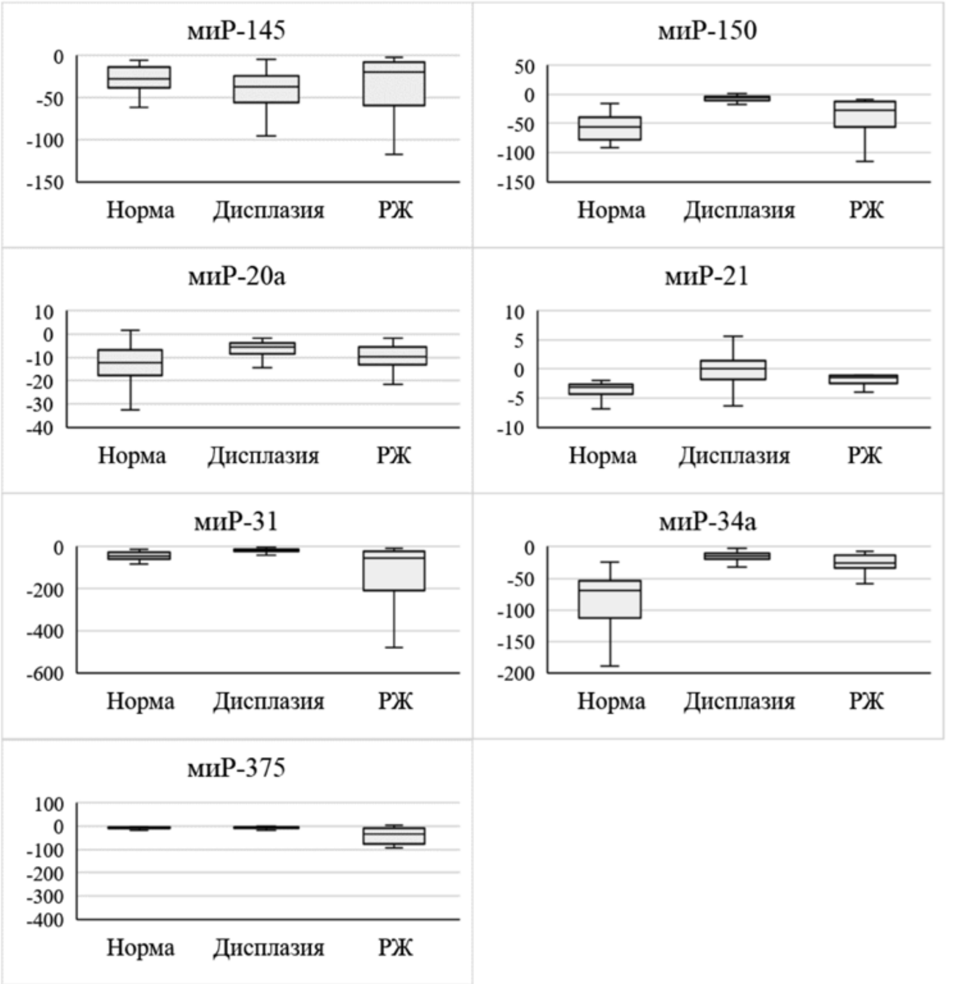

Рис. 2. Относительный уровень экспрессии 7 миРНК в разных типах образцов. Представлены: медиана, верхний и нижний квартили, диапазон без выбросов.

норме. Из 54 образцов с дисплазией правильно было классифицировано 47 (87%) образцов, в группу РЖ попало 4 (7%) образца, а в норму – 4 образца (6%). Из 34 образцов нормальной слизистой желудка в группу «норма» попало 32 (94%) образца, в группу «РЖ» – 2 (6%) образца.

Обсуждение. Одной из наиболее важных целей нашего исследования была оценка потенциальной диагностической значимости миРНК для выявления дисплазии и РЖ. Использование данных об экспрессии миРНК для выявления РЖ применяется уже достаточно давно, однако, как это часто бывает с исследованиями миРНК, результаты разных работ могут не только не совпадать, но и прямо противоречить друг другу. Кроме того, было бы интересно уметь выявлять с помощью профилирования миРНК не только РЖ, но и предраковые состояния, однако данному вопросу уделяется пока мало внимания.

Основная идея представленной работы – исследование возможности использовать небольшой набор миРНК, играющих роль в развитии РЖ, для выявления не только РЖ, но и дисплазии слизистой желудка. В работе были использованы миРНК-145, -150, -20a, -21, -31, -34a, -375.

В целом, полученные данные относительно экспрессии миРНК при раке желудка соответствуют тому, что уже опубликовано в научной литературе. Наибольшее количество данных накоплено относительно миРНК-21, поскольку во многих работах сообщалось, что уровень экспрессии миРНК-21 повышается в различных опухолях [17, 24,25]. При РЖ в большинстве работ тоже сообщалось о повышении уровня миРНК-21 [26-30], хотя в то же время есть работа, в которой описано снижение уровня миРНК-21 [31], правда в клеточных линиях. В нашей работе мы наблюдали повышение уровня миРНК-21 не только при РЖ, но и при дисплазии, относительно нормальных образцов.

Из остальных миРНК, рассмотренных в данной работе, статистически достоверно был повышен уровень экспрессии миРНК-150 и -34a, а понижен у миРНК-375 при РЖ относительно нормы. При дисплазии относительно нормы был повышен уровень экспрессии миРНК-150, -20a, -34a и -31, а уровень миРНК-145 понижен.

Изменение профилей экспрессии миРНК при развитии дисплазии на данный момент изучено слабо, поэтому по миРНК-150, -20a, -34a, -31 нет опубликованных данных. Для миРНК-145, как и в нашей работе, было описано снижение уровня экспрессии при дисплазии относительно нормы [32], в той же работе было также описано снижение уровня экспрессии миРНК-375, чего у нас не наблюдалось.

Что касается РЖ, то можно отметить, что повышение уровня экспрессии миРНК-150 по сравнению с нормой совпадает с литературными данными [29], причем в одной из работ снижение уровня миРНК-150 при РЖ связали со снижением выживаемости. Для миРНК-34a мы получили повышение ее количества при раке желудка, что расходится с представлениями о ее роли при РЖ – повышенная экспрессия миРНК-34a может активировать каспазу-3 (один из элементов апоптоза), что замедляет формирование и рост опухоли [33]. С другой стороны, в другой работе было напрямую показано снижение количества миРНК-34a при РЖ [34], правда, из этой же работы следует, что количество миРНК может зависеть не только от развития онкологического процесса, но и от различных условий жизни и привычек человека.

Для миРНК-375, наоборот, полученные данные – снижение экспрессии при РЖ – полностью соответствуют публика-

Таблица 1

Уровень значимости при попарном сравнении экспрессии миРНК в разных типах образцов

миРНК	РЖ/Норма	РЖ/Дисплазия	Норма/Дисплазия
миРНК-145	0,658799	0,024481	0,020678
миРНК -150	0,001427	$2{,}39 \cdot 10^{-9}$	$1{,}6 \cdot 10^{-12}$
миРНК -20a	0,087065	**0,005350**	**0,000184**
миРНК -21	$1{,}62 \cdot 10^{-7}$	0,002382	$7{,}27 \cdot 10^{-9}$
миРНК -31	0,397360	**0,000001**	**$1{,}19 \cdot 10^{-10}$**
миРНК -34a	$4{,}69 \cdot 10^{-11}$	0,007694	**$1{,}89 \cdot 10^{-11}$**
миРНК -375	**0,001012**	**0,000007**	0,078223

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые (p<0,007) различия.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-131-136

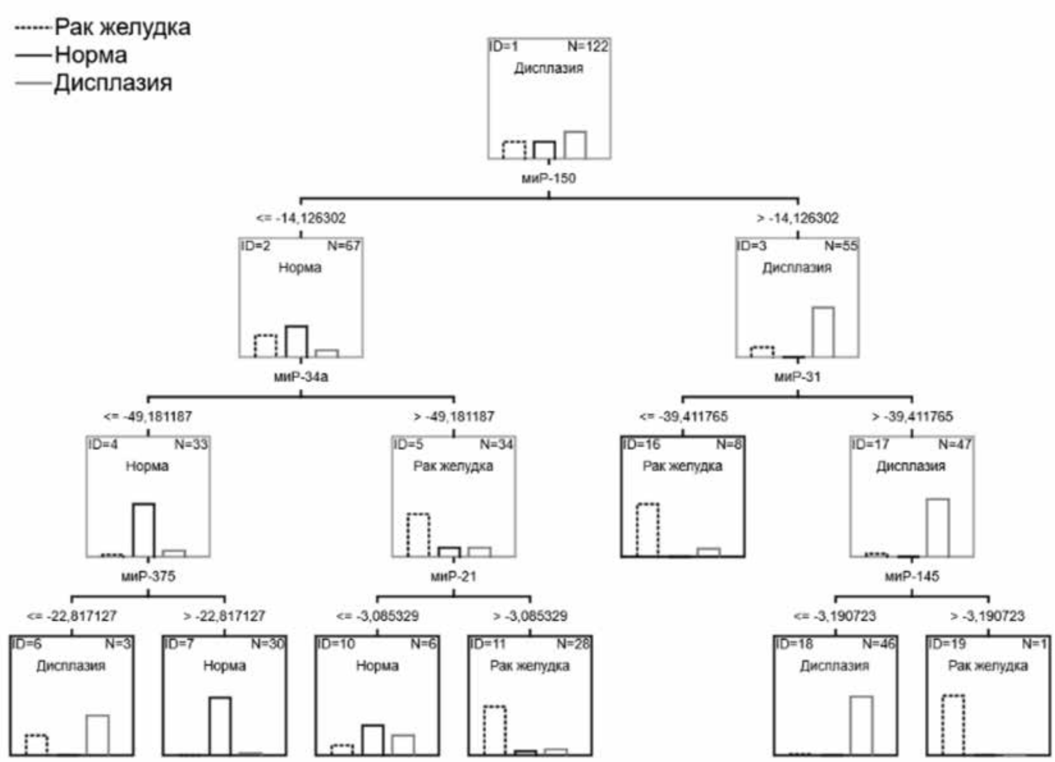

Рис. 3. Дерево решений для стратификации гистологических образцов на Норму/Дисплазию/РЖ на основании данных об экспрессии 6 миРНК.

циям, в которых описана ее противоопухолевая активность при раке желудка [32,35,36], а также при колоректальном, плоскоклеточном раке головы и шеи, и раке поджелудочной железы [37-39].

Таким образом, не все полученные нами данные по экспрессии миРНК полностью совпали с данными, опубликованными в литературе. Объяснить расхождения на данный момент не представляется возможным, поскольку они могут быть связаны как с методологическими особенностями представленной работы (системы для выявления миРНК, выбор нормализатора и т.д.), так и с особенностями формирования выборки. Однако, в любом случае для каждой из рассматриваемых групп – нормы, дисплазии и РЖ – удалось получить уникальные профили экспрессии миРНК, на основании которых эти группы можно дифференцировать между собой. В особенности представляет интерес различение нормы и дисплазии, поскольку это может позволить выявлять предраковые состояния и раки на ранних стадиях.

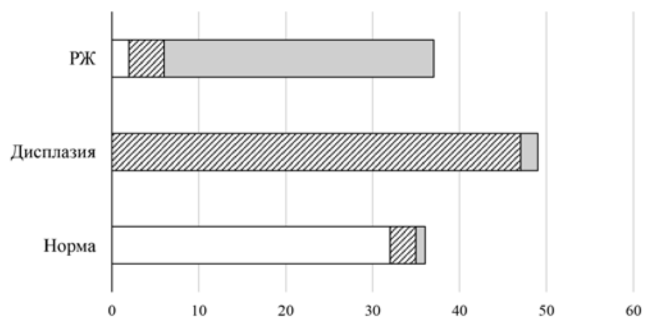

Рис. 4. Количество образцов, относящихся к разным группам согласно гистологическому заключению, но соответствующих одной и той же группе по данным экспрессии миРНК (указано слева).

Конечно, практическое применение профилирование миРНК для ранней диагностики рака желудка потребует дополнительных исследований, в частности, выборки образцов не только следует значительно расширить, но и брать их из разных медицинских учреждений (чтобы нивелировать особенности заливки парафиновых блоков, например). Также, возможно, следует расширить список миРНК, используемых в работе, что может позволить не только увеличить точность диагностики, но и давать прогнозы развития патологии.

Заключение. Являясь высокоспецифичными биомаркерами, со своим характерным профилем экспрессии для каждого вида ткани, включая опухолевую, миРНК могут стать перспективными диагностическими онкомаркерами для идентификации РЖ в клинике при исследовании биопсийного материала. Высокий уровень значимости различий в экс-

Таблица 2

Диагностические характеристики выявления РЖ и дисплазии на основании данных об экспрессии миРНК

Параметры	Рак желудка (95% ДИ), %	Дисплазия (95% ДИ), %
Специфичность	93 (86-97)	97 (90-99)
Чувствительность	91 (76-98)	87 (75-94)
Общая точность	93 (86-96)	93 (86-96)
ПЦПР	84 (70-92)	96 (85-99)
ПЦОР	96 (90-99)	90 (82-95)

Примечание. ПЦПР – предсказательная ценность положительного результата; ПЦОР – предсказательная ценность отрицательного результата; ДИ – доверительный интервал.

прессии миРНК-150, -20a, -34a, -31, -145 и -375, между сравниваемыми группами образцов РЖ, дисплазии и нормальной слизистой, полученный в нашем исследовании, указывает на возможность использования этих данных для эффективного разделения образцов с опухолевыми и предраковыми изменениями ткани желудка.

Для того чтобы использовать профиль экспрессии миРНК в качестве диагностических биомаркеров опухолей желудка, следует увеличить размер выборки и расширить список применяемых миРНК. Масштабное стандартизированное обследование значительных групп пациентов поможет определить диапазон, описывающий вариации экспрессии миРНК в опухолях желудка, как биомаркеров дифференциальной диагностики РЖ, а в перспективе также метастазирования, рецидива и прогноза опухоли.

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer*. 2010; 127:2893-2917.
2. Okines A., Verheij M., Allum W., Cunningham D., Cervantes A. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol*. 2010; 21 Suppl 5:v50-v54.
3. Songun I., Putter H., Kranenbarg E.M., Sasako M., van de Velde C.J. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. *Lancet Oncol*. 2010; 11:439-49.
4. Takahashi T., Saikawa Y., Kitagawa Y. Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment. *Cancers (Basel)*. 2013;5:48-63.
5. He C.Z., Zhang K.H., Li Q., Liu X.H., Hong Y., Lv N.H. Combined use of AFP, CEA, CA125 and CAl9-9 improves the sensitivity for the diagnosis of gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2013; 13: 87.
6. Sisik A., Kaya M., Bas G., Basak F., Alimoglu O. CEA and CA 19-9 are still valuable markers for the prognosis of colorectal and gastric cancer patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2013; 14: 4289-94.
7. Cervantes A., Roselló S., Roda D., Rodríguez-Braun E. The treatment of advanced gastric cancer: current strategies and future perspectives. *Ann. Oncol*. 2008; 19 Suppl. 5:v103-v107.
8. Nakane Y., Okamura S., Akehira K., Boku T., Okusa T., Tanaka K., Hioki K. Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric cancer patients. *Cancer*. 1994; 73: 2703-8.
9. Marrelli D., Pinto E., De Stefano A., Farnetani M., Garosi L., Roviello F. Clinical utility of CEA, CA 19-9, and CA 72-4 in the follow-up of patients with resectable gastric cancer. *Am. J. Surg*. 2001; 181:16-9.
10. Carrington J.C., Ambros V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. 2003; 301:336-8.
11. He L., Thomson J.M., Hemann M.T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S. et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005; 435:828-33.
12. Calin G.A., Croce C.M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer*. 2006; 6:857-66.
13. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116:281-97.
14. Chang T.C., Wentzel E.A., Kent O.A., Ramachandran K., Mullendore M., Lee K.H., Feldmann G., Yamakuchi M., Ferlito M., Lowenstein C.J. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell*. 2007; 26:745-52.
15. Huang Q., Gumireddy K., Schrier M., le Sage C., Nagel R., Nair S., Egan D.A., Li A., Huang G., Klein-Szanto A.J. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat. Cell Biol*. 2008; 10:202-10.
16. Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435:834-8.
17. Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103:2257-61.
18. Rosenfeld N., Aharonov R., Meiri E., Rosenwald S., Spector Y., Zepeniuk M. et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol*. 2008; 26:462-9.
19. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33: e179.
20. Titov S.E., Ivanov M.K., Karpinskaya E.V., Tsivlikova E.V., Shevchenko S.P., Veryaskina Y.A. et al. miRNA profiling, detection of BRAF V600E mutation and RET-PTC1 translocation in patients from Novosibirsk oblast (Russia) with different types of thyroid tumors. *BMC Cancer*. 2016; 16:201.
21. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. *Methods*. 2001;25:402-8.
22. Breiman L., Friedman J.H., Olshen R.A., Stone C.J. Classification and regression trees. Monterey, CA: Wadsworth & Brooks/Cole Advanced Books & Software; 1984.
23. Ivanov M.K., Titov S.E., Glushkov S.A., Dzyubenko V.V., Malek A.V., Arkhangelskaya P.A. et al. Detection of high-grade neoplasia in air-dried cervical PAP smears by a microRNA-based classifier. *Oncol. Rep*. 2018; 39(3):1099-1111.
24. Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob S.T., Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 2007; 133:647–58.
25. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005; 65:6029–33.
26. Zhang Z., Li Z., Gao C., Chen P., Chen J., Liu W. et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab. Invest*. 2008; 88(12):1358-66.
27. Chan S.H., Wu C.W., Li A.F., Chi C.W., Lin W.C. miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association. *Anticancer Res*. 2008(28): 907–11.
28. Motoyama K., Inoue H., Mimori K., Tanaka F., Kojima K., Uetake H. et al. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and microRNA-21 in human gastric cancer. *Int. J. Oncol*. 2010; 36:1089–95.
29. Pereira A.L., Magalhães L., Moreira F.C., Reis-das-Mercês L., Vidal A.F., Ribeiro-Dos-Santos A.M. et al. Epigenetic Field Cancerization in Gastric Cancer: microRNAs as Promising Biomarkers. *J. Cancer*. 2019; 10(6):1560-9.
30. Bloomston M., Frankel W.L., Petrocca F., Volinia S., Alder H., Hagan J.P. et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007; 297(17):1901-8.
31. Feng Y., Bai F., You Y., Bai F., Wu C., Xin R. et al. Dysregulated microRNA expression profiles in gastric cancer cells with high peritoneal metastatic potential. *Exp. Ther. Med*. 2018; 16(6): 4602–8.
32. Hwang J., Min B.H., Jang J., Kang S.Y., Bae H., Jang S.S. et al. MicroRNA Expression Profiles in Gastric Carcinogenesis. *Scientific Reports*. 2018; 8(1): 14393.
33. Ji Q., Hao X., Meng Y., Zhang M., Desano J., Fan D., Xu L. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer*. 2008; 8:266.
34. Stánitz E., Juhász K., Tóth C., Gombos K., Natali P.G., Ember I. Evaluation of MicroRNA expression pattern of gastric adenocarcinoma associated with socioeconomic, environmental and lifestyle factors in northwestern Hungary. *Anticancer Res*. 2013; 33(8):3195-200.
35. Ding L., Xu Y., Zhang W., Deng Y., Si M., Du Y. et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell research*. 2010; 20 (7):784–93.
36. Tsukamoto Y., Nakada C., Noguchi T., Tanigawa M., Nguyen L.T., Uchida T. et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Research*. 2010; 70 (6):2339–49.
37. El Ouaamari A., Baroukh N., Martens G.A., Lebrun P., Pipeleers D., and van Obberghen, E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucoseinduced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2008; 57 (10):2708–17.
38. Avissar M., Christensen B.C., Kelsey K.T., and Marsit C.J., MicroRNA Expression Ratio Is Predictive of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15 (8):2850–5.
39. Wei R., Yang Q., Han B., Li Y., Yao K., Yang X.et al. microRNA-375 inhibits colorectal cancer cells proliferation by downregulating JAK2/STAT3 and MAP3K8/ERK signaling pathways. *Oncotarget*. 2017; 8(10):16633-41.

Поступила 17.12.19

Принята к печати 20.12.19