

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 63

9 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

СЕНТЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

Е. М. Архипова

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 20.06.2018.
Подписано в печать 14.06.2018.
Формат 60 × 88¹/₈.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Усл. печ. л. 8,33.
Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, 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.

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ
СЕРВИС", 119049, г. Москва,
Калужская пл., д. 1, корп. 2

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-ef.ru

**Подписка на электронную версию:
elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.
2018. № 9. 521–592.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. Н. ТИТОВ

А. Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В. В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИХИНА, А. А. ИВАНОВ, С. А. ЛУГОВСКАЯ, А. Ю. МИРОНОВ (зам. главного редактора), В. Т. МОРОЗОВА, Л. М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л. М. СКУИНЬ, А. А. ТОТОЛЯН, И. П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 63
9 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

SEPTEMBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.V. Zyukina*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, 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.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

A. B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, A.Yu. MIRONOV (assistant editor-in-chief), V.T. MOROZOVA, L.M. PIMENOVA (executive editor), L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

БИОХИМИЯ

- Мухетдинова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютова Г.А., Валишин Д.А., Хасанова Г.М. Эффективность современных методов лабораторной диагностики в оценке различных форм геморрагической лихорадки с почечным синдромом, обусловленной серотипом Пуумала 524
- Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж. Система перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты слюны при раке легкого. 530
- Волкова А.Р., Дыгун О.Д., Катыешева Н.С., Бондаренко В.Л., Мальцева М.Н., Белякова Л.А., Эмануэль В.Л. Методические аспекты интерпретации референсных интервалов тиреотропного гормона гипофиза в многопрофильном стационаре мегаполиса Северо-Западного региона. 538
- Абакумова Т.В., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Антонева И.И., Полуднякова Л.В., Кузнецова Т.И., Дергунова Ю.А., Панченко Е.Г. Фактор роста эндотелия сосудов у больных распространенным раком яичников на фоне химиотерапии по схеме AP 543

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Мансурова Д.А., Жунуспекова А.С., Каражанова Л.К. Референсные значения агрегации тромбоцитов у здоровых лиц. 549
- Кузьменко Г.Н., Попова И.Г., Назаров С.Б., Клычева М.М., Ситникова О.Г., Харламова Н.В., Парейшвили В.В. Гемостатический потенциал пуповинной и венозной крови новорожденных по данным тромбозластографии. 553

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Ажержачева Н.И., Еришова М.Г., Поletaева Е.Д. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. 557
- Бынина М.П., Андриуков Б.Г., Матосова Е.В., Ляпун И.Н., Дробот Е.И. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических свойств среды Серова и основы селективного агара для выделения энтеропатогенных иерсиний. 564
- Царёв В.Н., Степанов А.Г., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С., Царёва Т.В. Контроль первичной адгезии микроорганизмов и формирования биоплёнок на стоматологических материалах, используемых для трансдентальной имплантации при зубосохраняющих операциях. 568
- Козлов А.В., Гусьякова О.А., Лямин А.В., Кецо Ю.Л., Халиулин А.В., Ерещенко А.А. Полирезистентная микрофлора в структуре микроорганизмов, выделенных из крови пациентов многопрофильного стационара. 574
- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Петрова О.А., Антонова Л.К., Погасян С.В., Ганина Е.Б., Миронов А.Ю. Микробиота желудочно-кишечного тракта новорожденных первого месяца жизни в Тверской области. 579
- Масягутова Л.М., Бакиров А.Б., Симонова Н.И., Гизатуллина Л.Г. Лабораторное обоснование этапности и объема профилактических мероприятий при работе в условиях микробного загрязнения воздуха рабочей зоны. 584

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А., Абдуллаев А.О., Судариков А.Б., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Шипулин Г.А. Аллель-специфическая полимеразная цепная реакция и электрофоретическая детекция в алгоритме выявления клинически значимых соматических мутаций в гене кальретикулина (CALR) 588

BIOCHEMISTRY

- Mukhetdinova G.A., Fazlyeva R.M., Mavzyutova G.A., Valishin D.A., Khasanova G.M. The efficiency of modern methods of laboratory diagnosis in the evaluation of various forms of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by the puumala hantavirus (puuv) 524
- Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Massard Zh. The system of lipid peroxidation and antioxidant protection of saliva in lung cancer 530
- Volkova A.R., Dygun O.D., Katysheva N.S., Bondarenko V.L., Maltseva M.N., Belyakova L.A., Emanuel V.L. Methodological aspects of interpretation of thyroid-stimulating hormone reference intervals in the northwest region megapolis hospital 538
- Abakumova T.V., Gening S.O., Dolgova D.R., Gening T.P., Antoneva I.I., Poludnyakova L.V., Kuznetsova T.I., Dergunova Yu.A., Panchenko E.G. The vascular endothelial growth factor in patients with advanced ovarian cancer on the background of chemotherapy according to the ap scheme 543

COAGULOGY

- Mansurova J.A., Zhunuspekova A.S., Karazhanova L.K. Reference values of platelet aggregometry in healthy subjects 549
- Kuzmenko G. N., Popova I. G., Nazarov S. B., Klycheva M. M., Sitnikova O. G., Kharlamova N.V., Pareyshvili V.V. Hemostatic potential of the umbilical cord and venous blood of newborns according to the thromboelastography 553

MICROBIOLOGY

- Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Azhermacheva N.I., Ershova M.G., Poletaeva E.D. Clinical trials of salmonella enrichment medium 557
- Bynina M.P., Andryukov B.G., Matosova E.V., Lyapun I.N., Drobot E. I. A comparative evaluation of differential and diagnostic properties of the Serov's agar medium and the base of selective agar for isolating enteropathogenic yersinia 564
- Tsarev V.N., Stepanov A.G., Ippolitov E.V., Podporin M.S., Tsareva T.V. Control of primary adhesion of microorganisms and formation of biofilms on stomatological materials used for transdental implantation in dental stabilizing operations 568
- Kozlov A.V., Gusyakova O.A., Lyamin A.V., Kezko J.L., Khaliulin A.V., Ereshchenko A.A. Polyresistent microflora in the structure of microorganisms divided from blood of patients of the general hospital 574
- Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Petrova O.A., Antonova L.K., Pogasyan S.V., Ganina E.B., Mironov A.Yu. Gastrointestinal microbiota of the newborns of the first month of life of the Tver' region 579
- Masyagutova L.M., Bakirov A.B., Simonova N.I., Gizatullina L.G. Laboratory confirmation of staging and volume of preventive measures at work under the conditions of microbial pollution of work environment air 584

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Olkhovskiy I.A., Abdullaev A.O., Sudarikov A.B., Dunaeva E.A., Mironov K.O., Shipulin G.A. Allele-specific polymerase chain reaction and electrophoretic detection in the detection algorithm clinically significant somatic mutations in the gene of calreticulin (CALR) 588

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.61-002.151-022:578.833.29]-074

Мухетдинова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютова Г.А., Валишин Д.А., Хасанова Г.М.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ В ОЦЕНКЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ СЕРОТИПОМ ПУУМАЛА

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, Уфа, Россия

Проведён анализ как традиционных, так и новых методов лабораторной диагностики для оценки степени тяжести и поражения органов-мишеней при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС). Показано, что тромбоцитопения соответствует тяжести заболевания и коррелирует с выраженностью почечной недостаточности. Уровень С-реактивного белка отражает активность воспалительного процесса и коррелирует с характерными лабораторными критериями заболевания. Содержание альвеомуцина в сыворотке крови больных более 45,0 Ед/мл указывает на поражение лёгких. ГЛПС на территории Республики Башкортостан обусловлена серотипом Пуумала; зависимости формы заболевания от содержания противовирусных антител не выявлено.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; тромбоцитопения; С-реактивный белок; альвеомуцин; противовирусные антитела.

Для цитирования: Мухетдинова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютова Г.А., Валишин Д.А., Хасанова Г.М. Эффективность современных методов лабораторной диагностики в оценке различных форм геморрагической лихорадки с почечным синдромом, обусловленной серотипом Пуумала. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 524-529. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-524-529>

Mukhetdinova G.A., Fazlyeva R.M., Mavzyutova G.A., Valishin D.A., Khasanova G.M.

THE EFFICIENCY OF MODERN METHODS OF LABORATORY DIAGNOSIS IN THE EVALUATION OF VARIOUS FORMS OF HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME CAUSED BY THE PUUMALA HANTAVIRUS (PUUV)

Bashkir State Medical University, 450008, Ufa, Russia

We've conducted the analysis of both traditional and new methods of laboratory diagnosis to estimate the severity and damage of target organs during Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS). It was shown that thrombocytopenia corresponds to the severity of the disease and correlates with the severity of renal failure. The level of C-reactive protein reflects the activity of the inflammatory process and correlates with the characteristic laboratory criteria of the disease. Blood serum levels of alveomucine in patients with HFRS more than 45.0 U/ml indicates lung damage. HFRS on the territory of the Bashkortostan Republic is caused by the serotype of Puumala hantavirus; dependence of the form of the disease on the content of antiviral antibodies is not revealed.

Key words: hemorrhagic Fever with Renal Syndrome; thrombocytopenia; C-reactive protein; alveomucine; antiviral antibodies.

For citation: Mukhetdinova G.A., Fazlyeva R.M., Mavzyutova G.A., Valishin D.A., Khasanova G.M. The efficiency of modern methods of laboratory diagnosis in the evaluation of various forms of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by the Puumala hantavirus (PUUV). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(9): 524-529 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-524-529>

For correspondence: Mukhetdinova G.A. doctor of medical sciences, professor, Professor of the Department of faculty therapy; e-mail: gmukhetdinova@yandex.ru

Information about authors:

Mukhetdinova G.A., <https://orcid.org/0000-0002-6685-8603>

Fazlyeva R.M., <https://orcid.org/0000-0002-0126-5110>

Mavzyutova G.A., <https://orcid.org/0000-0003-2098-1435>

Valishin D.A., <https://orcid.org/0000-0002-1811-9320>

Khasanova G.M., <https://orcid.org/0000-0001-7255-5302>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 25.05.2018
Accepted 13.06.2018

Для корреспонденции: Мухетдинова Гузель Ахметовна, д-р мед. наук, проф. каф. факультетской терапии; e-mail: gmukhetdinova@yandex.ru

Введение. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острая вирусная природно-очаговая инфекция, характеризующаяся генерализованным во-

влечением мелких сосудов, геморрагическим диатезом, гемодинамическими расстройствами и поражением почек по типу острого тубулоинтерстициального нефрита с развитием острой почечной недостаточности [1]. Заражение человека происходит преимущественно воздушно-пылевым путем (до 80%) при вдыхании высохших испражнений инфицированных грызунов. Ключевым моментом в патогенезе считают особенности иммунного ответа макроорганизма на вирусемию и активацию эндотелиальных клеток, что приводит к резкому повышению сосудистой проницаемости, синдрому диссеминированного внутрисосудистого свёртывания (ДВС-синдрому). Развитие реакций иммунного воспаления обуславливает центральные и микроциркуляторные гемодинамические нарушения, преимущественно выраженные в органах-мишенях (респираторный тракт, почки, мозг, печень) [2–4]. Полиморфизм и вариабельность симптоматики, отсутствие стандартизованных характеристик ведущих синдромов не позволяют с достоверной точностью установить первичный диагноз ГЛПС клинически. По степени тяжести заболевания выделяют несколько форм: лёгкую, среднетяжёлую и тяжёлую формы. В основу классификации по степени тяжести заболевания и критериев, её определяющих, заложены преимущественно клинические (гемодинамические, геморрагические, почечные) симптомы; единственным лабораторным критерием является показатель сывороточного креатинина [5]. Вместе с тем с развитием лабораторной диагностики актуальным является вопрос поиска лабораторных критериев для оценки тяжести состояния и поражения органов-мишеней при ГЛПС. Так, в ряде современных исследований показано, что гематурия [6] и гломерулярная протеинурия [7] являются предикторами острого повреждения почек, альвеомуцин – диагностическим маркёром поражения лёгких при ГЛПС [8, 9], а содержание НМGB1 [10] и TGF- β [11] коррелирует с тяжестью заболевания.

В литературе существует единое мнение о тромбоцитопении как патогномичном гематологическом симптоме у больных ГЛПС, генез которого – потребление тромбоцитов в развивающемся ДВС-синдроме. При этом тяжесть тромбоцитопении, по данным ряда авторов, не коррелирует с нарушением функции почек, но зависит от выраженности воспаления [12, 13]. Имеется и обратное мнение о тесной взаимосвязи между тромбоцитопенией и функцией почек [14].

В России для специфической диагностики ГЛПС широко используется реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ): для постановки диагноза учитывается 4-кратное и большее увеличение титра антител во второй пробе. Возможность применения иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления IgM-антител у больных ГЛПС была показана А. Lundkvist и соавт. (1991). Сравнительные исследования сывороток крови больных ГЛПС в ИФА с использованием различных рекомбинантных антигенов для выявления IgM-антител показали их высокую специфичность [2]. Примечательно, что на сегодняшний день нет убедительных данных о связи тяжести заболевания и титров противовирусных антител.

В этой связи целью нашего исследования явилось изучение лабораторных показателей и титров противовирусных антител для оценки тяжести состояния и поражения органов-мишеней при ГЛПС.

Материал и методы. Нами проведено проспективное динамическое клинико-функциональное обследова-

ние пациентов с диагнозом ГЛПС, находившихся на стационарном лечении в ГБУЗ РБ «Городская клиническая больница № 5» г. Уфы. Условия включения в основную группу: возраст пациентов от 18 до 65 лет, информированное согласие пациента на участие в исследовании. Условия исключения: наличие в анамнезе и по данным анализа медицинской документации ранее перенесенной ГЛПС, хронических заболеваний органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, почек и мочевыводящих путей.

Под нашим наблюдением находилось 220 больных ГЛПС. Преобладали мужчины – 180 (81,8%) пациентов, женщин было 40 (18,2%), что ещё раз подчеркивает гендерные различия при ГЛПС. В группу 1 включено 52 пациента с лёгкой формой ГЛПС: 39 (75%) мужчин и 13 (25%) женщин в возрасте от 18 до 53 лет, средний возраст $31,27 \pm 10,2$ года. В группу 2 включено 112 пациентов со среднетяжёлой формой ГЛПС: 94 (83,9%) мужчины и 18 (16,1%) женщин в возрасте от 18 до 65 лет, средний возраст $35,02 \pm 14,38$ года. Эта группа в зависимости от наличия клинико-рентгенологических признаков поражения лёгких была разделена на 2 подгруппы: в подгруппу 2а включено 60 больных ГЛПС без патологии лёгких, в подгруппу 2б включено 52 пациента с ГЛПС, имевших при поступлении клинико-рентгенологические признаки острой патологии лёгких. В группу 3 вошли 56 пациентов с тяжёлой формой ГЛПС: 47 (83,9%) мужчин и 9 (16,1%) женщин в возрасте от 18 до 60 лет, средний возраст $36,86 \pm 14,36$ года. Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, не имевших ГЛПС в анамнезе: 22 (73,3%) мужчины и 8 (26,7%) женщин в возрасте от 18 до 45 лет, средний возраст $31,96 \pm 10,8$ года.

Всем больным было проведено обследование, которое включало общеклинические методы, лабораторные методы – общий анализ крови на автоматическом анализаторе Cobas Micros, общий анализ мочи; биохимические исследования – определение в сыворотке крови общего белка, билирубина, креатинина, мочевины, глюкозы, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаргатамино-трансферазы (АСТ), электролитов (калий, натрий); УЗИ почек и органов брюшной полости.

Специфические IgM-антитела определяли методом ИФА. Для дифференциации антител по принадлежности к отдельным хантавирусам сыворотки обследуемых больных типировали с применением моновалентных культуральных антигенов вирусов Пуумала и Добрава. Данную часть исследования проводили в лаборатории геморрагических лихорадок ФГУП «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» в Центре Минздрава России по борьбе с ГЛПС, г. Москва. При сравнении средних геометрических титров (СГТ) специфических антител в сыворотке крови пользовались следующим приемом: логарифмировали числовые значения титров по основанию 2 и определяли средние арифметические (с соответствующей ошибкой средней) полученных логарифмов.

Определение альвеомуцина (АМ) и С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови проводилось методом ИФА с использованием реагентов фирмы «Хема-Медика» (Россия) в исследовательском центре «Лаборатория», г. Уфа.

Статистический анализ включал оценку нормальности распределения признака с использованием критерия Колмогорова – Смирнова, методы описательной статисти-

Таблица 1

Содержание тромбоцитов ($\cdot 10^9/\text{л}$) у больных ГЛПС

Форма заболевания	Начальный период	Олигурический период	Полиурический период	Контроль
Лёгкая	127,1 \pm 47,8 $p_k < 0,0001$	162,9 \pm 53,6 $p_k < 0,0001$	289,8 \pm 69,8	266,9 \pm 64,0
Среднетяжёлая	78,1 \pm 20,5 $p_k < 0,0001$ $p_1 < 0,0001$	138,5 \pm 46,8 $p_k < 0,0001$ $p_1 = 0,039$	309,0 \pm 89,9 $p_k = 0,038$	266,9 \pm 63,9
Тяжёлая	65,7 \pm 22,6 $p_k < 0,0001$ $p_1 < 0,0001$ $p_2 = 0,022$	77,2 \pm 41,4 $p_k < 0,0001$ $p_1 < 0,0001$ $p_2 < 0,0001$	270,3 \pm 95,4	266,9 \pm 63,9

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: p_k – статистически значимый показатель достоверности в сравнении с контрольной группой, p_1 – с группой пациентов с лёгкой формой ГЛПС, p_2 – с группой пациентов со среднетяжёлой формой ГЛПС.

стики, корреляционный анализ. При нормальном распределении признака результаты представлены в виде средней арифметической (M) и среднего квадратического (стандартного) отклонения (σ), использован параметрический t -критерий Стьюдента. При распределении признака, отличающегося от нормального, использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q_1 ; Q_3) и непараметрический критерий Манна – Уитни. Для анализа взаимосвязи двух признаков проводили корреляционный анализ по Спирмену. Межгрупповые различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$, статистически высокозначимыми – при $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение. В связи с существующей точкой зрения, что в очагах ГЛПС циркулируют, как правило, два и более серотипов хантавирусов, преобладанием хантавирусов серотипов Пуумала и Добрава/Белград на европейской территории Российской Федерации, было проведено серологическое исследование образцов сывороток больных ГЛПС. Во всех образцах сывороток больных ГЛПС были выявлены специфические антитела только к серотипу Пуумала. В группах обследованных больных титр специфических IgM-антител находился в пределах от 1:64 до 1:128000, причём во всех группах отмечались как низкие титры 1:128 (группа 1), 1:256 (группа 2), 1:128 (группа 3), так и максимально высокие 1:128000 титры антител. При математической обработке полученных данных статистически значимых различий между группами с учётом тяжести заболевания не выявлено: титр противовирусных антител при лёгкой форме заболевания составил $12,94 \pm 1,05 \log_2$, при среднетяжёлой форме – $14,20 \pm 0,59 \log_2$, при тяжёлой форме – $12,70 \pm 1,17 \log_2$.

При лёгкой форме заболевания изменения гемограммы были незначительными. Показатели красной крови (эритроциты и гемоглобин) варьировали в пределах от $3,2 \cdot 10^{12}/\text{л}$ и 105 г/л до $5,12 \cdot 10^{12}/\text{л}$ и 167 г/л соответственно, но средние значения не различались ни с контрольной группой, ни по периодам. Уровень лейкоцитов также варьировал: от лейкопении ($< 4 \cdot 10^9/\text{л}$) у единичных (3/7,9%) больных в начальном периоде до умеренного лейкоцитоза ($9\text{--}12,5 \cdot 10^9/\text{л}$) у 15,4% больных в олигурическом периоде, статистически значимые различия в сравнении с контрольными значениями отмечены в олигурическом и полиурическом периодах. Более выраженные изменения наблюдались со стороны лейкоцитарной формулы. Характерным являлся палочкоядерный сдвиг влево, уровень которого в начальном периоде (7,9 \pm

3,54%) статистически значимо ($p = 0,003$) отличался от контрольного значения ($3,6 \pm 1,47\%$). Значимыми были и различия в уровне моноцитов периферической крови: отмечено их повышение у больных в олигурическом ($7,22 \pm 1,99\%$; $p = 0,001$) и полиурическом ($6,31 \pm 2,52\%$; $p = 0,012$) периодах. Уровень СОЭ при лёгкой форме заболевания в начальном ($14,05 \pm 9,86$ мм/ч) и олигурическом ($14,38 \pm 6,95$ мм/ч) периодах незначительно превышал контрольный показатель ($9,64 \pm 3,68$ мм/ч), но средняя арифметическая находилась в пределах референсных значений.

Динамика тромбоцитов по периодам заболевания с учётом формы ГЛПС отражена в табл. 1. Тромбоцитопения умеренной степени в первые дни пребывания в стационаре отмечена у больных с лёгкой формой ГЛПС, данный показатель высокозначимо отличался не только от контрольного значения, но и от соответствующего показателя в олигурическом и полиурическом периодах. В олигурическом периоде уровень тромбоцитов несколько повысился, но был статистически значимо ниже и контрольного значения, и показателя полиурического периода. В полиурическом периоде уровень тромбоцитов даже несколько превысил контрольное значение, но различия незначимы. Корреляционный анализ не выявил зависимости между уровнем тромбоцитов и содержанием креатинина в сыворотке крови при лёгкой форме ГЛПС.

При лёгкой форме ГЛПС протеинурия в минимальных значениях (до 0,033 г/л) определялась у части больных (42,1%) уже в начальном периоде, в олигурическом периоде отмечена незначительная протеинурия у всех больных (от 0,033 до 0,99 г/л). В осадке мочи наблюдались микрогематурия (67,3%), единичные гиалиновые цилиндры. Восстановление функции почек при лёгкой форме происходит достаточно быстро. В полиурическом периоде при выписке из стационара ни у одного пациента протеинурия не определялась, но у 12 (23,1%) пациентов сохранялась гипостенурия. Нарушение функции почек в начальном периоде не столь характерно, как в последующем олигурическом периоде, что отражает статистически высокозначимое повышение показателей креатинина ($150,7 \pm 14,9$; $p_k < 0,001$) и мочевины ($8,22 \pm 0,89$; $p_k < 0,001$), которые в полиурическом периоде возвращаются к нормальным значениям.

При среднетяжёлой форме показатели красной крови (эритроциты и гемоглобин) в начальном периоде статистически значимо превышали как контрольное значение, так и аналогичный показатель при лёгкой форме заболевания. В олигурическом периоде при среднетяжёлой форме заболевания возрастал лейкоцитоз ($8,25 \pm 2,34 \cdot 10^9/\text{л}$; $p_k < 0,001$), достигая в ряде случаев $16,8 \cdot 10^9/\text{л}$; наблюдался лейкоцитарный сдвиг влево – увеличение палочкоядерных лейкоцитов в начальном периоде в ряде случаев до 35% (среднее значение $13,37 \pm 0,92\%$), что статистически значимо в сравнении как с контрольным показателем ($p_k < 0,001$), так и с аналогичным показателем при лёгкой форме заболевания ($p_1 = 0,027$); отмечено появление плазматических клеток и единичных миелоцитов. Содержание моноцитов в начальном и олигурическом периодах также превышало контрольное значение.

При среднетяжёлой форме содержание тромбоцитов в начальном периоде составило $78,1 \pm 20,5 \cdot 10^9/\text{л}$ ($p_k <$

Таблица 2

Показатели биохимического анализа крови у больных при среднетяжёлой форме ГЛПС ($M \pm \sigma$)

Показатель	Начальный период	Олигурический период	Полиурический период	Контроль
Креатинин, мкмоль/л	153,6 ± 27,3 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	231,5 ± 84,1 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	123,9 ± 18,6 $p_l < 0,001$	119,5 ± 19,4
Мочевина, ммоль/л	8,12 ± 2,17 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	11,88 ± 3,31 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	7,63 ± 1,73 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	5,33 ± 1,17
АЛТ, Ед/л	46,12 ± 17,90 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	67,01 ± 25,79 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	39,80 ± 14,15 $p_k = 0,014$ $p_l < 0,001$	32,89 ± 10,92
АСТ, Ед/л	55,54 ± 23,69 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	69,71 ± 24,65 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	34,43 ± 8,72 $p_l < 0,001$	31,12 ± 11,57

0,001), у 83% было менее $100 \cdot 10^9$ /л. В динамике в олигурическом периоде отмечено некоторое его повышение, но ниже контрольного значения; в полиурическом периоде содержание тромбоцитов было даже несколько выше контрольного значения. Важно подчеркнуть прогностическое значение тромбоцитопении: корреляционный анализ связи между уровнем тромбоцитов и содержанием креатинина выявил статистически значимую обратную связь между содержанием тромбоцитов в начальном периоде и уровнем креатинина в олигурическом периоде ($r = -0,526$; $p = 0,029$).

Протеинурия у больных среднетяжёлой формой ГЛПС при поступлении определялась в минимальных значениях $Me = 0,033$ (0,00; 0,165); существенно возрастала в олигурическом периоде $Me = 1,65$ (0,066; 6,60); у 8 (7,1%) пациентов в минимальных значениях сохранялась при выписке. В общем анализе мочи у пациентов со среднетяжёлой формой ГЛПС определялась микрогематурия (86,6%), гиалиновые и зернистые цилиндры, клетки Дунаевского.

Анализируя биохимические параметры крови, следует отметить закономерную динамику показателей, отражающих функцию почек (креатинин и мочевина), как по периодам заболевания, так и в сравнении с лёгкой формой ГЛПС. При выписке из стационара замедленная динамика нормализации креатинина наблюдалась

у 8 (7,1%) пациентов со среднетяжёлой формой ГЛПС. Обращает на себя внимание повышение трансаминаз АЛТ и АСТ в сыворотке крови, которое у пациентов с ГЛПС может быть обусловлено повреждением ткани печени (табл. 2).

При тяжёлой форме заболевания показатели красной крови (эритроциты и гемоглобин) претерпевают наибольшие изменения: в начальном периоде статистически значимо превышают как контрольное значение, так и аналогичный показатель при лёгкой форме заболевания. Это, вероятно, является следствием выраженной сосудистой проницаемости и сгущением крови. В олигурическом периоде в отличие от лёгкой и среднетяжёлой форм отмечено снижение этих показателей в сравнении с контрольным значением, обусловленное кровопотерей на фоне выраженного геморрагического синдрома.

В олигурическом периоде при тяжёлой форме заболевания наблюдается лейкоцитоз ($11,82 \pm 7,60 \cdot 10^9$ /л; $p_k < 0,001$), достигающий в ряде случаев $41,8 \cdot 10^9$ /л. Изменения в лейкоцитарной формуле, как и при среднетяжёлой форме, характеризовались увеличением палочкоядерных лейкоцитов в начальном периоде в ряде случаев до 35–42% (среднее значение $16,21 \pm 8,03\%$), что статистически значимо в сравнении как с контрольным показателем ($p_k < 0,001$), так и с аналогичным показателем при лёгкой форме заболевания ($p_l = 0,007$); наблюдалось появление плазматических клеток у 62,5%, миелоцитов – у 7,1% пациентов. Содержание моноцитов в начальном ($p = 0,037$) и олигурическом ($p = 0,027$) периодах также превышало контрольные значения.

При тяжёлой форме ГЛПС особую динамику изменений демонстрирует СОЭ: в начальном периоде данный показатель ($12,26 \pm 9,70$ мм/ч) ниже, чем при лёгкой ($14,05 \pm 9,86$ мм/ч) и среднетяжёлой ($15,16 \pm 8,37$ мм/ч) формах заболевания, и сопоставим со значением контрольной группы ($9,64 \pm 3,68$ мм/ч); в полиурическом периоде данный показатель превышает как контрольное значение ($p_k < 0,001$), так и показатель СОЭ у больных с лёгкой формой ($p_l < 0,001$).

Тромбоцитопения – патогномичный симптом ГЛПС. При тяжёлой форме заболевания она выражена в наибольшей степени и сохраняется более длительно в

олигурическом периоде: различия статистически значимы не только с контрольной группой, но и с группами больных ГЛПС лёгкой и среднетяжёлой формы. Тромбоцитопения, являясь характерным лабораторным симптомом ДВС-синдрома, тесно коррелирует с клиническими проявлениями и является одним из основных прогностических критериев у больных тяжёлой формой ГЛПС [14].

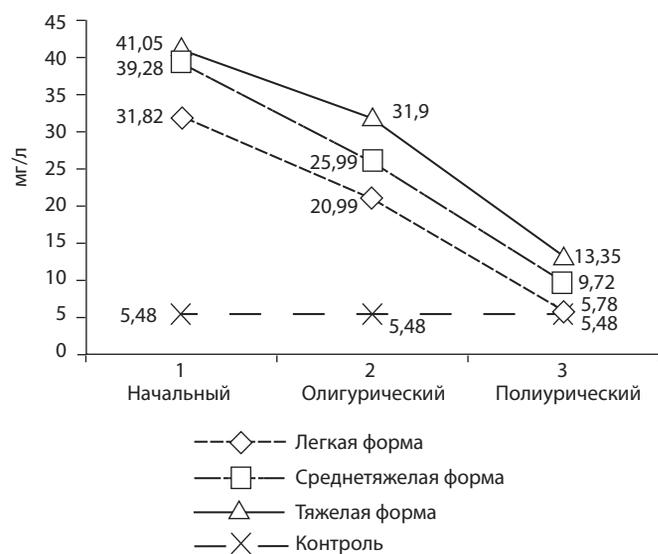
Биохимические показатели крови у пациентов с тяжёлой формой ГЛПС (табл. 3) свидетельствуют о выраженных нарушениях со стороны функции почек и печени, различия статистически высокозначимы не только с контрольной группой, но и с группами пациентов с лёгкой и среднетяжёлой формами заболевания.

При тяжёлой форме заболевания с наступлением олигурического периода отмечалось снижение диуреза до 80–250 мл/сут, повышение креатинина более 500 мкмоль/л у 16

Таблица 3

Показатели биохимического анализа крови у больных при тяжёлой форме ГЛПС ($M \pm \sigma$)

Показатель	Начальный период	Олигурический период	Полиурический период	Контроль
Креатинин, мкмоль/л	183,0 ± 44,9 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$ $p_2 < 0,001$	432,8 ± 157,9 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$ $p_2 < 0,001$	151,9 ± 28,1 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$ $p_2 < 0,001$	119,5 ± 19,4
Мочевина, ммоль/л	9,16 ± 1,99 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	17,86 ± 5,84 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$ $p_2 < 0,001$	9,10 ± 2,32 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$ $p_2 < 0,001$	5,33 ± 1,17
АЛТ, Ед/л	52,81 ± 25,32 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	80,58 ± 35,53 $p_k < 0,001$ $p_l = 0,001$	41,65 ± 15,18 $p_l < 0,001$	32,89 ± 10,92
АСТ, Ед/л	64,51 ± 27,29 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	85,87 ± 38,73 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$	46,36 ± 18,29 $p_k < 0,001$ $p_l < 0,001$ $p_2 < 0,001$	31,12 ± 11,57



Динамика содержания СРБ (мг/л) в сыворотке больных ГЛПС.

(28,6%) пациентов, в анализах мочи – протеинурия до 9,9 г/л, макрогематурия (28,6%), микрогематурия (100%), гиалиновые и зернистые цилиндры (100%), клетки Дуняевского (25%). Острая почечная недостаточность диагностирована у 25 (44,6%) пациентов. В полиурическом периоде отмечалось увеличение диуреза, к концу полиурического периода нормализация показателей азотовыделительной функции почек наблюдалась не у всех больных, в анализах мочи у 9 (16,1%) пациентов сохранялась протеинурия, у 98,2% больных регистрировалась изогипостенурия.

Таким образом, динамика лабораторных показателей (тромбоцитопении, протеинурии, креатининемии) зависит от формы и периода заболевания. Тромбоцитопения – патогномоничный и ранний симптом ГЛПС, характеризующий тяжесть заболевания. Повышение уровня трансaminaз при среднетяжелой и тяжелой формах ГЛПС свидетельствует о поражении печени, подчёркивая полиорганность заболевания. Учитывая разнонаправленные изменения СОЭ в зависимости от тяжести и периода заболевания, обусловленные влиянием, с одной стороны, воспалительных процессов, а с другой, – сгущением крови, данный показатель, по нашему мнению, нецелесообразно использовать для оценки степени активности воспалительного процесса при ГЛПС.

Особо следует остановиться на возможности определения СРБ количественным методом у больных ГЛПС. Динамика содержания СРБ в сыворотке больных ГЛПС в зависимости от периода и формы заболевания представлена на рисунке.

Как видно на рисунке, уже в начальном периоде ГЛПС наблюдаются высокие значения СРБ, различия статистически высокозначимы относительно контрольного показателя при всех формах ($p < 0,001$). Уровень СРБ варьировал от 17 до 43 мг/л при лёгкой форме заболевания, среднее значение достоверно ниже ($p < 0,001$), чем при среднетяжелой и тяжелой формах заболевания. Колебания СРБ при среднетяжелой форме составили 22–48 мг/л, а при тяжелой форме – 33–47

мг/л, различия средних значений изучаемого показателя между группами недостоверны. В олигурическом периоде наблюдается снижение данного показателя, но средние значения в 4–6 раз в зависимости от формы заболевания превышают контрольный показатель. Уровень СРБ заметно снижается к концу полиурического периода во всех группах, однако нормализуется и сопоставим с контрольным значением только при лёгкой форме заболевания. Ни у одного пациента из этой группы уровень СРБ не превышал референсного значения (10 мг/л). При среднетяжелой форме заболевания уровень СРБ в полиурическом периоде колебался от 6,8 до 17,3 мг/л, у 30% пациентов сохранялся на уровне более 10 мг/л, а среднее значения ($9,72 \pm 2,55$ мг/л) было выше контрольного ($p_k < 0,001$). При тяжелой форме заболевания содержание СРБ в сыворотке крови к концу полиурического периода колебалось от 7,6 до 20,6 мг/л, у 68% пациентов сохранялось на уровне более 10 мг/л, а среднее значение ($13,35 \pm 3,16$ мг/л) было достоверно выше не только контрольного показателя ($p_k < 0,001$), но и аналогичного показателя при легкой ($p_1 < 0,001$) и среднетяжелой ($p_2 < 0,001$) формах заболевания. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [13].

Поскольку СРБ отражает активность воспалительной реакции, был проведён анализ его взаимосвязи как с клиническими (температура), так и с лабораторными (СОЭ) показателями воспаления. Корреляционный анализ показал, что между содержанием СРБ и температурой тела в начальном периоде имеет место прямая зависимость средней силы при лёгкой ($r = 0,683$; $p < 0,001$), среднетяжелой ($r = 0,724$; $p < 0,001$) и тяжелой ($r = 0,550$; $p = 0,004$) формах заболевания; между содержанием СРБ и уровнем СОЭ статистически значимые взаимосвязи средней силы выявлены только у пациентов с тяжелой формой ГЛПС в полиурическом периоде ($r = 0,434$; $p = 0,038$).

Корреляционный анализ выявил обратную связь средней силы между концентрацией СРБ и уровнем тромбоцитов в начальном периоде при среднетяжелой ($r = -0,316$; $p = 0,049$) и тяжелой ($r = -0,554$; $p = 0,015$) формах ГЛПС, прямую связь между уровнем СРБ и креатинином в группах пациентов со среднетяжелой и тяжелой формами заболевания в олигурическом периоде ($r = 0,657$; $p = 0,005$ и $r = 0,603$; $p = 0,008$ соответственно), между СРБ и протеинурией в полиурическом периоде ($r = 0,474$; $p = 0,031$ и $r = 0,447$; $p = 0,036$ соответственно).

Таким образом, уровень СРБ у больных ГЛПС объективно отражает активность воспалительного процесса и коррелирует с такими характерными лабораторными критериями ГЛПС, как тромбоцитопения, креатининемия.

Как установлено нами ранее [8, 9], содержание АМ в сыворотке крови больных ГЛПС имеет важное диагностическое значение. Дисперсионный анализ выявил наличие статистически значимой динамики содержания АМ в зависимости от тяжести и периода заболевания. Кроме того, данный показатель был существенно выше в группе больных ГЛПС с поражением лёгких. Были изучены корреляции между показателями АМ и насыщением артериальной крови кислородом (сатурация кислорода, SrO_2). Полученные нами результаты демонстрируют обратную зависимость средней силы при среднетяжелой ($r = -0,61$; $p = 0,001$) и тяжелой ($r = -0,55$; $p = 0,02$) формах заболевания и сильную

связь при поражении лёгких ($r = -0,85; p < 0,001$) уже в начальном периоде, что обосновывает, на наш взгляд, прогностическую значимость данного показателя в отношении развития дыхательной недостаточности у больных ГЛПС. При помощи статистических методов нами определен уровень АМ, равный 45,0 Ед/мл, указывающий на поражение лёгких у пациентов с ГЛПС. Чувствительность теста составила 68%. Полученные результаты указывают на возможность использования данного лабораторного теста в комплексной диагностике поражения лёгких при ГЛПС.

Заключение. Таким образом, проведённые нами исследования ещё раз подтвердили, что ГЛПС на территории Республики Башкортостан обусловлена серотипом Пуумала. Зависимости степени тяжести заболевания от содержания противовирусных антител не выявлено.

Уровень СРБ у больных ГЛПС отражает активность воспалительного процесса объективнее, чем СОЭ. Статистически значимые различия в концентрации данного показателя наблюдались при сравнении лёгкой и тяжёлой форм заболевания, в то время как при среднетяжёлой и тяжёлой формах концентрация СРБ была сопоставима. Однако, по-нашему мнению, использование данного показателя в комплексной оценке тяжести заболевания вполне обосновано. Немаловажным фактором является доступность метода количественного определения СРБ, что даёт возможность рекомендовать его для широкого использования при ГЛПС.

Чёткая зависимость уровня тромбоцитов от тяжести и периодов заболевания, развитие тромбоцитопении в начале заболевания определено обусловлены непосредственным участием тромбоцитов в патогенетических механизмах, содержание тромбоцитов тесно взаимосвязано с основными клиническими проявлениями ГЛПС. В этой связи показатель тромбоцитов необходимо учитывать как при оценке степени тяжести и прогноза заболевания, так и в дифференциальной диагностике заболеваний, протекающих с поражением почек.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории геморрагических лихорадок ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН и лично проф. Е.А. Ткаченко и Т.К. Дзагуровой за помощь при проведении серологических исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 6, 7, 10–14 см. REFERENCES)

1. Сиротин Б.З., Фазлыева Р.М. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. В кн.: Мухин Н.А., ред. Нефрология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009: 548-561.
2. Слонова Р.А., Ткаченко Е.А., Иванис В.А., Компанец Г.Г., Дзагурова Т.К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Владивосток: ОАО «Примполиграфкомбинат»; 2006.
3. Павлов В.Н., Казихинов А.А., Сафиуллин Р.И., Фарганов А.Р., Чингизова Г.Н., Насибуллин И.М. и др. Абдоминальный синдром у больных с тяжелой формой геморрагической лихорадки и острой почечной недостаточностью. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2015; 10 (3):106-8.
5. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом у взрослых.

Клинические рекомендации. 2014. <http://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/GLPS.pdf>

8. Мухетдинова Г.А., Фазлыева Р.М., Мустафина В.Х. Диагностическое значение альвеомуцина у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 3: 37-9.
9. Фазлыева Р.М., Мухетдинова Г.А., Мавзютова Г.А., Кузовкина О.З. Диагностическая значимость определения альвеомуцина при заболеваниях с поражением легких. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012;11:23-5.

REFERENCES

1. Sirothin B.Z., Fazlyeva R.M. Hemorrhagic fever with renal syndrome. In the book: Mukhin N.A., ed. *Nephrology: National Leadership [Nefrologiya: natsional'noe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009: 548-561. (in Russian)
2. Slonova R.A., Tkachenko E.A., Ivanis V.A., Kompanets G.G., Dzagurova T.K. *Hemorrhagic fever with renal syndrome [Gemorragicheskaya lixoraдка s pochechnym sindromom]*. Vladivostok: ОАО «Примполиграфкомбинат»; 2006. (in Russian)
3. Pavlov V.N., Kazikhinurov A.A., Safiullin R.I., Farganov A.R., Chingizova G.N., Nasibullin I.M. et al. Abdominal syndrome in patients with severe hemorrhagic fever and acute renal failure. *Meditinskij vestnik Bashkortostana*. 2015; 10 (3):106-8. (in Russian)
4. Jiang H., Du H., Wang L.M., Wang P.Z., Bai X.F. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Pathogenesis and Clinical Picture. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2016; 3: 6:1.
5. Hemorrhagic fever with kidney syndrome in adults. Clinical recommendations. 2014. <http://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/GLPS.pdf>. (in Russian)
6. Outinen T.K., Mantula P., Laine O.K., Pörsti I., Vaheri A., Mäkelä S.M. et al. Haematuria is a marker for the severity of acute kidney injury but does not associate with thrombocytopenia in acute Puumala hantavirus infection. *Infect. Dis. (Lond)*. 2017; 49(11-12): 840-6.
7. Mantula P.S., Outinen T.K., Clement J.P.G., Huhtala H.S.A., Pörsti I.H., Vaheri A. et al. Glomerular Proteinuria Predicts the Severity of Acute Kidney Injury in Puumala Hantavirus-Induced Tubulointerstitial Nephritis. *Nephron*. 2017; 136(3): 193-201.
8. Mukhetdinova G.A., Fazlyeva R.M., Mustafina V.Kh. Diagnostic value of alveomucine in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 3: 37-9. (in Russian)
9. Fazlyeva R.M., Mukhetdinova G.A., Mavzyutova G.A., Kuzovkina O.Z. Diagnostic significance of the definition of alveomucine in diseases with lung lesions. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 11: 23-5. (in Russian)
10. Du H., Li J., Yu H., Lian J., Zhang Y., Zhang Y. et al. HMGB-1 as a novel predictor of disease severity and prognosis in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Mediators Inflamm*. 2015; 696248.
11. Sadeghi M., Lahdou I., Ettinger J., Navid M.H., Daniel V., Zeier M. et al. Association of low serum TGF- β level in hantavirus infected patients with severe disease. *BMC Immunol*. 2015; 14:16-9.
12. Laine O., Joutsu-Korhonen L., Lassila R., Huhtala H., Vaheri A., Mäkelä S. et al. Elevated thrombopoietin and platelet indices confirm active thrombopoiesis but fail to predict clinical severity of puumala hantavirus infection. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(52): e5689.
13. Outinen T.K., Laine O.K., Mäkelä S., Pörsti I., Huhtala H., Vaheri A. et al. Thrombocytopenia associates with the severity of inflammation and variables reflecting capillary leakage in Puumala Hantavirus infection, an analysis of 546 Finnish patients. *Infect Dis (Lond)*. 2016; 48(9): 682-7.
14. Skarphedinsson S., Thiesson H.C., Shakar S.A., Tepel M. Factors predicting kidney damage in Puumala virus infected patients in Southern Denmark. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*. 2015; 34(10): 2017-21.

Поступила 25.05.18

Принята к печати 13.06.18

СИСТЕМА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ СЛЮНЫ ПРИ РАКЕ ЛЁГКОГО

¹Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск;

²Омский государственный медицинский университет, 644099, Омск;

³Университетская больница Страсбурга, 67091, Страсбург, Франция

Цель исследования – изучение показателей системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в слюне при раке лёгкого различных гистологических типов. В исследовании случай – контроль приняли участие 740 добровольцев, которые были разделены на три группы: основную (рак лёгкого, n = 347), группу сравнения (незлокачественные лёгочные патологии, n = 178) и контрольную (условно здоровые, n = 215). Всем участникам было проведено анкетирование, биохимическое исследование слюны, гистологическая верификация диагноза. Параметры липопероксидации и антиоксидантной защиты определены спектрофотометрически. Межгрупповые различия оценены непараметрическим критерием. На фоне рака лёгких наблюдается развитие окислительного стресса, что проявляется повышением уровня продуктов липопероксидации, а также снижением антиоксидантной защиты в слюне. Показано, что активность ферментов первого звена антиоксидантной защиты существенно снижается ($p < 0,0001$), тогда как активность пероксидаз слюны повышается ($p = 0,0037$). Показатели неферментативной защиты меняются разнонаправленно: уровень мочевой кислоты при заболеваниях лёгких снижается ($p = 0,0399$), тогда как концентрация альбумина растёт, в данных условиях он начинает проявлять прооксидантные свойства. Выявлены различия между немелкоклеточным и нейроэндокринным раком лёгкого по характеру динамики показателей антиоксидантной защиты. В целом, нарушение баланса системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты является результатом нарушения координации иммунометаболических процессов и свидетельствует о снижении приспособительных реакций организма.

Ключевые слова: слюна; рак лёгкого; перекисное окисление липидов; антиоксидантная защита.

Для цитирования: Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж. Система перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты слюны при раке лёгкого. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 530-537. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2018-63-9-530-537>

Bel'skaya L.V.¹, Kosenok V.K.², Massard Zh.³

THE SYSTEM OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT PROTECTION OF SALIVA IN LUNG CANCER

¹Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation;

²Omsk State Medical University, Omsk, 644099, Russian Federation

³University Hospital of Strasbourg, Strasbourg

The aim of the study was to study the parameters of the lipid peroxidation system and antioxidant protection in saliva in lung cancer of various histological types. In the case-control study, 740 volunteers participated in the study, which were divided into 3 groups: primary (lung cancer, n = 347), comparison group (non-malignant pulmonary pathologies, n = 178) and control (conditionally healthy, n = 215). Questioning, biochemical examination of saliva, histological verification of the diagnosis were conducted to all participants. The parameters of lipoperoxidation and antioxidant protection are determined spectrophotometrically. Intergroup differences are estimated by a nonparametric criterion. Against the background of lung cancer, the development of oxidative stress is observed, which is manifested in the increase in the level of lipid peroxidation products, as well as in the reduction of antioxidant protection in saliva. It is shown that the activity of the enzymes of the first link of antioxidant protection is significantly reduced ($p < 0.0001$), whereas the activity of salivary peroxidases increases ($p = 0.0037$). The parameters of non-enzymatic protection vary in different directions: the level of uric acid in lung pathologies decreases ($p = 0.0399$), whereas albumin concentration increases, under these conditions, it begins to exhibit pro-oxidant properties. Differences between non-small cell and neuroendocrine lung cancer have been revealed by the nature of the dynamics of antioxidant protection indices. In general, the disturbance of the balance of the lipid peroxidation system and antioxidant protection is the result of a disruption in the coordination of immunometabolic processes and indicates a decrease in adaptive reactions of the organism.

Key words: saliva; lung cancer; lipid peroxidation; antioxidant protection.

For citation: Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Massard Zh. The system of lipid peroxidation and antioxidant protection of saliva in lung cancer. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63 (9): 530-537 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2018-63-9-530-537>

For correspondence: Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Associate Professor; e-mail: ludab2005@mail.ru

Information about authors:

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

Kosenok V.K., <http://orcid.org/0000-0002-2072-2460>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 08.05.2018
Accepted 25.05.2018

В последние годы широко обсуждается патогенетическая роль свободных радикалов кислорода и инициируемых ими процессов липопероксидации в развитии заболеваний, в том числе онкологических [1–3]. Окислительный стресс проявляется накоплением повреждённых оснований ДНК, продуктов окисления белков и пероксидации липидов, а также снижением уровня антиоксидантов и связанной с этим повышенной восприимчивостью липидов мембран и липопротеинов к действию прооксидантов [4, 5]. В частности, в лёгких окислительный стресс индуцирует модификацию белков, активацию макрофагов и рекрутирование нейтрофилов в центральных и периферических воздухоносных путях, аккумуляцию токсичных продуктов липопероксидации, пероксида водорода, нитрозотиолов и нитратов в мембранах лёгких и крови, а также в выдыхаемом воздухе [6–10]. Кроме того, окислительный стресс может провоцировать гиперплазию слизистых оболочек жёлёз и апоптоз эпителиальных клеток бронхов [11].

Известно, что основную роль в формировании окислительного стресса играют активные формы кислорода и азота, обладающие высокой реакционной способностью и вызывающие, в частности, окислительную модификацию биополимеров (белков, липидов, нуклеиновых кислот, углеводов), что в итоге приводит к нарушению тканевого дыхания во внутренней мембране митохондрий и процессов гидроксирования в микросомах [12]. Система ингибирования избыточного аутоокисления состоит из неферментативного и ферментативного звеньев [13]. К специфическим антиоксидантным ферментам можно отнести супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу, глутатионредуктазу и трансферазы [14, 15]. Эта группа ферментов, локализующихся преимущественно внутриклеточно, обладает способностью разрушать свободные радикалы, а также участвовать в разложении гидроперекисей нерадикальным путём. Среди неферментных антиоксидантов можно выделить мочевую кислоту, аскорбат и альбумины, способные перехватывать избыточно продуцируемые свободные радикалы [16, 17].

Продукты липопероксидации и антиоксидантной защиты традиционно определяют в плазме крови, однако существует возможность использования слюны в качестве субстрата [18–20]. Следует отметить, что исследование слюны имеет преимущества по сравнению с использованием венозной или капиллярной крови, что обусловлено неинвазивностью сбора и отсутствием риска инфицирования при получении биоматериала [21]. При этом слюна адекватно отражает биохимический статус и физиологическое состояние человека, что позволяет использовать её в клинической лабораторной диагностике [22, 23].

Цель исследования – изучение показателей системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в слюне при раке лёгкого различных гистологических типов.

Материал и методы. В исследовании приняли участие добровольцы, которые были разделены на три группы: основную (с диагнозом рак лёгкого), группу сравнения (с незлокачественными заболеваниями лёгких) и контрольную группу (условно здоровые). Основная группа включала пациентов с гистологически подтверждённым диагнозом рак лёгкого (аденокарцинома, плоскоклеточный и нейроэндокринный рак лёгкого). Контрольную группу составили условно здоровые паци-

енты, у которых при проведении плановой диспансеризации не было выявлено патологии лёгких. Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения рассматривались: возраст пациентов 30–75 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза.

У всех участников до начала лечения проводили забор слюны в количестве 2 мл. Образцы слюны собирали утром натощак путём сплевывания в стерильные пробирки, центрифугировали при 7000 об/мин. Спектрофотометрическими методами определяли содержание субстратов для процессов липопероксидации – диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов и оснований Шиффа по методу И.А. Волчегорского [24], альбумина – по реакции с бромкрезоловым зелёным, мочевой кислоты – урикальным методом с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) [25]. Содержание конечного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (МДА) определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой методом В.Б. Гаврилова [26]. Активность СОД определяли по накоплению продукта автоокисления адреналина супероксидным анион-радикалом в щелочной среде [27], активность каталазы – по методике М.А. Королюка [28]. Антиоксидантную активность (АОА) выявляли по регистрации скорости окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДХФИФ) кислородом, растворённым в реакционной среде, активность пероксидазы определяли по интенсивности окисления перекиси водорода в присутствии бензидина [29, 30].

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2000 г. (Эдинбург, Шотландия)) и одобрено на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

Статистический анализ выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft, США) и пакета R (версия 3.2.3) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна–Уитни. Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В исследование включены 525 пациентов Клинического онкологического диспансера г. Омска и 215 практически здоровых людей, выбранных в качестве контрольной группы. Основная группа включала 347 больных раком лёгкого с различными гистологическими типами (плоскоклеточный рак – 116, аденокарцинома – 174, нейроэндокринные опухоли – 57 человек). Группу сравнения составили 178 больных с незлокачественной лёгочной патологией (гамартомы – 77, туберкулёмы – 41, саркоидоз – 29, фибромы – 31 человек). Средний возраст больных составил $59,2 \pm 1,1$ года для основной группы, $56,0 \pm 2,1$ года для группы сравнения и $52,1 \pm 2,5$ года для контрольной группы.

На первом этапе проведена проверка характера распределения и гомогенности дисперсий в группах. Согласно тесту Шапиро–Уилка содержание всех определя-

Показатели системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты слюны

Параметр	Контроль, <i>n</i> = 215 (1)	ДНО, <i>n</i> = 178 (2)	Рак лёгкого, <i>n</i> = 347 (3)
Мочевая кислота, ммоль/моль	104,76 [46,37; 178,90]	79,64 [32,18; 151,38]	86,54 [36,29; 166,67]
	-	$p_{1-2} = 0,0321$	$p_{1-3} = 0,0399$
Альбумин, ммоль/л	0,298 [0,199; 0,484]	0,309 [0,173; 0,510]	0,317 [0,178; 0,490]
Каталаза, мкат/л	4,85 [3,77; 6,11]	2,94 [2,24; 4,28]	2,69 [2,05; 4,13]
	-	$p_{1-2} < 0,0001$	$p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} < 0,0001$
СОД, усл. ед.	63,16 [34,21; 105,26]	60,53 [34,21; 102,63]	60,53 [26,32; 109,21]
Антиоксидантная активность, ммоль/л	1,67 [1,41; 2,14]	1,60 [1,31; 2,14]	1,75 [1,45; 2,08]
Пероксидаза, усл. ед.	0,415 [0,300; 0,790]	0,450 [0,300; 0,860]	0,510 [0,300; 1,080]
	-	-	$p_{1-3} = 0,0037$, $p_{2-3} = 0,0043$
Диеновые конъюгаты, усл. ед.	3,93 [2,89; 4,13]	3,90 [3,79; 4,07]	3,84 [2,88; 4,09]
	-	-	$p_{1-3} < 0,0001$, $p_{2-3} < 0,0001$
Триеновые конъюгаты, усл. ед.	0,894 [0,828; 0,973]	0,954 [0,825; 1,222]	0,979 [0,843; 1,233]
	-	$p_{1-2} < 0,0001$	$p_{1-3} < 0,0001$, $p_{2-3} < 0,0001$
Основания Шиффа, усл. ед.	0,543 [0,508; 0,575]	0,558 [0,495; 0,682]	0,562 [0,504; 0,675]
	-	$p_{1-2} = 0,0253$	$p_{1-3} = 0,0483$
МДА, ммоль/л	6,75 [5,90; 8,38]	7,18 [5,73; 9,32]	7,35 [5,64; 9,32]

Примечание. ДНО – доброкачественные новообразования легкого.

емых параметров не соответствует нормальному распределению ($p < 0,05$). Проведённый тест на гомогенность дисперсий (тест Баргллетта) в группах позволил отклонить гипотезу, согласно которой дисперсии гомогенны по группам ($p = 0,00017$). Поэтому для обработки полученных данных были применены непараметрические методы статистики.

В ходе проведённых исследований установлено статистически достоверное уменьшение содержания диеновых конъюгатов на фоне одновременного роста уровня триеновых конъюгатов и оснований Шиффа (табл.1). Для подтверждения гипотезы о том, что выявленные изменения обусловлены наличием онкологического заболевания, проведена оценка перечисленных биохимических параметров на фоне незлокачественной опухолевой патологии (группа сравнения). Показано, что при переходе от контрольной группы к группе сравнения, а затем к основной наблюдаются следующие изменения: увеличивается содержание триеновых конъю-

гатов и оснований Шиффа, а также конечного продукта перекисного окисления МДА. В этом же направлении уменьшается содержание диеновых конъюгатов, что подтверждает факт увеличения окислительного стресса как на фоне неопухолевых заболеваний, так и при раке лёгкого. Следует отметить статистически достоверное снижение активности антиоксидантной защиты слюны, причём это отражается как на ферментативном, так и на неферментативном звеньях (см. табл.1). Так, активность каталазы снижается на 39,4 и 44,5%, а концентрация мочевой кислоты уменьшается на 24,0 и 17,4% для группы сравнения и основной группы соответственно.

На следующем этапе исследования проведено изучение показателей системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты для различных гистологических форм рака лёгкого (табл. 2, 3).

Интересно, что содержание МДА как конечного продукта перекисного окисления липидов повышается при всех гистологических типах опухоли, однако отдельные

Таблица 2

Система липопероксидации при раке лёгкого различных гистологических типов

Параметр	Контроль, <i>n</i> = 215 (1)	АК, <i>n</i> = 174 (2)	ПРЛ, <i>n</i> = 116 (3)	НЭО, <i>n</i> = 57 (4)
Диеновые конъюгаты, усл. ед.	3,90 [3,79; 4,07]	3,87 [2,99; 4,10]	3,81 [2,82; 4,05]	3,88 [2,85; 4,15]
	-	$p_{1-2} = 0,0036$	$p_{1-3} = 0,0005$	-
Триеновые конъюгаты, усл. ед.	0,894 [0,828; 0,973]	0,946 [0,836; 1,188]	0,985 [0,827; 1,231]	0,961 [0,797; 1,275]
	-	$p_{1-2} = 0,0003$	$p_{1-3} < 0,0001$	$p_{1-4} = 0,0366$
Основания Шиффа, усл. ед.	0,543 [0,508; 0,575]	0,556 [0,503; 0,671]	0,579 [0,513; 0,681]	0,563 [0,503; 0,676]
	-	$p_{1-2} = 0,0420$	$p_{1-3} = 0,0001$	$p_{1-4} = 0,0417$
МДА, ммоль/л	6,75 [5,90; 8,38]	7,18 [5,81; 9,32]	7,52 [5,64; 9,49]	6,92 [5,77; 9,40]
	-	$p_{1-2} = 0,0012$	$p_{1-3} = 0,0009$	$p_{1-4} = 0,0357$

Примечание. Здесь и в табл. 3: АК – аденокарцинома; ПРЛ – плоскоклеточный рак; НЭО – нейроэндокринные опухоли легкого.

Система антиоксидантной защиты слюны при раке лёгкого различных гистологических типов

Параметр	Контроль, n = 215 (1)	АК, n = 174 (2)	ПРЛ, n = 116 (3)	НЭО, n = 57 (4)
Мочевая кислота, мкмоль/моль	104,76 [46,37; 178,90]	76,92 [34,62; 165,47]	99,77 [45,31; 167,05]	90,73 [25,00; 168,22]
Альбумин, ммоль/л	0,298 [0,199; 0,484]	0,337 [0,183; 0,535]	0,315 [0,178; 0,495]	0,297 [0,172; 0,398]
Каталаза, мкат/л	4,85 [3,77; 6,11]	2,74 [2,05; 4,30]	2,70 [2,11; 3,83]	2,52 [1,78; 3,76]
СОД, усл.ед.	- 63,16 [34,21; 105,26]	$p_{1-2} < 0,0001$ 61,84 [23,68; 110,53]	$p_{1-3} < 0,0001$ 56,58 [27,63; 90,79]	$p_{1-4} < 0,0001$ 68,42 [28,95; 136,84]
Антиоксидантная активность, ммоль/л	1,67 [1,41; 2,14]	1,77 [1,41; 2,10]	1,81 [1,60; 2,10]	1,56 [1,37; 1,83]
Пероксидаза, усл.ед.	0,415 [0,300; 0,790]	0,535 [0,360; 0,925]	0,470 [0,220; 0,630]	0,495 [0,220; 0,660]

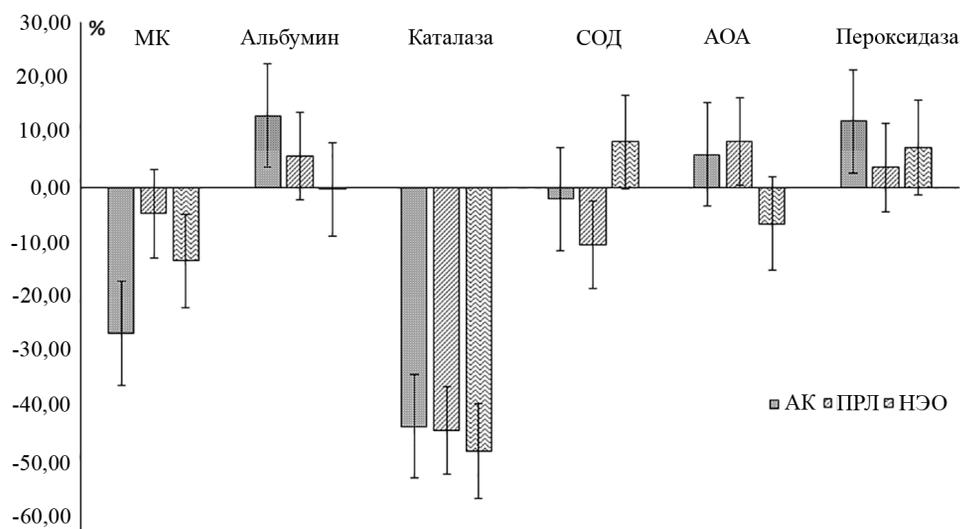
компоненты системы липопероксидации изменяются разнонаправленно (см. табл.2). Так, уровень диеновых конъюгатов самый низкий в группе пациентов с плоскоклеточным раком лёгкого, тогда как уровень оснований Шиффа в данной группе максимален. Для аденокарциномы и нейроэндокринных опухолей наоборот. Расчёт коэффициента корреляции по Спирмену показал, что существует отрицательная корреляционная связь между уровнем диеновых и триеновых конъюгатов ($r = -0,3665$, $r = -0,5532$ и $r = -0,7987$) и положительная корреляционная связь между содержанием триеновых конъюгатов и оснований Шиффа ($r = 0,7283$, $r = 0,7555$ и $r = 0,7717$ для аденокарциномы, плоскоклеточного и нейроэндокринного рака соответственно).

Дополнительно отмечено увеличение концентрации альбумина при немелкоклеточном раке лёгких (+13,1% для аденокарциномы, +5,7% для плоскоклеточного рака лёгких), тогда как для нейроэндокринных опухолей уровень альбумина не превышает значений, характерных для контрольной группы (табл.3).

Содержание мочевой кислоты уменьшается для всех гистологических типов рака лёгкого, однако в случае аденокарциномы этот эффект более выражен (-26,6%). На фоне немелкоклеточного рака лёгких снижается ак-

тивность каталазы и СОД, для нейроэндокринных опухолей лёгкого динамика активности каталазы и СОД разнонаправленна (рис.1). Антиоксидантная активность слюны растёт на фоне немелкоклеточного рака лёгкого, тогда как на фоне нейроэндокринного рака снижается. Интересно отметить, что для пероксидазы наблюдается только рост активности независимо от гистологического типа рака лёгкого (см. рис.1, табл.3).

Значения показателей системы антиоксидантной защиты и липопероксидации в слюне тесно взаимосвязаны. Так, активность пероксидазы демонстрирует наличие отрицательной корреляционной связи с уровнем диеновых конъюгатов ($r = -0,2817$, $r = -0,2187$ и $r = -0,2384$ для аденокарциномы, плоскоклеточного и нейроэндокринного рака лёгкого соответственно). Также отмечена отрицательная корреляция содержания МДА и активности пероксидазы для всех гистологических типов рака лёгкого и положительная корреляция уровня МДА и концентрации альбумина для нейроэндокринных опухолей ($r = 0,2632$). Однако корреляция активности пероксидазы и каталазы выявлена только для немелкоклеточного рака лёгкого ($r = 0,2631$ и $r = 0,5085$ для аденокарциномы и плоскоклеточного рака), аналогично и для концентрации альбумина ($r = 0,4813$ и $r = 0,2086$



Изменение показателей антиоксидантной защиты слюны на фоне рака лёгкого различных гистологических типов.

соответственно). Для нейроэндокринных опухолей лёгкого концентрация альбумина коррелирует с антиоксидантной активностью слюны ($r = 0,4218$), а также активностью СОД ($r = 0,2223$), тогда как антиоксидантная активность взаимосвязана с активностью каталазы ($r = 0,4130$).

Обсуждение результатов. МДА является конечным продуктом перекисного окисления липидов, маркером липидной перекисидации [31]. Показано, что содержание МДА повышается при раке лёгких, однако статистически достоверного увеличения данного показателя выявить не удалось, несмотря на многочисленные подтверждения данного факта в литературных источниках [32–35]. В ряде исследований установлено, что МДА и продукты перекисного окисления липидов способны ингибировать рост клеточных культур рака лёгкого, в частности аденокарциномы [36, 37]. Кроме того, высокая экспрессия ферментов, подавляющих перекисное окисление липидов, в первичных очагах поражения и метастатических лимфатических узлах была связана с плохим прогнозом у пациентов с аденокарциномой лёгких [38]. В связи с этим было высказано предположение, что повышенное перекисное окисление липидов может представлять собой некоторую метаболическую адаптацию, способствующую образованию продуктов, которые могут ингибировать рост рака лёгких [39].

В ходе настоящего исследования выявлено, что уровень диеновых конъюгатов уменьшается при раке лёгкого по сравнению с контрольной группой. Недостаточный уровень первичных продуктов липоперекисидации может являться результатом устойчивости опухолевой ткани к инициаторам перекисного стресса и модификации функционирования ферментных систем, регулирующих перекисное окисление липидов [40, 41]. Уровень вторичных продуктов на фоне рака лёгкого повышается, что может являться адаптивным процессом, направленным на выведение из клеток более токсичных метаболитов – диеновых конъюгатов и МДА.

Гистологический тип опухоли, в свою очередь, определяет направление сдвига равновесия между первичными и конечными продуктами липоперекисидации. В случае плоскоклеточного рака лёгких это равновесие сдвинуто в сторону конечных продуктов, тогда как для аденокарциномы – наоборот. При нейроэндокринных опухолях лёгкого также происходит усиление окислительных процессов, но оно вызвано значительно более тяжёлым течением заболевания, при котором организм включает все возможные защитные механизмы. Это, вероятно, приводит к тому, что на фоне повышения уровня первичных продуктов перекисного окисления липидов конечные продукты образуются в незначительных количествах, что может быть обусловлено более высокой резистентностью опухолевых клеток к окислительному стрессу.

Известно, что каталаза и СОД являются первым звеном защиты от свободнорадикального окисления, устраняя активные формы кислорода – супероксидный радикал и перекись водорода [42]. Для обоих ферментов отмечено понижение активности, более выраженное для каталазы (см. табл.1). СОД в плазме крови представлена особой формой экстрацеллюлярной СОД, которая синтезируется и выделяется клетками эндотелия сосудов. Внутриклеточные формы СОД не вносят вклада в активность фермента, так как быстро подвергаются деградации. Форма, не связанная с эндотелием сосудов,

составляет около 10% от общего количества фермента. Можно предположить, что снижение активности СОД происходит как за счёт снижения доли свободной формы, так и за счёт инактивации фермента активными формами кислорода. В отличие от СОД каталаза собственной внеклеточной формы не имеет, в связи с чем активностью данного фермента представлена ферментом, вышедшим из клеток в результате их повреждения или разрушения. Более существенное снижение активности каталазы может свидетельствовать о недостаточной компенсации окислительного стресса на фоне патологических процессов в лёгких.

Из данных литературы известно, что в тканях опухолей лёгкого повышается активность СОД, тогда как активность каталазы снижается, а содержание глутатионпероксидазы практически не меняется по сравнению с нормальными тканями лёгких [14, 43]. Иммуногистохимически показано уменьшение или отсутствие экспрессии каталазы в опухолевых клетках в отличие от соседних здоровых эпителиальных клеток дыхательных путей. Параллельные изменения антиоксидантной активности, белка и экспрессии мРНК отмечались в клетках аденокарциномы лёгкого, что в свою очередь может влиять на уровни провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β). Таким образом, воспаление в лёгких может способствовать повышению уровня СОД и снижению активности каталазы, что может привести к повышенному содержанию H₂O₂ и создавать внутриклеточную среду, благоприятную для повреждения ДНК и развития рака [44]. Согласно полученным результатам, активность СОД в слюне пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого снижается, тогда как при нейроэндокринных опухолях повышается (см.табл.3), что, по-видимому, объясняется особенностями метаболизма опухолевой ткани в каждом конкретном случае.

Показатель АОА отражает содержание в биологических жидкостях низкомолекулярных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами (витамины, серосодержащие аминокислоты, глутатион, мелатонин и т.д.) [30]. Несмотря на выявленное снижение активности СОД и каталазы на фоне немелкоклеточного рака лёгкого АОА слюны растёт, что может быть связано с большим вкладом неферментных систем, в частности альбумина. Для нейроэндокринного рака лёгкого АОА снижается, что коррелирует с большим снижением активности каталазы, а также отсутствием роста концентрации альбумина (см. табл.3).

Пероксидазная активность слюны является комплексным показателем, поскольку отражает суммарную активность слюнной пероксидазы (лактопероксидазы) и миелопероксидазы [45, 46]. В ряде исследований показано, что увеличение экспрессии миелопероксидазы способствует возрастанию риска повреждения ДНК [47]. Окислители на основе миелопероксидазы (НОС1) участвуют в биоактивации канцерогенов (например, полициклических ароматических углеводородов) и превращении их в реакционноспособные метаболиты, которые могут ковалентно связываться с ДНК и приводить к мутациям в онкогенах и генах опухолевых супрессоров [48]. Под действием миелопероксидазы происходит генерация NO⁺, который вызывает S-нитрозилирование белка, что может приводить, например, к инактивации каспазы-3 [49]. Таким образом, миелопероксидаза может участвовать в ингибировании апоптотического каскада, что способствует росту опухоли [50].

Альбумин определяет неспецифическую антиоксидантную защиту биологических жидкостей, поскольку обладает антирадикальными и антиперекисными свойствами за счёт наличия тиоловых групп [51]. Известно, что 40% аминокислот, входящих в состав альбумина, обладают антиокислительными свойствами. В свою очередь продукты протеолитического распада альбумина способны связывать продукты свободных радикалов либо модифицировать их функциональные группировки. Помимо этого, имеет место и радиопротекторный эффект SH-групп, связанный с их ингибирующим действием на активированные кислородные метаболиты и стабилизацией мембран [52]. SH-содержащие соединения также могут вовлекаться в ферментативное восстановление фенольных антиоксидантов, при этом происходит окисление молекул альбумина, что может приводить к изменению четвертичной структуры молекулы и модификации её активных центров со снижением функциональной активности [53]. Окисление SH-групп белка или взаимодействие тиоловой группы с NO может приводить к появлению прооксидантных свойств альбумина [17]. Известно, что активные формы кислорода и продукты их реакции с другими биомолекулами, в частности липоперекиси, влияют на конформацию альбумина, а, следовательно, на его связывающие свойства [54, 55]. Повышение концентрации альбумина может быть связано с изменением объема транспорта различных метаболитов и в первую очередь жирных кислот, что является важным звеном перестройки энергетического метаболизма при росте злокачественной опухоли [56, 57].

Мочевая кислота может быть медиатором свободнорадикальных реакций, а также выступать в качестве антиоксиданта [58]. Её вклад в общую антиокислительную способность плазмы крови в отношении перекисей составляет 30–65%, гидроперекисей – 10–15% [59]. В ряде исследований показано, что мочевая кислота способна защищать липопротеины от окислительного стресса [60]. В связи с этим уменьшение концентрации мочевой кислоты, выявленное для всех гистологических типов рака лёгкого, а также для неопухольчатых патологий лёгких, закономерно на фоне общего снижения антиоксидантной защиты. Расчёт коэффициента корреляции по Спирмену подтверждает существование положительной корреляции между концентрацией мочевой кислоты и уровнем диеновых конъюгатов ($r = 0,4157$), отрицательной между содержанием мочевой кислоты и уровнем триеновых конъюгатов и оснований Шиффа ($r = -0,3035$ и $r = -0,2732$ соответственно).

Заключение. Таким образом, на фоне рака лёгких наблюдается развитие окислительного стресса, что проявляется повышением уровня продуктов липопероксидации, а также снижением антиоксидантной защиты в слюне. Показано, что активность ферментов первого звена антиоксидантной защиты существенно снижается, тогда как активность пероксидаз слюны растёт. Показатели неферментативной защиты меняются разнонаправленно: уровень мочевой кислоты при патологиях лёгких снижается, тогда как концентрация альбумина растёт, в данных условиях он начинает проявлять прооксидантные свойства. Выявлены различия между немелкоклеточным (плоскоклеточный рак и аденокарцинома) и нейроэндокринным раком лёгкого по характеру динамики показателей антиоксидантной защиты. В целом нарушение баланса системы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты является результатом

нарушения координации иммунометаболических процессов и свидетельствует о снижении приспособительных реакций организма.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-2, 4-6, 8-12, 14-15, 18-23, 31-41, 43-53, 55, 57, 59-60 см. REFERENCES)

3. Горожанская Э.Г., Свиридова С.П., Байкова В.Н., Зубрихина Г.Н., Добровольская М.М., Сытов А.В. Окислительный стресс в тромбоцитах при онкопатологии. *Биомедицинская химия*. 2015; 61(4): 519-25.
7. Макарова Е.В., Вахламов В.А., Шония М.Л., Меньков Н.В., Соловьева Т.И., Архипова Е.В., Варварина Г.Н., Новиков В.В. Выявление предикторов развития воспалительного процесса в бронхах начинающих курильщиков. *Современные технологии в медицине*. 2015; 7(3): 77-83.
13. Николаев И.В., Колобкова Л.Н., Ландесман Е.О., Степанова Е.В., Королева О.В. Антиоксидантная и пероксидазная активность слюны при воспалительных заболеваниях пародонта и возможность их коррекции. *Биомедицинская химия*. 2008; 54(4): 454-62.
16. Чанчаева Е.А., Айзман Р.И., Герасев А.Д. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека. *Экология человека*. 2013; 7: 50-8.
17. Созарукова М.М., Проскурина Е.В., Владимиров Ю.А. Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2016; 1: 61-67.
24. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 1: 127-31.
25. *Клиническая биохимия. Сборник инструкций*. Новосибирск: ЗАО «Вектор-Бест»; 2011.
26. Гаврилов В.Б., Бидула М.М., Фурманчук Д.А., Конев С.В., Алейникова О.В. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999; 2: 13–7.
27. Сирота Т.В. Участие карбонат/бикарбонатных ионов в супероксид генерирующей реакции автоокисления адреналина. *Биомедицинская химия*. 2015; 61(1): 115-24.
28. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16–9.
29. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник. М.: Колос; 2004.
30. Бельская Л.В., Сарф Е.А., Косенок В.К., Массард Ж. Антиоксидантная активность смешанной слюны человека в норме. *Экология человека*. 2017; 6: 36-40.
42. Герасименко М.Н., Зуков Р.А., Титова Н.М., Дыхно Ю.А., Модестов А.А., Попов Д.В. Антиоксидантная система и маркеры окислительного стресса при раке почки. *Сибирский онкологический журнал*. 2012; 5(53): 40-43.
54. Шейбак В.М. Транспортная функция сывороточного альбумина: цинк и жирные кислоты. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2015; 14(2): 16-22.
56. Смолякова Р.М., Прохорова В.И., Жарков В.В., Лаппо С.В. Оценка связывающей способности и транспортной функции сывороточного альбумина у больных раком легкого. *Новости хирургии*. 2005; 13(1-4): 78-84.

58. Галунска Б., Паскалев Д., Янкова Т., Чанкова П. Двухикий янус биохимии: мочевая кислота – оксидант или антиоксидант? *Нефрология*. 2004; 4(8): 25-31.

REFERENCES

1. Reuter S., Gupta S.C., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*. 2010; 49: 1603-16.
2. Choudhari S.K., Chaudhary M., Gadbaal A.R., Sharma A., Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanism in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncology*. 2014; 50(1): 10-8.
3. Gorozhanskaya E.G., Sviridova S.P., Baykova V.N., Zubrikhina G.N., Dobrovolskaya M.M., Sytov A.V. Oxidative stress in platelets in oncopathology. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015; 61(4): 519-25. (in Russian)
4. Gęgotek A., Nikliński J., Żarković N., Żarković K., Waeg G., Łuczaj W., Charkiewicz R., Skrzydlewska E. Lipid mediators involved in the oxidative stress and antioxidant defense of human lung cancer cells. *Redox Biology*. 2016; 9:210-9.
5. Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F., Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer*. 2007; 121:2381-6.
6. Boots A.W., Haenen G.R., Bast A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003; 22(46): 14s-27s.
7. MakarovaYe.V., Vakhlamov V.A., Shoniya M.L., Men'kov N.V., Solov'yeva T.I., ArkhipovaYe.V., Varvarina G.N., Novikov V.V. Identifying the predictors of the development of the inflammatory process in the bronchi of beginner smokers. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine*. 2015; 7(3): 77-83. (in Russian)
8. Park H.S., Kim S.R., Lee Y.C. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 2009; 14(1): 27-38.
9. Barreiro E., Fermoselle C., Mateu-Jimenez M., Sánchez-Font A., Pijuan L., Gea J., Curull V. Oxidative stress and inflammation in the normal airways and blood of patients with lung cancer and COPD. *Free Radical Biology & Medicine*. 2013; 65:859-71.
10. Filaire E., Dupuis C., Galvaing G., Aubreton S., Laurent H., Richard R., Filaire M. Lung cancer: What are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung cancer*. 2013; 82:383-9.
11. Lin J.L., Thomas P.S. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2010; 7(4): 291-306.
12. Morry J., Ngamcherdtrakul W., Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles. *Redox Biology*. 2017; 11: 240-53.
13. Nikolayev I.V., Kolobkova L.N., LandesmanYe.O., StepanovaYe.V., Koroleva O.V. Antioxidant and peroxidase activity of saliva in inflammatory periodontal diseases and the possibility of their correction. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2008; 54(4): 454-62. (in Russian)
14. Khan A., Tania M., Zhang D., Chen H. Antioxidant Enzymes and Cancer. *Chin J Cancer Res*. 2010; 22(2): 87-92.
15. Abiaka C., Al-Awadi F., Al-Sayer H., Gulshan S., Behbehani A., Farghally M. Activities of Erythrocyte Antioxidant Enzymes in Cancer Patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2002; 16: 167-71.
16. ChanchayevaYe.A., Ayzman R.I., Gerasev A.D. Modern idea of the antioxidant system of the human body. *Ekologiya cheloveka*. 2013; 7: 50-8. (in Russian)
17. Sozarukova M.M., ProskurinaYe.V., Vladimirov YU.A. Serum albumin as a source and target of free radicals in pathology. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2016; 1: 61-7. (in Russian)
18. Östürk L.K., Akyüz S., Yarat A., Koç S., Gül N., Doğan B.N. Salivary lipid peroxidation and total sialic acid levels during healthy gestation and postpartum: a longitudinal study. *Clinical Biochemistry*. 2010; 43: 430-4.
19. Wong D.T. Salivary Diagnostics. Wiley-Blackwell; John Wiley & Sons; Philadelphia, PA, USA. 2008.
20. Giebutowicz J., Wroczynski P., Samolczyk-Wanyura D. Comparison of antioxidant enzymes activity and the concentration of uric acid in the saliva of patients with oral cavity cancer, odontogenic cysts and healthy subjects. *J. Oral Pathol. Med*. 2011; 40: 726-730.
21. Miller C.S. Foley J.D., Bailey A.L., Campell C.L., Humphries R.L., Christodoulides N., Floriano P.N. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark. Med*. 2010; 4(1): 171-89.
22. Soares Nunes L.A., Mussavira S., Bindhu O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica*. 2015; 25(2): 177-92.
23. Arunkumar S., Arunkumar J. S., Krishna N.B., Shakunthala G.K. Developments in diagnostic applications of saliva in oral and systemic diseases - A comprehensive review. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2014; 3(3): 372-87.
24. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G. Comparison of different approaches to the determination of products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 1: 127-31. (in Russian)
25. Clinical biochemistry. Collection of instructions. Novosibirsk: ZAO «Vektor-Best». 2011. (in Russian)
26. GavriloV.V.B., Bidula M.M., Furmanchuk D.A., Konev S.V., Aleynikova O.V. Assessment of organism intoxication due to imbalance between the accumulation and binding of toxins in plasma. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 2: 13-7. (in Russian)
27. Sirota T.V. Participation of carbonate / bicarbonate ions in the superoxide of the generating reaction of autooxidation of adrenaline. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015; 61(1): 115-24. (in Russian)
28. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., TokarevV.Ye. Method for determination of catalase activity. *Laboratornoye delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
29. Kondrakhin I.P. Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics: reference book. M.: Kolos, 2004. (in Russian)
30. Bel'skaya L.V., Sarf Ye.A., Kosenok V.K., Massard ZH. Antioxidant activity of mixed human saliva is normal. *Ekologiya cheloveka*. 2017; 6: 36-40. (in Russian)
31. Hultqvist M., Hegbrant J. Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde is markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clinical Nephrology*. 1997; 47(1): 37-46.
32. Smriti K., Pai K.M., Ravindranath V., Pentapati K.C. Role of salivary malondialdehyde in assessment of oxidative stress among diabetics. *Journal of oral biology and craniofacial research*. 2016; 6(1): 42-5.
33. Su H., Gornitsky M., Velly A.M., Yu H., Benarroch M., Schipper H.M. Salivary DNA, lipid, and protein oxidation in nonsmokers with periodontal disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 46: 914-21.
34. Rai B., Kharb S., Jain R., Anand S.C. Salivary lipid peroxidation product malondialdehyde in precancer and cancer. *Advanced in Medical and Dental Science*. 2008; 2(1): 7-8.
35. Shivashankara A.R., Kavya P.M. Salivary total protein, sialic acid, lipid peroxidation and glutathione in oral squamous cell carcinoma. *Biomedical Research*. 2011; 22 (3): 355-9.
36. Ji C., Rouzer C.A., Marnett L.J., Pietsenpol J.A. Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 1275-83.
37. Schonberg SA, Rudra PK, Noding R, Skorpen F, Bjerve KS, Krokan HE. Evidence that changes in Se-glutathione peroxidase levels affect the sensitivity of human tumor cell lines to n-3 fatty acids. *Carcinogenesis*. 1997; 18: 1897-904.
38. Iwasaki M, Ogawa J, Inoue H, Kijima H, Watanabe K. Immunohistochemical properties of lipid peroxidation and prognosis in adenocarcinoma of the lung. *J Cardiovas.c Surg*. 1998; 39: 233-6.
39. Nowak D., Janczak M. Effect of chemotherapy on serum end-products of lipid peroxidation in patients with small cell lung cancer: Association with treatment results. *Respiratory Medicine*. 2006; 100: 157-66.
40. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Review*. 2012; 70(5): 257-65.

41. Sotgia F, Martinez-Outschoorn U.E., Lisanti M.P. Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis. *BMC Medicine*. 2011; 9: 62.
42. Gerasimenko M.N., Zukov R.A., Titova N.M., Dykhno YU.A., Modestov A.A., Popov D.V. Antioxidant system and markers of oxidative stress in kidney cancer. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal*. 2012; 5(53): 40-3. (in Russian)
43. Ho JC, Chan-Yeung M, Ho SP, Mak JCW, Ip MSM, Ooi GC, Wong MP, Tsang KW, Lam WK. Disturbance of systemic antioxidant profile in nonsmall cell lung carcinoma. *Eur. Respir J*. 2007; 29: 273-8.
44. Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 8578-85.
45. Wei P.F., Ho K.Y., Ho Y.P., Wu YM, Yang YH, Tsai CC. The investigation of glutathione peroxidase, lactoferrin, myeloperoxidase and Interleukin-1beta in gingival crevicular fluid: implications for oxidative stress in human periodontal diseases. *J. Periodontal Res*. 2004; 39(5): 287-93.
46. Ihalin R., Loimaranta V., Tenovuuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006; 445:261-8.
47. Whiteman M, Spencer JP, Jenner A, Halliwell B. Hypochlorous acid-induced DNA base modification: potentiation by nitrite: biomarkers of DNA damage by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257: 572-6.
48. Van Schooten FJ, Boots AW, Knaapen AM, Godschalk RW, Maas LM. Myeloperoxidase (MPO) -463G->A reduces MPO activity and DNA adduct levels in bronchoalveolar lavages of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13: 828-33.
49. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 2000; 275: 5425-30.
50. Mika D, Guruvayoorappan C. Myeloperoxidase: the yin and yang in tumour progression. *J Exp Ther Oncol*. 2011; 9: 93-100.
51. Cha M.K., Kim I.H. Glutathione-linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1996; 222(2): 619-25.
52. Quinlan G.J., Mumby S., Martin G.S., Bernard GR, Gutteridge JM, Evans TW. Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Crit. Care. Med*. 2004; 32(3): 755-9.
53. Frei E. Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells. *Diabetology&MetabolicSyndrome*. 2011; 3:11. <http://www.dmsjournal.com/content/3/1/11>
54. Sheybak V.M. Transport function of serum albumin: zinc and fatty acids. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2015; 14(2): 16-22. (in Russian)
55. Oetl K., Stauber R.E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol*. 2007; 151(5): 580-590.
56. Smolyakova R.M., Prokhorova V.I., Zharkov V.V., Lappo S.V. Assessment of binding ability and transport function of serum albumin in patients with lung cancer. *Novosti khirurgii*. 2005; 13(1-4): 78-84. (in Russian)
57. Astashkin A.V., Kozlyuk V.V., Raitsimring A.M. ESEEM measurements with time-resolved detection of the entire ESE signal shape. *J. Magn. Reson*. 2000; 145(2): 357-63.
58. Galunskaya B., Paskalev D., Yankova T., Chankova P. Two-faced Janus biochemistry: uric acid - an oxidant or an antioxidant? *Nefrologiya*. 2004; 4 (8): 25-31.(in Russian)
59. Christen S., Biffrare Y., Siegenthaler C., Leib S.L., Tauber M.G. Marked elevation in cortical urate and xanthineoxidoreductase activity in experimental bacterial meningitis. *Brain Res*. 2001; 900: 244-51.
60. Koprash S., Richter K., Leonardt W. Urate attenuates oxidation of native low-density lipoprotein by hydrochlorite and the subsequent lipoprotein-induced respiratory burst activities of polymorphonuclear leukocytes. *Molec. Cell Biochem*. 2000; 206: 51-6.

Поступила 08.05.18

Принята к печати 25.05.18

Волкова А.Р., Дыгун О.Д., Катышева Н.С., Бондаренко В.Л., Мальцева М.Н., Белякова Л.А., Эмануэль В.Л.

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИНТЕРПРЕТАЦИИ РЕФЕРЕНТНЫХ ИНТЕРВАЛОВ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ГИПОФИЗА В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ МЕГАПОЛИСА СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия

Распространённость субклинического гипотиреоза (СГ) велика и по данным различных исследований составляет от 3 до 21%. В Российской Федерации к настоящему моменту не существует крупных эпидемиологических исследований по оценке функционального состояния щитовидной железы. Представляется актуальным изучение уровня тиреотропного гормона (ТТГ) гипофиза у больных, обратившихся за помощью в клинические подразделения крупного стационара Северо-Западного региона для определения распространённости дисфункции щитовидной железы у больных разного пола и возраста. Обследовано 5303 больных, обратившихся в клиники ПСПбГМУ за 2017 г. У всех больных определяли уровень ТТГ и тироксина (T_4) свободного (T_4 св.). СГ считали повышение уровня ТТГ более 4,0 мМЕ/л при нормальном уровне T_4 св. Пациенты были разделены на группы по возрасту и уровню ТТГ в соответствии с существующими рекомендациями. Среди обследованных было 29,26% мужчин и 70,73% женщин. Средний возраст был $55,08 \pm 17,07$ года. Уровень ТТГ имел ненормальное распределение и в среднем составил 2,77 мМЕ/л (медиана ТТГ 1,73 мМЕ/л). У женщин уровень ТТГ был значимо выше во всех изучаемых группах больных ($p = 0,0001$). Среди женщин выявлены значимые различия по уровню ТТГ между группами пожилых и молодых больных ($p = 0,015$). Встречаемость СГ в общей группе больных 10,1%. У обследованных мужчин встречаемость СГ 7,3%, а в группе женщин – 11,3%. В группе пожилых больных частота СГ у женщин была в 2 раза выше, чем у мужчин. В большинстве (77,4%) случаев у больных с СГ уровень ТТГ находился в диапазоне 4,0–6,9 мМЕ/л. Клиническая значимость минимальной тиреоидной недостаточности требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: щитовидная железа; субклинический гипотиреоз; тиреотропный гормон гипофиза.

Для цитирования: Волкова А.Р., Дыгун О.Д., Катышева Н.С., Бондаренко В.Л., Мальцева М.Н., Белякова Л.А., Эмануэль В.Л. Методические аспекты интерпретации референтных интервалов тиреотропного гормона гипофиза в многопрофильном стационаре мегаполиса Северо-Западного региона. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 538-542. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-538-542>.

Volkova A.R., Dygun O.D., Katyshcheva N.S., Bondarenko V.L., Maltseva M.N., Belyakova L.A., Emanuel V.L.

METHODOLOGICAL ASPECTS OF INTERPRETATION OF THYROID-STIMULATING HORMONE REFERENCE INTERVALS IN THE NORTHWEST REGION MEGAPOLIS HOSPITAL

FSBEI HE «Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University» of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, 197022, Saint Petersburg, Russia

The prevalence of subclinical hypothyroidism (SH) is large and according to various studies is from 3 to 21%. In the Russian Federation to date, there are no major epidemiological studies assessing the functional state of the thyroid gland. It seems relevant to study the TSH level in patients who turned to the clinical units of a large hospital in the North-West region to determine the prevalence of thyroid dysfunction in patients of different sex and age. 5,303 patients were examined, who applied to the I.P. Pavlov SPbSMU clinics for 2017. In all patients the level of TSH and free T_4 was determined. SH was considered to increase the level of TSH more than 4.0 mIU/L at a normal level of free T_4 . Patients were divided into groups by age and TSH level in accordance with existing recommendations. Among the examined patients were 29.26% of men and 70.73% of women. The mean age was 55.08 ± 17.07 years. The TSH level had an abnormal distribution and averaged 2.77 mIU/L (TSH median 1.73 mIU/L). In women the level of TSH was significantly higher in all studied groups of patients ($p = 0.0001$). Among women, significant differences in the level of TSH between the elderly and young patients ($p = 0.015$) were found. The incidence of SH in the total group of patients was 10.1%. In the men surveyed, the incidence of SH was 7.3%, and in the female group - 11.3%. In the elderly patients, the incidence of subclinical hypothyroidism in women was 2 times higher than that of men. In most cases (77.4%) in patients with SH, the TSH level was in the range of 4.0-6.9 mIU / L. The clinical significance of minimal thyroid insufficiency requires further study.

Key words: thyroid gland, subclinical hypothyroidism, thyroid-stimulating hormone.

For citation: Volkova A.R., Dygun O.D., Katyshcheva N.S., Bondarenko V.L., Maltseva M.N., Belyakova L.A., Emanuel V.L. Methodological aspects of interpretation of thyroid-stimulating hormone reference intervals in the Northwest region megapolis hospital. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (9): (in Russ.) 538-542. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2018-63-9-538-542>.

For correspondence: Volkova A.R., Doctor of Medical Sciences, Professor of the Faculty therapy department with the course of endocrinology, cardiology and functional diagnostics with the clinic; e-mail: volkovaa@mail.ru

Information about authors:

Volkova A.R., <http://orcid.org/0000-0002-5189-9365>

Dygun O.D., <http://orcid.org/0000-0001-8991-0323>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.05.2018
Accepted 13.06.2018

Для корреспонденции: Волкова Анна Ральфовна, докт. мед. наук, проф. каф. терапии факультетской с курсом эндокринологии, кардиологии и функциональной диагностики с клиникой; e-mail: volkovaa@mail.ru

Введение. Распространённость субклинического гипотиреоза (СГ) в популяции достаточно высока и зависит от пола, возраста, расы и региона проживания [6]. Так, в Великобритании наблюдалось 2779 человек в течение 20 лет (Whickham survey). Распространённость СГ была 8,0% в общей группе обследованных и у 10,0% женщин старше 55 лет. У мужчин СГ был выявлен в 3,0% случаев [24]. В исследование, проводившееся в Колорадо, было включено 25 682 жителей США. Распространённость СГ составила 9,0% среди взрослого населения. Процент людей с повышенным уровнем тиреотропного гормона (ТТГ) гипофиза был большим среди женщин (4–21) в сравнении с мужчинами (3–16) во всех возрастных группах [7]. В Фремингемском исследовании СГ выявлен у 9,5% обследованных (уровень ТТГ более 5,0 мМЕ/л) [21]. В Healthy Aging Study выявляемость субклинического гипотиреоза была 12,4% (уровень ТТГ > 4,5 мМЕ/л, средний возраст обследованных 74,7 года) [18]. В Роттердамское исследование [15] было включено 11 149 женщин старше 60 лет. Субклинический гипотиреоз выявлен у 10,8% обследованных женщин. Впервые было показано, что субклинический гипотиреоз – независимый фактор риска сердечно-сосудистых событий.

До настоящего времени однозначно не решено, какой диапазон значений ТТГ принимать за нормальный уровень. В общей популяции распространённость различных концентраций ТТГ в крови характеризуется ненормальным распределением [5]: у 70 – 80% людей уровень ТТГ находится между 0,3–2,0 мМЕ/л, при этом у 97% он менее 5,0 мМЕ/л [11]. Согласно существующим рекомендациям [4], нормальным следует считать уровень ТТГ 0,4–4,0 мМЕ/л.

По данным эпидемиологических исследований, у лиц старшей возрастной группы часто выявляется повышение уровня ТТГ. В исследовании NHANES III (1988–1994) показано [22], что у лиц старше 70 лет частота выявления СГ составила 15,1% (проанализирована популяция 16 533 человека, СГ считали повышение уровня ТТГ более 4,5 мМЕ/л). При дальнейшем анализе были исключены носители антитиреоидных антител. Размер выборки составил 14 376 человек, 9,9% людей старше 70 лет имели уровень ТТГ выше 4,5 мМЕ/л. Для лиц старше 60 лет 97,5% перцентиль ТТГ составил 7,49 мМЕ/л, у 70% популяции старше 80 лет ТТГ находился в диапазоне 4,5–7,49 мМЕ/л. Также было показано, что в 30% случаев повышение уровня ТТГ с возрастом не зависит от наличия антитиреоидных антител.

Клиническая значимость скрытых нарушений функции щитовидной железы до сих пор оспаривается. Известно, что гипотиреоз ассоциирован с атерогенной дислипидемией [10], гипергомоцистеинемией [9], диастолической дисфункцией миокарда, нарушением синтеза и секреции оксида азота, уменьшением синтеза структурных белков миокарда [2, 17]. Однако значение умеренного повышения уровня ТТГ в плане сердечно-сосудистых исходов доказано для уровня ТТГ > 7,0 мМЕ/л. Так, по результатам крупного метаанализа 18 исследований (73 000 больных) было показано, что риск сердечно-сосудистой смертности и сердечной недостаточности увеличивался при уровне ТТГ > 7,0 мМЕ/л. Уровень ТТГ от 0,45 до 6,99 мМЕ/л не был ассоциирован с неблагоприятными сердечно-сосудистыми исходами [12]. В большинстве случаев у больных субклиническим гипотиреозом выявляют умеренное повышение уровня ТТГ от 4,0 до 7,0 мМЕ/л. Таким образом, клиническая

значимость минимальной тиреоидной недостаточности, особенно у пожилых лиц, до сих пор не определена.

В настоящее время большинство специалистов считают, что скрининговое определение уровня ТТГ в общей популяции дорого и экономически нецелесообразно. В то же время симптомы гипотиреоза, как правило, неспецифичны, и отсутствие явной симптоматики не исключает наличия гипотиреоза у конкретного больного по лабораторным данным [4]. Поэтому «агрессивный поиск новых случаев гипотиреоза» рекомендуется пациентам с наличием высокого риска развития гипотиреоза [4]. Большинство специалистов считают необходимым скрининговое определение уровня ТТГ всем больным, обратившимся за медицинской помощью. Поэтому в литературе последних лет приводятся результаты анализов баз данных о функциональном состоянии щитовидной железы среди пациентов крупных госпиталей и амбулаторного звена. Так, в исследовании, проведенном в Бирменгеме (Великобритания) [19], была использована база данных учреждений первичного звена. В исследование было включено 1210 пациентов старше 60 лет, которые обратились за помощью. Выявляемость СГ составила 11,6% среди женщин и 2,9% среди мужчин. По результатам исследования, проведенного на базе эндокринологического подразделения Jinnah Postgraduate Medical Centre, было проанализировано 4448 историй болезней. У 9,42% пациентов выявлен СГ [13].

У пациентов старших возрастных групп (старше 85 лет) наличие СГ и терапия левотироксином не влияют на прогноз [14]. Показатели смертности от сердечно-сосудистых заболеваний и общая смертность не увеличивались у пациентов старческого возраста с умеренным повышением уровня ТТГ в Cardiovascular Health Study [16]. Более того, заместительная терапия левотироксином у пожилых пациентов при умеренном повышении уровня ТТГ не была ассоциирована с какими-либо преимуществами в плане сердечно-сосудистых исходов [20]. Это свидетельствует о том, что у пациентов старших возрастных групп повышение уровня ТТГ, возможно, является физиологическим. Это может быть связано со снижением биологической активности ТТГ или патологическим гликозилированием молекулы ТТГ, снижением активности дейодиназы 2-го типа [8]. В связи с этим в литературе обсуждается вопрос о некотором повышении нормативов ТТГ для лиц старшей возрастной группы [3, 20, 23., 25.].

В настоящее время в Санкт-Петербурге не представлены какие-либо данные эпидемиологических наблюдений по проблеме субклинического гипотиреоза. Поэтому представляется актуальным обследование большой когорты больных, проживающих в регионе пограничного йодообеспечения [1], на примере крупного многопрофильного госпиталя для определения встречаемости СГ, ассоциации СГ с полом, возрастом обследованных больных. Представляется важным определить соотношение больных с нормальным, пограничным и повышенным уровнем ТТГ гипофиза.

Цель исследования – определить уровень ТТГ гипофиза у больных, обратившихся за помощью в клинические подразделения ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, а также распространённость дисфункции щитовидной железы у больных разного пола и возраста

Материал и методы. В исследование включено 5303 пациента различных клинических подразделений ПСПбГМУ за 2017 г. Исследование одобрено Этиче-

Таблица 1

Медиана ТТГ гипофиза у больных различных возрастных групп

Группа больных	Число больных		Медиана ТТГ, мМЕ/л
	абс.	%	
0	359	6,78	1,87
1	982	18,54	1,64
2	1537	29,03	1,66
3	1735	32,77	1,75
4	659	12,45	1,90
5	23	0,43	1,84
Всего	5295	100,00	

ским комитетом ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Все больные подписали информированное согласие по процедурам обследования в клиниках ПСПбГМУ. Всем больным проводили скрининговое определение уровня ТТГ. При повышении уровня ТТГ > 4,0 мМЕ/л у больных определяли уровень свободного тироксина (Т₄ св.). Субклиническим гипотиреозом считали уровень ТТГ > 4,0 мМЕ/л при нормальном уровне Т₄ св. Для анализа распределения по полу и возрасту обратившихся за помощью больных использовали базу данных клинических подразделений ПСПбГМУ (QMS). Уровень ТТГ определяли методом ИФА реагентами 3-го поколения с использованием анализатора Beckman Coulter. При измерении с помощью данной методики ложно завышенные уровни ТТГ (макро-ТТГ) автоматически не учитывались. За нормальный уровень ТТГ принимались значения от 0,50 до 2,4 мМЕ/л (группа 1). Уровень ТТГ менее 0,5 мМЕ/л соответствовало низкому значению ТТГ (группа 0). Уровень ТТГ от 2,5 до 4,0 мМЕ/л соответствовал пограничному значению (группа 2). Уровень ТТГ более 4,0 мМЕ/л соответствовал субклиническому гипотиреозу при условии нормального уровня Т₄ св. (группа 3). Уровень Т₄ св. определяли при помощи ACCESS® IMMUNOASSAY SYSTEMS. Референсный интервал для Т₄ св. был 7,8 – 14,3 пмоль/л. Уровень ТТГ более 10,0 мМЕ/л считали манифестным гипотиреозом (группа 4). В соответствии с классификацией ВОЗ использовали градацию больных по возрасту: группа 0 – юный возраст (18–24 года), группа 1 – молодой возраст (25–44 года), группа 2 – средний возраст (45–59 лет), группа 3 – пожилой возраст (60–74 года), группа 4 – старческий возраст (75–89 лет) и группа 5 – долгожители (90 лет и старше). Для статистической обработки данных использовали программный пакет Statistica версия 12. Несмотря на большой объем выборки, исследуемые параметры имели ненормальное

распределение (негауссовское) в соответствии с критериями Колмогорова – Смирнова, поэтому использовались непараметрические критерии Манна – Уитни в случае двух переменных и критерии Краскела – Уоллеса в случае трех группирующих и более. Различия считали значимыми при уровне $p < 0,05$. Категориальные данные описаны с помощью частот и процентов. Для анализа использовались таблицы сопряженности и методы χ^2 или чувствительный критерий Фишера в случае малого числа наблюдения.

Результаты. Среди обследованных больных мужчин было 1554 (29,26%) и женщин 3749 (70,73%). Уровень ТТГ был от 0,00 до 100,00 мМЕ/л и в среднем составил 2,77 мМЕ/л. Медиана ТТГ составила 1,73 (1,10–2,75) мМЕ/л. В общей группе больных 2,5-й и 97,5-й перцентили составили 0,14 и 9,78 мМЕ/л соответственно.

У мужчин средний уровень ТТГ был равен $2,47 \pm 0,15$ мМЕ/л. Медиана ТТГ составила 1,55 мМЕ/л. У женщин средний уровень ТТГ был $2,88 \pm 0,09$ мМЕ/л, медиана 1,83 мМЕ/л. У женщин уровень ТТГ был значимо выше во всех изучаемых группах больных ($p = 0,0001$) (см. рисунок).

Возраст обследованных больных варьировал от 18,00 до 94,00 лет и в среднем составил $55,08 \pm 17,07$ лет.

У мужчин средний возраст был $55,11 \pm 16,59$ года, у женщин – $55,07 \pm 17,26$ года. Группы мужчин и женщин сопоставимы по возрасту, каких-либо значимых различий не выявлено.

Распределение больных по возрасту представлено в табл. 1.

Была изучена корреляционная зависимость между уровнем ТТГ и возрастом обследованных больных: линейной зависимости выявлено не было, но значения ТТГ в некоторых возрастных группах значимо различались.

При использовании непараметрических методов статистического анализа были выявлены значимые различия между уровнем ТТГ и возрастом обследованных больных ($p = 0,003$). Так, в группе молодых пациентов (группа 1) и в группе старческого возраста (группа 4) медиана ТТГ составила 1,64 мМЕ/л (среднее значение 2,4 мМЕ/л) и 1,75 мМЕ/л (среднее значение 2,8 мМЕ/л) соответственно ($p = 0,018$). Группа среднего возраста (группа 2) и группа пациентов старческого возраста (группа 4) также значимо различались по уровню ТТГ. Медиана ТТГ в группе 2 составила 1,66 мМЕ/л (среднее значение 2,7 мМЕ/л), а в группе 4 – 1,75 мМЕ/л (среднее значение 2,8 мМЕ/л) соответственно ($p = 0,009$). Таким образом, группа больных старческого возраста по уровню ТТГ значимо отличалась от пациентов молодого и среднего возраста.

Проанализирована зависимость между возрастом

Таблица 2

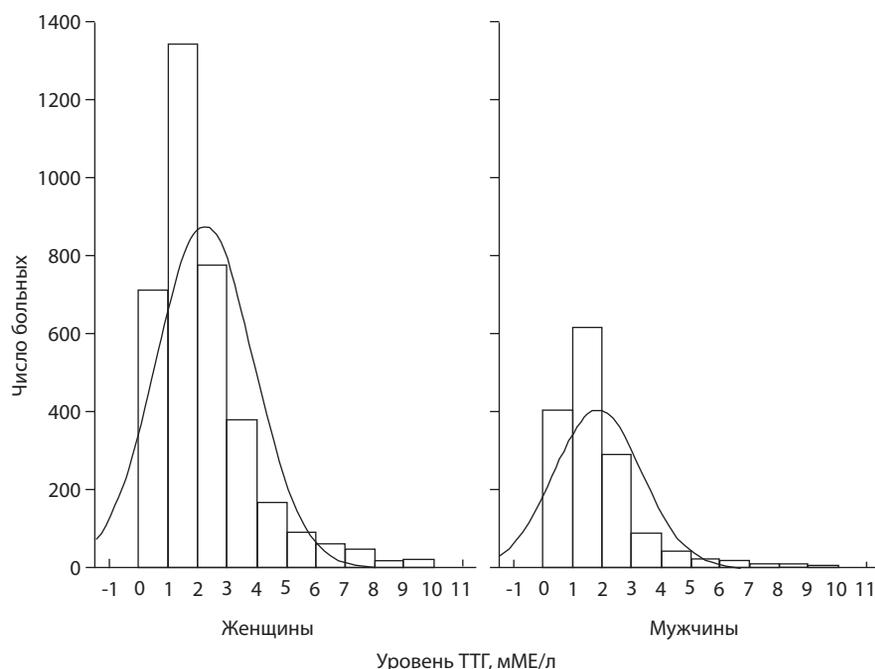
Распределение обследованных больных в зависимости от уровня ТТГ гипофиза

Группа больных по уровню ТТГ	Число больных		Мужчины		Женщины	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
0 (< 0,5 мМЕ/л)	353	6,78	121	34,3	232	65,7
1 (0,5–2,4 мМЕ/л)	3384	63,96	1091	32,2	2293	67,76
2 (2,5–3,9 мМЕ/л)	877	16,68	189	21,5	688	78,5
3 (4,0–10,0 мМЕ/л)	530	10,12	112	21,13	418	78,87
4 (> 10,0 мМЕ/л)	124	2,46	28	22,6	96	77,4

Таблица 3

Распределение больных по уровню ТТГ в группах мужчин и женщин

Группа больных (уровень ТТГ, мМЕ/л)	Мужчины, %	Женщины, %	p
Группа 0 (< 0,5)	7,1	6,2	0,05
Группа 1 (0,5–2,4)	70,8	61,5	0,05
Группа 2 (2,5–3,9)	12,3	18,5	0,05
Группа 3 (4,0–10,0)	7,3	11,2	0,0001
Группа 4 (> 10,0)	1,8	2,6	0,0001
Всего	100	100	



Распределение уровня тиреотропного гормона гипофиза в группе обследованных мужчин и женщин. На оси ординат вместо количество написать число, и убрать, на оси абсцисс после ТТГ поставить запятую и убрать скобки мМЕ/л.

больных и уровнем ТТГ в группах мужчин и женщин. У мужчин каких-либо значимых различий в уровне ТТГ между возрастными группами не выявлено. Среди женщин выявлены значимые различия по уровню ТТГ между группой пожилых (группа 3) и молодых (группа 1) больных ($p = 0,015$).

Уровень ТТГ анализировали в соответствии с существующими рекомендациями (как указано ранее).

Группу 3 (уровень ТТГ от 4,0 до 10,0 мМЕ/л) считали субклиническим гипотиреозом при наличии нормального уровня T_4 св. Распределение больных по группам в соответствии с уровнем ТТГ представлено в табл. 2.

Как видно из представленных данных, у большинства (63,96%) больных уровень ТТГ находился в диапазоне нормальных значений, у 16,68% больных уровень ТТГ находился в диапазоне пограничных значений, 10,12% больных имели СГ и у 2,46% обследованных больных был выявлен манифестный гипотиреоз.

Выявлена высокозначимая зависимость между уровнем ТТГ и полом обследованных больных. У женщин повышение уровня ТТГ встречалось значимо чаще. В группах с повышенным уровнем ТТГ (группа 3 и 4 по уровню ТТГ) число женщин было значимо больше ($p = 0,0001$).

Распределение пациентов по уровню ТТГ в группах мужчин и женщин также значимо ($p = 0,0001$) различалось (табл. 3).

Как видно из представленных данных, частота субклинического гипотиреоза (ТТГ от 4,0 до 10,0 мМЕ/л) была значимо выше у женщин (11,2%), чем у мужчин (7,3%) ($p = 0,0001$).

Таким образом, уровень ТТГ был значимо выше у женщин, и повышение уровня ТТГ у женщин чаще выявляли в старших возрастных группах. У мужчин уровень ТТГ в целом был значимо ниже, чем у женщин, и значимых возрастных различий выявлено не было.

При расчёте отношения шансов с использованием метода логистической регрессии было показано, что риск субклинического гипотиреоза у женщин выше в 1,78 раза (ОШ 1,78, 95% ДИ 1,42–2,21). Пожилой возраст также был сопряжён с увеличением риска СГ. Так, у пациентов пожилого возраста (группа 3 по возрасту) по сравнению с молодыми пациентами (группа 1 по возрасту) риск СГ составил 1,49 (ОШ 1,49, 95% ДИ 1,13–1,97). В группе пожилых женщин (группа 3 по возрасту) риск субклинического гипотиреоза был 1,6 (ОШ 1,60, 95% ДИ 1,18–2,17). Таким образом, повышение уровня ТТГ и частота СГ в обследованной выборке больных была ассоциирована с женским полом и пожилым возрастом пациентов.

Представлялось актуальным изучить распределение уровня ТТГ в группе больных с СГ. Как указывалось ранее, у большинства больных с СГ наблюдается повышение уровня ТТГ от 4,0 до 7,0 мМЕ/л [9]. Более того, по результатам проспективных

наблюдений повышение уровня ТТГ более 7,0 мМЕ/л имеет клиническую значимость и ассоциировано с неблагоприятными сердечно-сосудистыми исходами [12]. Поэтому среди больных с СГ была выделена группа больных с уровнем ТТГ от 4,0 до 6,9 мМЕ/л. Было показано, что у 77,4% больных ($n = 410$) уровень ТТГ находится в интервале 4,0–6,9 мМЕ/л.

В группе пожилых женщин (группа 3 по возрасту) частота выявления СГ составила 13,34%, а в группе пожилых мужчин (группа 3 по возрасту) она составила 6,10%. Таким образом, встречаемость СГ у женщин пожилого возраста была в 2 раза выше по сравнению с мужчинами пожилого возраста. У мужчин старческого возраста и долгожителей (группа 4 и 5 по возрасту) СГ выявлялся в 15,38 и 14,29% случаев соответственно.

Обсуждение. В Санкт-Петербурге впервые представлены данные обследования функционального состояния щитовидной железы у больных крупного госпиталя. Была показана высокая встречаемость СГ среди обследованных больных. Уровень ТТГ гипофиза значимо различался у обследованных женщин и мужчин различного возраста. У большинства больных с СГ отмечается умеренное повышение уровня ТТГ – до 7,0 мМЕ/л. Поскольку клиническая значимость и влияние на сердечно-сосудистые исходы небольшого повышения уровня ТТГ – до 7,0 мМЕ/л – не доказаны, выявляется все больше оснований для пересмотра верхней границы нормы ТТГ для пожилых больных. По мнению ряда авторов [5], небольшое повышение уровня ТТГ у больных пожилого и старческого возраста не влияет на прогноз. Небольшое повышение ТТГ, возможно, является физиологическим и связано либо с гликозилированием молекулы ТТГ, либо с уменьшением активности дейодиназы 2-го типа в гипофизе. Клиническая значимость минимальной тиреоидной недостаточности требует дальнейшего изучения.

Выводы

Уровень ТТГ имеет ненормальное распределение.

Уровни ТТГ значительно различаются у мужчин и женщин разного возраста. Повышение уровня ТТГ было ассоциировано с женским полом и старшим возрастом.

Встречаемость субклинического гипотериоза в общей группе больных была 10,1%, у обследованных мужчин – 7,3%, у женщин – 11,3%. В группе пожилых больных частота субклинического гипотериоза у женщин была в 2 раза выше, чем у мужчин.

У 77,4% больных с субклиническим гипотериозом уровень ТТГ был в диапазоне 4,0–6,9 мМЕ/л.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5–25 см. REFERENCES)

1. Дора С.В., Красильникова Е.И., Волкова А.Р., Кравцова В.Д., Шляхто Е.В. Результаты эпидемиологического исследования по оценке йодного обеспечения Санкт-Петербурга. *Клиническая и экспериментальная тиреологическая*. 2011; 7(3): 37–41.
2. Драпкина О.М., Гегенава Б.Б., Моргунова Т.Б., Фадеев В.В. Влияние гипотериоза на сердечно-сосудистую систему. *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. 2016; 2(15): 21–30.
3. Некрасова Т.А., Стронгин Л.Г., Морозова Е.П., Дурьгина Е.М., Казакова Л.В. Модифицирующее влияние субклинического гипотериоза на течение артериальной гипертензии: взаимосвязи со скрытой неэффективностью лечения, суточным профилем артериального давления и состоянием органов-мишеней. *Клиническая и экспериментальная тиреологическая*. 2015; 11(2): 55–62.
4. Фадеев В.В. По материалам клинических рекомендаций Американской ассоциации клинических эндокринологов и Американской тиреодной ассоциации по диагностике и лечению гипотериоза у взрослых. *Клиническая и экспериментальная тиреологическая*. 2012; 8(3): 9–16.

REFERENCES

1. Dora S.V., Krasilnikova E.I., Volkova A.R., Kravtsova V.D., Shlyakhto E.V. The results of epidemiological study on the evaluation of iodine supply in St. Petersburg. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2011; 7(3): 37–41. (in Russian)
2. Drapkina O.M., Gegenava B.B., Morgunova T.B., Fadeev V.V. The influence of hypothyroidism on the cardiovascular system. *Endokrinologiya: novosti, mneniya, obuchenie*. 2016; 2(15): 21–30. (in Russian)
3. Nekrasova T.A., Strongin L.G., Morozova E.P., Durygina E.M., Kazakova L.V. Modifying effect of subclinical hypothyroidism on arterial hypertension: the relationship with hidden ineffectiveness of treatment, the daily profile of blood pressure and target organs condition. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2015; 11(2): 55–62. (in Russian)
4. Fadeev V.V. Based on the clinical recommendations of the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association for Diagnosis and Treatment of Hypothyroidism in Adults. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2012; 8(3): 9–16. (in Russian)
5. Biondi B. The normal TSH reference range: what has changed in the last decade? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98: 3584–7.
6. Braverman L.E, Cooper D. Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fun-

- damental and Clinical Text. 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2012: 628–33.
7. Canaris G.J., Manowitz N.R., Mayor G., Ridgway E.C. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch. Intern. Med.* 2000; 160(4): 526–34.
8. Cooper D.S., Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*. 2012; 379(9821): 1142–54.
9. Deicher R., Vierhapper H. Homocysteine: a risk factor for cardiovascular disease in subclinical hypothyroidism? *Thyroid*. 2002; 12(8): 733–6.
10. Duntas L.H., Brenta G. The effect of thyroid disorders on lipid levels and metabolism. *Med. Clin. North. Am.* 2012; 96(2): 269–81.
11. Fatourech V., Klee G.G., Grebe S.K., Bahn R.S., Brennan M.D., Hay I.D. et al. Effects of reducing the upper limit of normal TSH values. *JAMA*. 2003; 290: 3195–6.
12. Floriani C., Gencer B., Collet T.-H., Rodondi N. Subclinical thyroid dysfunction and cardiovascular diseases: 2016 update. *Eur. Heart. J.* 2018; 39(7): 503–7.
13. Franklyn J.A. The thyroid – too much and too little across the ages. The consequences of subclinical thyroid dysfunction. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2013; 78(1): 1–8.
14. Gussekloo J., van Exel E., de Craen A.J.M., Meinders A.E., Frolich M., Westendorp R.G.J. Thyroid status, disability and cognitive function, and survival in old age. *JAMA*. 2004; 292(21): 2591–9.
15. Hak A.E., Pols H.A., Visser T.J., Drexhage H.A., Hofman A., Witteman J.C. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann. Intern Med.* 2000; 132(4): 270–8.
16. Hyland K.A., Arnold A.M., Lee J.S., Cappola A.R. Persistent subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk in the elderly: the cardiovascular health study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98(2): 533–40.
17. Iervasi G., Pingitore A. Thyroid and Heart Failure: From Pathophysiology to Clinics. Springer Science & Business Media; 2009: 23–4.
18. Kim Y.A., Park Y.J. Prevalence and risk factors of subclinical thyroid disease. *Endocrinol. Metab. (Seoul, Korea)*. 2014; 29(1): 20–9.
19. Parle J.V., Franklyn J.A., Cross K.W., Jones S.C., Sheppard M.C. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 1991; 34(1): 77–83.
20. Razvi S., Weaver J.U., Butler T.J., Pearce S.H.S. Levothyroxine treatment of subclinical hypothyroidism, fatal and nonfatal cardiovascular events, and mortality. *Arch. Intern. Med.* 2012; 172(10): 811–7.
21. Sawin C.T., Castelli W.P., Hershman J.M., McNamara P., Bacharach P. The aging thyroid. Thyroid deficiency in the Framingham Study. *Arch. Intern. Med.* 1985; 145(8): 1386–8.
22. Surks M.I., Hollowell J.G. Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the U.S. population: Implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92(12): 4575–82.
23. Taylor P.N., Razvi S., Pearce S.H., Dayan C.M. Clinical review: A review of the clinical consequences of variation in thyroid function within the reference range. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98(9): 3562–71.
24. Tunbridge W.M., Evered D.C., Hall R., Appleton D., Brewis M., Clark F. et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 1977; 7(6): 481–93.
25. Wartofsky L., Dickey R.A. The evidence for a narrower thyrotropin reference range is compelling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90(9): 5483–8.

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.11-006.04-085.277.3]-037-07

Абакумова Т.В.¹, Генинг С.О.^{1,2}, Долгова Д.Р.¹, Генинг Т.П.¹, Антонеева И.И.^{1,2}, Полуднякова Л.В.¹,
Кузнецова Т.И.¹, Дергунова Ю.А.^{1,2}, Панченко Е.Г.¹

ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЁННЫМ РАКОМ ЯИЧНИКОВ НА ФОНЕ ХИМИОТЕРАПИИ ПО СХЕМЕ AP

¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», 432017, г. Ульяновск, Россия;

²ГУЗ «Ульяновский областной клинический онкологический диспансер», 432017, г. Ульяновск, Россия

Антиангиогенная терапия диктует необходимость поиска молекулярных маркеров ангиогенеза при раке яичников (РЯ). Диагностическая и прогностическая роль сосудистого эндотелиального фактора роста А (VEGF-A) при РЯ сегодня спорна. Цель исследования – сравнительная оценка уровня фактора роста эндотелия сосудов VEGF в сыворотке крови, цитоплазматического содержания белка и транскрипта VEGF в опухолевой ткани первичных больных с распространённым РЯ и анализ взаимосвязи этих параметров с ответом на стандартную полихимиотерапию по схеме AP. Обследованы 82 первичные больные распространённым РЯ; в контрольную группу включили 30 здоровых женщин. Все пациентки после хирургического вмешательства получали адъювантную химиотерапию по схеме AP. Уровень VEGF-A в сыворотке определяли прямым иммуноферментным анализом Human VEGF ELISA Kit («RayBiotech», США). Анализ транскрипта VEGF в опухолевой ткани проводили методом RT-PCR с применением зондов TaqMan® Gene Expression Assay («Thermo Scientific», США), нормализацию данных проводили с применением генов-рефери 18S и GAPDH. Для расчёта иммуногистохимического (ИГХ) балла цитоплазматической экспрессии VEGF проводили ИГХ-реакции в парных образцах пациенток с РЯ с применением антител («GeneTex», США). Для генотипирования ДНК пациенток использовали тест-системы по анализу функциональных полиморфизмов гена VEGFA C12143A, G634C («Синтол», г. Москва). Уровень VEGF-A в сыворотке крови больных РЯ был повышен по сравнению с нормой и зависел от ответа на химиотерапию по схеме AP. Однако специфичность этого показателя недостаточна для использования в прогностических целях. Не установлено значимых различий цитоплазматической экспрессии VEGF-A в зависимости от ответа на химиотерапию. Уровень мРНК VEGF повышен у 58% пациенток. Не выявлено корреляции между уровнями VEGF в сыворотке и транскрипта в опухолевой ткани. Генотипирование показало, что сочетание генотипов CC/GG снижает риск рецидива в 2,6 раза. Полученные результаты позволяют усомниться в ценности изучения сывороточного уровня VEGF для оценки чувствительности больных РЯ к антиангиогенным препаратам.

Ключевые слова: рак яичников; фактор роста эндотелия сосудов; химиотерапия.

Для цитирования: Абакумова Т.В., Генинг С.О., Долгова Д.Р., Генинг Т.П., Антонеева И.И., Полуднякова Л.В., Кузнецова Т.И., Дергунова Ю.А., Панченко Е.Г. Фактор роста эндотелия сосудов у больных распространённым раком яичников на фоне химиотерапии по схеме AP. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 543-548. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-543-548>

Abakumova T.V.¹, Gening S.O.^{1,2}, Dolgova D.R.¹, Gening T.P.¹, Antonееva I.I.^{1,2}, Poludnyakova L.V.¹, Kuznetsova T.I.¹, Dergunova Yu.A.^{1,2}, Panchenko E.G.¹

THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN PATIENTS WITH ADVANCED OVARIAN CANCER ON THE BACKGROUND OF CHEMOTHERAPY ACCORDING TO THE AP SCHEME

¹Ulyanovsk State University, 432017, Ulyanovsk, Russia;

²Regional Clinical Oncologic Hospital, 432017, Ulyanovsk, Russia

Antiangiogenic therapy requires to search for molecular markers of angiogenesis in ovarian cancer (OC). The diagnostic and prognostic role of VEGFA in OC is controversial today. The aim of the study was to compare the serum level of VEGF, the cytoplasmic protein content and VEGF transcript in the tumor tissue of primary patients with advanced ovarian cancer and to analyze the relationship between these parameters and the response to standard polychemotherapy using the AP scheme. 82 primary patients with advanced OC were included in the study. The control group included 30 healthy women. All patients received adjuvant chemotherapy according to the AP scheme after surgery. The serum VEGF-A level was determined by direct immunoassay analysis "Human VEGF ELISA Kit" ("RayBiotech", USA). Analysis of the VEGF transcript in tumor tissue was performed by PCR-RT using TaqMan® Gene Expression Assay (Thermo Scientific) probes, and for the data normalization the 18S and GAPDH referee genes were used. To calculate the IHC score of cytoplasmic expression of VEGF, immunohistochemical reactions were performed in paired samples of OC patients using antibodies (GeneTex, USA). For the genotyping of patients' DNA, test systems for the analysis of functional polymorphisms of the VEGF-A C12143A, G634C (LLC "Sintol", Moscow) were used. The level of VEGF-A in the serum of patients with OC was increased in comparison with the norm and depended on the response to chemotherapy according to the AP scheme. However, the specificity of this indicator is insufficient for use in prognostic purposes. There are no significant differences in the cytoplasmic expression of VEGF-A, depending on the response to chemotherapy. VEGF mRNA level was increased in 58% of patients. There was no correlation between serum VEGF levels and the transcript in the tumor tissue. Genotyping showed that the combination of genotypes of CC / GG reduces the risk of recurrence by 2.6 times. The results obtained make it possible to question the value of studying the serum level of VEGF for evaluating the sensitivity of patients with OC to anti-angiogenic drugs.

Key words: ovarian cancer; vascular endothelial growth factor; chemotherapy.

Для корреспонденции: Генинг Татьяна Петровна, д-р биол. наук, зав. каф. физиологии и патофизиологии мед. факультета им. Т.З. Биктимирова Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»; e-mail: Naum-53@yandex.ru

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

Acknowledgment. *This work was supported by Grant of the President of Russian Federation (МК-3196.2018.7).*

Information about authors:

Abakumova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-7559-5246>
Dolgova D.R., <https://orcid.org/0000-0001-5475-7031>
Antoneeva I.I., <https://orcid.org/0000-0002-1525-2070>
Kuznetsova T.I., <https://orcid.org/0000-0003-0909-734X>
Panchenko E.G., <https://orcid.org/0000-0002-9158-2522>

Gening S.O., <https://orcid.org/0000-0001-6970-6659>
Gening T.P., <https://orcid.org/0000-0002-5117-1382>
Poludnyakova L.V., <https://orcid.org/0000-0002-1096-444X>
Dergunova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-7499-2650>

Received 28.05.2018
Accepted 13.06.2018

Фактор роста эндотелия сосудов (*VEGF*) играет существенную роль в реализации ангиогенеза в яичниках в норме и при патологии [1, 2]. При взаимодействии *VEGF* с рецептором запускается каскад вторичных мессенджеров, которые активируют факторы транскрипции. В результате иницируется генетическая программа ангиогенеза [3]. Семейство *VEGF* включает 5 представителей. *VEGF-A*, он же просто *VEGF*, был охарактеризован как фактор сосудистой проницаемости, и только впоследствии была открыта его митогенная активность в отношении эндотелиоцитов. В то же время он не стимулирует пролиферацию клеток других типов, активирует протеиназы, участвующие в деградации внутриклеточного матрикса, в активации матриксных металлопротеиназ, в результате чего высвобождаются мембраносвязанные проангиогенные факторы [4]. Существует мнение, что переход опухоли из скрытого состояния в активное происходит при приобретении клетками ангиогенного фенотипа в процессе их злокачественной трансформации [5].

Неопластические сосуды в отличие от нормальных характеризуются высокой проницаемостью, хаотичностью ветвления, переплетением, отсутствием структурированности сосудистой сети [6]. Считается, что *VEGF*, повышая внутриопухолевое давление, способствует проникновению опухолевых клеток в сосудистое русло [7] и нарушает поступление цитостатиков в опухоль [8]. В ряде исследований установлена повышенная экспрессия *VEGF* при различных локализациях опухоли [9, 10]. В настоящее время нет единого мнения относительно диагностической и прогностической роли *VEGF-A* при РЯ. Некоторые авторы утверждают, что есть положительная корреляция между уровнем экспрессии *VEGF* в первичных опухолях и вероятностью рецидивов, в том числе при РЯ, и что резистентность опухоли к химиотерапии при повышении экспрессии *VEGF* увеличивается [11, 12]. В то же время существуют данные о том, что в опухолях больных РЯ III–IV стадий до начала лечения экспрессия *VEGF* отсутствовала, а неоадьювантная химиотерапия (ХТ) не влияла на уровень экспрессии *VEGF* [13]. Показано, что недостаточная чувствительность и специфичность теста на сывороточный уровень *VEGF* не позволяют рекомендовать его в качестве диагностического. Не обнаружено значимой корреляции между содержанием *VEGF* в сыворотке крови и ткани опухоли при раке почки [14].

Целью исследования была сравнительная оценка уровня *VEGF* в сыворотке крови, цитоплазматического содержания белка и транскрипта *VEGF* в опухолевой ткани первичных больных распространённым РЯ и анализ взаимосвязи этих параметров с ответом на стандартную полихимиотерапию по схеме AP.

Материал и методы. Обследованы 82 больные рас-

пространённым РЯ в возрасте 38–64 лет (медиана 53 года). У всех больных РЯ диагноз подтверждён гистологически. По гистотипу у большинства больных (68,8%) злокачественные опухоли представляли собой серозную аденокарциному, у 31,2% – эндометриоидную аденокарциному. Пациентки обследованы стандартно. Выявлен распространённый РЯ в III стадии ($n = 56$) и в IV стадии ($n = 26$). Все пациентки получали стандартную адьювантную химиотерапию по схеме AP (цисплатин плюс доксорубин) – 6 курсов после оперативного вмешательства в объёме оптимальной циторедукции. В зависимости от времени возникновения рецидива после последнего курса ХТ все пациентки были разделены на 3 группы: 1-я группа – с ранним рецидивом (до 6 мес), 2-я – с рецидивом в течение 6–12 мес и 3-я – без рецидива.

Кроме клинично-инструментального обследования (ультразвуковое исследование, компьютерная томография, гистологическое исследование биопсийного и операционного материала) у больных до начала лечения осуществляли забор крови для последующего определения концентрации *VEGF* в сыворотке и генотипирования. В контрольную группу для оценки уровня *VEGF* в сыворотке крови вошли 30 практически здоровых женщин-доноров в возрасте 23–65 лет (медиана 41 год). Исследование проведено согласно требованиям комиссии по этике Института медицины, экологии и физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» (протокол № 3 от 15.03.2015 г.).

Уровень *VEGF* в сыворотке крови, полученной до начала химиотерапии, определяли с помощью наборов реактивов для прямого иммуноферментного анализа Human VEGF ELISA Kit («RayBiotech», США) на автоматическом планшетном фотометре PLATE SCREEN («Hospitex diagnostics», Италия).

Тотальная РНК выделена из 34 парных операционных образцов первичных больных с верифицированным диагнозом РЯ. РНК выделяли методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции по P. Chomczynski & N. Sacchi (2006 г.) [15] с использованием реагента Extract RNA («Евроген», г. Москва). Реакцию обратной транскрипции проводили сразу после выделения тотальной РНК с использованием фермента обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей – MMLV-ревертазы, случайных праймеров (random hexamer) и компонентов набора MMLV RT Kit («Евроген») на амплификаторе нуклеиновых кислот CFX96 («BioRad», США). Для последующего анализа экспрессии гена *VEGF-A* методом PCR-RT использованы праймеры с зондом TaqMan® Gene Expression Assay Hs03929054_s1 («Thermo Scientific», США). Для нормализации данных в качестве генов-реферери выбраны гены *18S* (Hs99999901_s1) и *GAPDH* (Hs03929097_g1). Для постановки полимеразной цепной

Уровень *VEGF* в сыворотке крови первичных больных раком яичников

Показатель	Контроль (n = 15)	3-я группа, без рецидива (n = 20)	2-я группа, рецидив в течение 6–12 мес (n = 24)	1-я группа, рецидив в течение 6 мес (n = 27)
VEGF, нг/мл	107,71 ± 20,952 (21,503–193,918)	1092,27 ± 206,110 (21,37–2701,82)	884,40 ± 318,696 (121,8–4691,28)	602,83 ± 150,504 (45,44–2501,95)
<i>p</i>		< 0,001	< 0,001	

реакции (ПЦР) использована готовая смесь qPCRmix-HS для работы с флуоресцентными зондами, содержащая смесь рекомбинантного фермента Taq ДНК-полимеразы и моноклональных антител (1 мкл на пробу). Протокол амплификации выглядел следующим образом: 95°C – 5 мин; 95°C – 20 с; 64°C – 20 с; 72°C – 45 с (повтор 45 циклов). Канал детекции – Fam.

Расчёт относительной экспрессии гена проводили по методу Pfaffl [16].

1) Рассчитывали медиану C_t по трём повторам для целевого гена (*VEGF-A*) и референсных (*18S* и *GAPDH*);

2) далее рассчитывали ΔC_{t1} (для опухоли), ΔC_{t2} (для условной нормы) и разницу между ними – значение $\Delta\Delta C_t$;

3) относительную экспрессию рассчитывали по формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$;

4) полученные данные представляли в виде десятичного логарифма для удобства анализа.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической ЭДТА-стабилизированной крови набором «ДНК-экспресс-кровь» («Литех», г. Москва). Генотипирование полиморфизмов C12143A (rs2146323), G634C (rs2010963) *VEGF-A* осуществляли методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов производства «Синтол» на амплификаторе CFX96 с последующим анализом порогового цикла (C_t) ПЦР-продуктов по каналам Fam (норма) и Hex (мутация) на основании сигнала положительных контролей.

ИГХ-исследование материала проводили на серийных парафиновых срезах по стандартной методике с использованием поликлональных кроличьих антител к *VEGF-A* (разведение 1:800, «GeneTex», США). Высокотемпературную демаскировку антигенов осуществляли при 98°C в цитратном буфере (pH = 6,0) в течение 30 мин. В качестве детекционной системы использовали N-Histofine Simple Stain Max PO Multi («Nichirei Biosciences Inc.», Япония). В качестве положительного контроля на *VEGF* использовали ткань почки практически здорового человека. Для оценки цитоплазматической экспрессии *VEGF-A* использовали индекс метки, высчитывая процент позитивно окрашенных опухолевых клеток от общего количества в зонах с наибольшим их содержанием (позитивной считали реакцию при коричневой окраске более 10% цитоплазмы клеток). Оценка иммуногистохимических реакций (ИГХ-балл) базировалась на интенсивности окрашивания (отсутствовала, слабая, умеренная, сильная) и разделении иммунопозитивных (положительных) клеток согласно рекомендациям D.J. Dabbs («Diagnostic immunohistochemistry», 4rd Edition, 2014) в модификации [17].

Статистическая обработка результатов включала тестирование распределения частот генотипов на соответствие равновесию Харди–Вайнберга, расчёт частот генотипов регуляторных регионов гена *VEGF-A*. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к развитию

патологии и последующего исхода заболевания судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR) и его 95% доверительного интервала (95% CI). Корреляционную связь между параметрами анализировали с применением коэффициента Спирмена, статистическую достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни в программе Statistica 6.0. При изучении специфичности и чувствительности теста *VEGF* для дифференциации двух подгрупп методом ROC-анализа и расчёта безрецидивной выживаемости по методу Каплана–Майера использовали ПО Statistika 8.0. Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тест χ^2 .

Результаты. В результате проведённых исследований нами установлено, что уровень *VEGF* в сыворотке крови первичных больных РЯ значимо повышен по сравнению с таковым в контрольной группе (табл. 1).

Наиболее выраженное повышение уровня *VEGF* имело место в 1-й группе у пациенток, которые не имели рецидива в течение 6 мес после последнего курса ХТ. Его медианный уровень у больных первичным РЯ был в 10 раз выше, чем в контрольной группе. Превышение во 2-й группе, у больных с рецидивом (6–12 и более мес) и в 1-й группе, у больных с ранним рецидивом (до 6 мес) после последнего курса ХТ составило соответственно 8,2 и 5,5 раза. Таким образом, полученные результаты показали значимое увеличение количества *VEGF* в сыворотке крови больных РЯ по сравнению с контролем. Однако специфичность данного маркера недостаточна для использования его в прогностических целях (рис. 1, а, б).

В связи с этим определённый интерес представляет связь показателей *VEGF* в периферической крови с экспрессией данного фактора роста в ткани опухоли. В результате ИГХ-определения содержания *VEGF* в опухолевой ткани и гистологически неизменной ткани яичников (рис. 2, а, б) у 29 обследованных больных РЯ не удалось установить значимых различий ИГХ-балла в зависимости от ответа на ХТ по схеме AP (5,545 у пациенток без рецидива и 5,125 – у пациенток с рецидивом). Расчёт критерия χ^2 также не дал статистически значимых различий ИГХ-балла в зависимости от ответа на ХТ.

Уровень мРНК *VEGF* был повышен в опухолевой ткани по сравнению с гистологически неизменной тканью яичника у 58% пациенток. Статистически значимой корреляции между уровнем *VEGF* в сыворотке крови и экспрессией гена *VEGF* в опухолевой ткани не выявлено ($r = -0,3$; $p > 0,1$). Оценка периода безрецидивной выживаемости по уровню транскрипта *VEGF* в опухолевой ткани пациенток с РЯ после ХТ по схеме AP не выявила достоверно значимой разницы между группами с низкой и высокой экспрессией гена-мишени ($p = 0,11$) (рис. 3).

При проведении молекулярно-генетического исследования по анализу генотипов полиморфного варианта

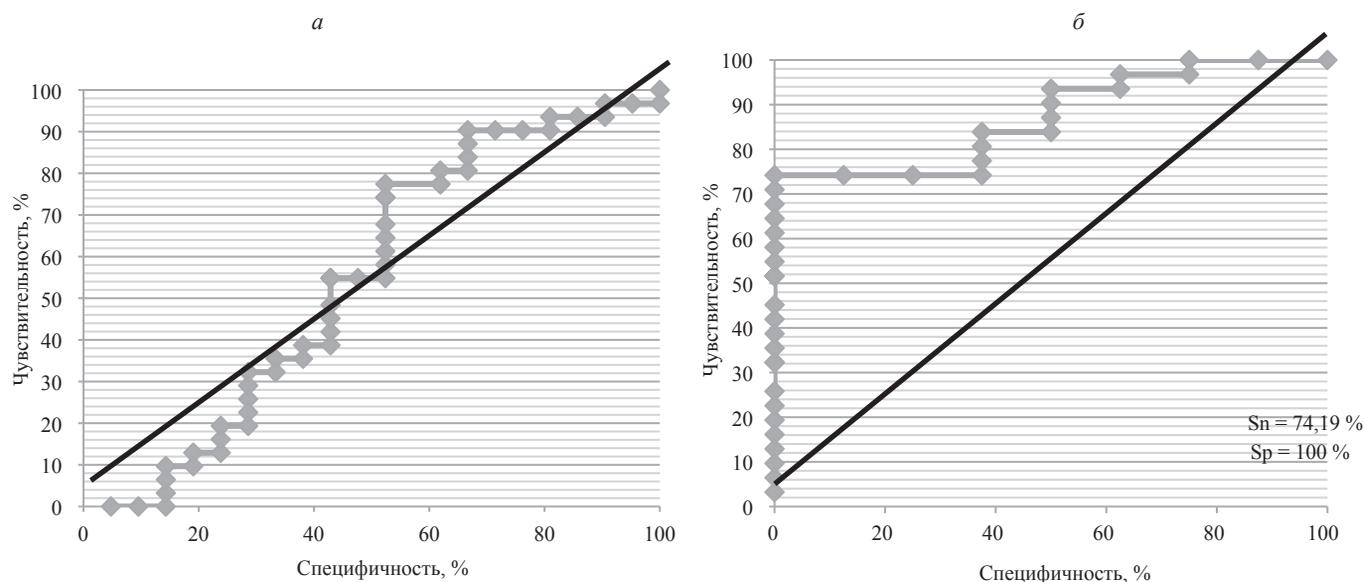


Рис. 1. Определение значимости классификатора *VEGF* при сравнении больных РЯ без рецидивов и с рецидивами в течение 6–12 мес после ХТ (а) и с контрольной группой (б) методом ROC-анализа.

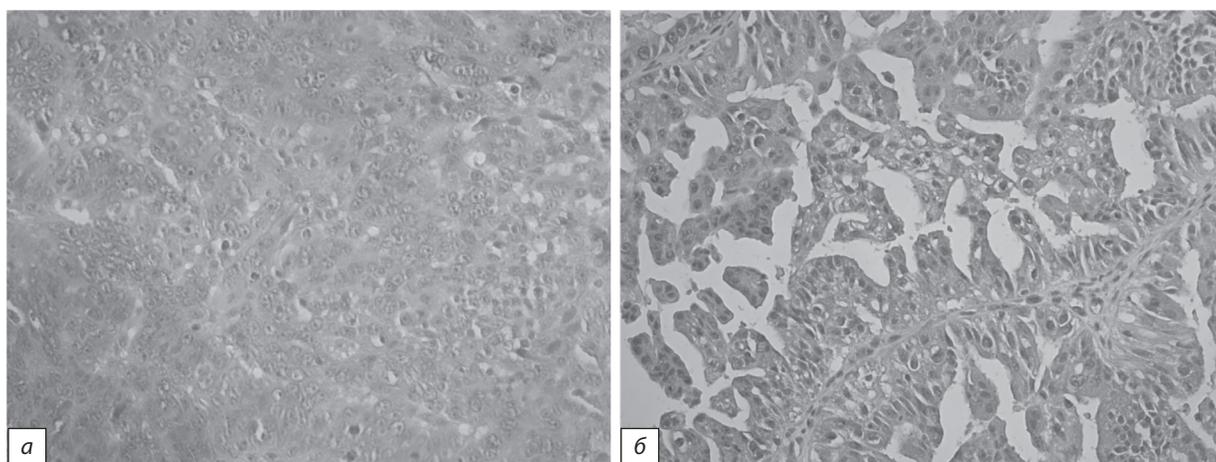


Рис. 2. Уровень экспрессии *VEGF*:

а – низкий уровень экспрессии *VEGF* в строме (ИГХ-балл 2); б – высокий уровень экспрессии *VEGF* в опухоли РЯ (ИГХ-балл 9).

rs2010963 *VEGF* нами установлено, что снижение экспрессии *VEGF*, связанное с заменой G в позиции 634 на C в промоторной части гена, выступает в качестве протективного фактора при развитии рецидива у пациенток с распространенным РЯ. Выявлено высокое отношение шансов (OR = 1,93; $p = 0,09$) в группе пациенток с РЯ с носительством аллеля C (генотипы GC/CC) и с безрецидивным периодом более 12 мес после проведения стандартной ХТ (табл. 2).

Нами также была проанализирована ассоциация однонуклеотидной замены *VEGF* C12143A (rs2146323) с проявлением ранних рецидивов в выборке пациенток с РЯ. Показано, что минорный генотип AA чаще встречается у больных РЯ в группе с рецидивом, чем в группе пациенток с безрецидивным периодом в течение 12 мес после химиотерапевтического лечения (OR = 1,29; $p = 0,87$). Проведение комплексного анализа двух генотипов *VEGF* (C12143A – G-634C) показало высокое

Таблица 2

Генотипы *VEGF*, ассоциированные с риском рецидивов у больных раком яичников после химиотерапевтического лечения по схеме AP

Полиморфизм гена <i>VEGF</i>	Генотипы	2-я группа, рецидив в течение 6–12 мес	3-я группа, пациенты с РЯ без рецидива	Отношение шансов (OR)	ДИ 95%	p
<i>VEGF</i> C-12143A rs2146323	AA	38% ($n = 21$)	30% ($n = 18$)	1,29	0,44– 3,78	0,87
<i>VEGF</i> G-634C rs2010693	GC/CC	34,3% ($n = 30$)	56,4% ($n = 24$)	1,93	0,91– 4,13	0,09
<i>VEGF</i> C-12143A: G-634C	CC-GG	27,8% ($n = 18$)	50,0% ($n = 15$)	2,60	0,52– 13,04	0,5

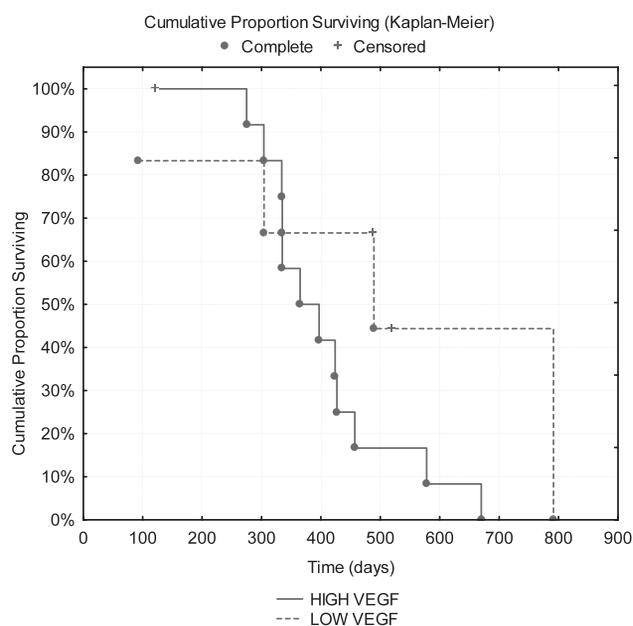


Рис. 3. Безрецидивная выживаемость по Каплану-Майеру у пациентов с РЯ в зависимости от уровня транскрипта *VEGF* в опухоли.

значение OR (OR = 2,60 при $p = 0,5$), свидетельствующее о высокой частоте встречаемости генотипов CC-GG в группе больных с РЯ без рецидивов в течение первого года после окончания адъювантной химиотерапии по схеме AP.

Обсуждение. Сравнительно недавно в обзорах результатов исследований постулировалась диагностическая и прогностическая роль циркулирующего *VEGF* у пациентов с различными типами рака [11, 12, 18]. Мы выявили значимое увеличение уровня сывороточного *VEGF* при РЯ, однако специфичность этого показателя была недостаточной для использования в прогностических целях, что также подтверждается рядом исследователей [19, 20]. При определении иммуногистохимически в опухолевой и гистологически неизменённой ткани яичника повышение уровня мРНК *VEGF* имело место только у 58% пациенток при отсутствии корреляции с уровнем *VEGF* в сыворотке крови и отсутствием значимой разницы показателей безрецидивной выживаемости между группами с низкой и высокой экспрессией гена-мишени.

Вероятно, следует согласиться с мнением авторов, утверждающих, что источником *VEGF* в периферической крови является не только его продукция тканью опухоли [14].

В ряде исследований оценивалась связь полиморфизма гена *VEGF* с риском развития и характером протекания РЯ [21, 22]. Ген *VEGF-A* у человека локализован на хромосоме 6p21.3, имеет 7 интронов и 8 экзонов и обладает около 140 полиморфизмами (SNP), которые влияют на проявление функциональной активности белка [23]. Экспериментальные данные показывают, что генетическая вариабельность в регуляторных областях гена *VEGF-A* может определять риски онкологических заболеваний, а также течение опухолевого процесса, регулируемое ангиогенезом [24]. Аллель G634C оказывает влияние на посттранскрипционном уровне, усиливая инициацию старт-кодона, приводящую к большей продукции *VEGF* [25]. Показано,

что при рефрактерном к препаратам платины РЯ при лечении бевацизумабом пациентки с генотипом СТ *VEGF* 936C/T имели лучшую медиану выживаемости PFS по сравнению с имевшими гомозиготные генотипы дикого типа (CC) и гомозиготный вариант (TT) [26]. В исследовании, проводившемся с 1985–1997 гг. с 319 первичными больными РЯ, изучена связь выживаемости с полиморфными вариантами гена *VEGF* rs833068 и rs2010963. Выявлено, что у носительниц минорного гомозиготного генотипа наблюдается значительное сокращение общей выживаемости в выборке австралийских пациенток. В эксперименте с анализом SNP *VEGF* rs3025033 и rs2146323 не выявлено статистически значимой ассоциации с выживаемостью пациенток Австралийской выборки [27]. При генотипе GG полиморфизма G-634C установлено повышение экспрессии гена *VEGF* за счёт активации промотора.

Показано, что при комбинации определённых генетических полиморфизмов *VEGF*, которые характеризуются высокой экспрессией продукта, можно предполагать/прогнозировать усиление ангиогенного ответа опухоли на стандартное лечение [25]. Мы показали, что сочетание генотипов CC/GG определяет снижение риска рецидива в 2,6 раза.

Заключение. При изучении уровня *VEGF* в сыворотке крови, генотипирования *VEGF*, цитоплазматической экспрессии и уровня мРНК *VEGF* в опухолевой ткани первичных больных РЯ и взаимосвязи этих показателей с ответом на стандартную ХТ по схеме AP установлено значимое повышение уровня *VEGF* в сыворотке крови у больных РЯ по сравнению со здоровыми. Его уровень зависел от ответа на ХТ по схеме AP. Не обнаружено значимой корреляции между уровнем *VEGF* в сыворотке крови и уровнем мРНК в опухолевой ткани. Полученные результаты позволяют предположить неопухоловое происхождение значительной части циркулирующего в крови *VEGF*, что делает сомнительной ценность исследования сывороточного *VEGF* для оценки чувствительности больных РЯ к антиангиогенным препаратам.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-3196.2018.7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–5, 7–9, 11–12, 15–19, 21–27 см. REFERENCES)

- Антонеева И.И., Петров С.Б. Опухолевые сосуды при РЯ. *Медлайн-экспресс*. 2008; 4(198): 25-7.
- Чехонин В.П., Шейн С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль *VEGF* в развитии неопластического процесса. *Вестник РАМН*. 2012; 2: 23-33.
- Михановский А.А., Харченко Ю.В., Круговая И.Н., Данилюк С.В., Щит Н.Н., Федоренко Н.В., Теплова М.А. Биомолекулярные маркеры как факторы прогноза рака яичников III-IV стадий. *Международный медицинский журнал*. 2016; 22(3): 55-8.
- Гернштейн Е.С., Колпаков А.В., Бежанова С.Д., Морозов А.А., Алфёров А.А., Огнерубов Н.А., Казанцева И.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(9): 536-41.
- Гернштейн Е.С., Кушлинский Д.Н., Терешкина И.В., Ермилова В.Д., Овчинникова Л.К., Галдава Д.Э., Кузнецова О.В. Фактор роста эндотелия сосудов и опухоли женской репродуктивной

системы. Часть 2. Рак яичников и эндометрия. *Онкогинекология*. 2015; 2: 4-11.

REFERENCES

1. Araujo V.R., Duarte A.B., Bruno J.B., Lopes Pinho C.A., Figueiredo de J.R. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ovarian physiology of mammals. *Zygote*. 2013; 21(3): 295-304.
2. Hyder S.M., Stancel G.M. Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones. *Histol Histopathol*. 2000; 15(1): 325-34.
3. Rosen L.S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*. 2002; 9: 36-44.
4. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669-76.
5. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*. 2004. 9(1): 2-10.
6. Antoneeva I.I., Petrov S.B. Tumor vessels in ovarian cancer. *Medlajnjekspress*. 2008; 4(198): 25-27. (in Russian)
7. Lee T.H., Avraham H.K., Jiang S., Avraham S. Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *J. Biol. Chem*. 2003; 278(7): 5277-84.
8. Jain R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapt. *Nat Med*. 2001; 7(9): 987-9.
9. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in anti-angiogenic therapy. *Science*. 2005; 307(5706): 58-62.
10. Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Vestnik RAMN*. 2012; 2: 23-33. (in Russian)
11. Poon R.T., Fan S.T., Wong J. Clinical implications of circulating angiogenesis factor in cancer patients. *J.Clin.Oncol*. 2001; 19(4): 1207-25.
12. Toi M., Matsumoto T., Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive and therapeutic implications. *Lancet Oncol*. 2001; 2(11): 667-73.
13. Mikhanovskiy O.A., Kharchenko Yu.V., Krupova I.M., Danyliuk S.V., Shchyt N.N., Fedorenko N.V., Teplova M.A. Biomolecular markers as factors of prognosis of stage 3-4 ovarian cancer. *Mezhdunarodnyj meditsinskiy zhurnal*. 2016; 22(3): 55-8. (in Russian)
14. Gernshtein E.S., Kolpakov A.V., Bezhanova S.D., Morozov A.A., Alferov A.A., Ognerubov N.A., Kasantseva I.A., Kushlinskii N.E. The growth factor of endotelium of vessels and its receptors type I and II in blood serum in patients with kidney cancer: clinical morphological correlations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(9): 536-41. (in Russian)
15. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation: twenty-something years on. *Nat. Protoc*. 2006; 1(2): 581-5.
16. Plaffl M.V. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9): e45.
17. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications. 3rd Edition, Elsevier; 2010.
18. Pegram M.D., Reese D.M. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*. 2002; 3 (Suppl 11): 29-37.
19. Koukourakis M.J., Limbelis V., Tentes J., Kontomanolis E, Kortsaris A, Sivridis E, Giatromanolaki A. Serum VEGF levels and tissue activation of VEGFR2/VDR receptors in patients with breast and gynecologic cancer. *Cytokine*. 2011; 53(3): 370-5.
20. Gershteyn E.S., Koushlinitskiy D.N., Tereshkina I.V., Ermilova V.D., Ovchinnikova L.K., Galdava D.E., Kouznetsova O.V. Vascular Endothelial Growth Factor And The Tumors Of Female Reproductive System. Part II. Ovarian Cancer And Endometrial Cancer. *Onkoginekologija*. 2015; 2: 4-11. (in Russian)
21. Schneider B.P., Radovich M., Miller K.D. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Genetic Variability in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(17): 5297-5302.
22. Camerin G.R, Brito A.B, Vassallo J, Derchain S.F, Lima C.S. VEGF gene polymorphisms and outcome of epithelial ovarian cancer patients. *Future Oncol*. 2017; 13(5): 409-14.
23. Vincenti V., Cassano C., Rocchi M., Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996; 93: 1493-5.
24. Steffensen K.D, Waldstrøm M., Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol*. 2010; 117(1): 109-16.
25. Huez I., Bornes S., Bresson D. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol. Endocrinol* 2001; 15: 2197-210.
26. Hefler L.A, Mustea A., Kongsen D. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res*. 2007; 13: 898-901.
27. Lose F., Nagle C.M, O'Mara T. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and ovarian cancer survival. *Gynecol Oncol*. 2010; 119(3): 479-83.

Поступила 28.05.18
Принята к печати 13.06.18

КОАГУЛОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.111.7.084

Мансурова Д.А., Жунуспекова А.С., Каражанова Л.К.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Государственный медицинский университет города Семей, 071400, Семей, Казахстан

В настоящей статье изложены установленные нами средние значения и референсные интервалы агрегации тромбоцитов у практически здоровых людей на оптическом агрегометре AggRAM (Helena BioSciences Europe). Референсные интервалы агрегационной активности тромбоцитов с 5 мкг/мл аденозин-5'-дифосфатом и площадь под агрегационной кривой составили 67,4–92,5% и 54,5–85,3; референсные интервалы активности тромбоцитов с 10 мкг/мл аденозин-5'-дифосфатом и площадь под кривой агрегации составили 76,8–97,2 и 68,8–90,4%. Полученные значения показателей могут быть использованы в качестве референсных в клинико-диагностической лаборатории Университетского госпиталя Государственного медицинского университета города Семей.

Ключевые слова: референсные значения; агрегация тромбоцитов; площадь под кривой; аденозин-5'-дифосфат; тестирование функции тромбоцитов.

Для цитирования: Мансурова Д.А., Жунуспекова А.С., Каражанова Л.К. Референсные значения агрегации тромбоцитов у здоровых лиц. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 549-552. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-549-552>

Mansurova J.A., Zhunuspekova A.S., Karazhanova L.K.

REFERENCE VALUES OF PLATELET AGGREGOMETRY IN HEALTHY SUBJECTS

Semey State Medical University, 071400, Semey, Kazakhstan

In this article, we set forth the average values and reference intervals of platelet aggregation in practically healthy individuals on the AggRAM optical aggregometer. The reference intervals of platelet aggregation activity with 5 µg/ml adenosine-5'-diphosphate and the area under the aggregation curve were 67,4-92,5% and 54,5-85,3; the reference intervals of platelet activity with 10 µg/ml adenosine-5'-diphosphate and the area under the aggregation curve were 76,8-97,2% and 68,8-90,4. The obtained values of indicators can be used as reference in the clinical diagnostic laboratory of the University Hospital of Semey State Medical University.

Key words: reference values; platelet aggregation; area under curve; adenosine-5'-diphosphate; platelet function tests.

For citation: Mansurova J.A., Zhunuspekova A.S., Karazhanova L.K. Reference values of platelet aggregometry in healthy subjects. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (9): 549-552 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-549-552>

For correspondence: Mansurova J.A., Master of Medical sciences, doctoral student PhD, assistant of department of therapy internship; e-mail: mansurova_dzhami@mail.ru

Information about authors:

Mansurova J.A., <https://orcid.org/0000-0003-2439-2056>

Zhunuspekova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-2413-317X>

Karazhanova L.K., <http://orcid.org/0000-0002-4719-6034>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.03.2018
Accepted 25.05.2018

Тестирование функции тромбоцитов широко используется для диагностики причин различных видов кровотечений. В настоящее время исследование агрегационной активности тромбоцитов актуально для контроля эффективности и безопасности терапии антитромбоцитарными препаратами [1]. Наибо-

лее сложной проблемой с точки зрения тестирования функции тромбоцитов для определения ответа на антитромбоцитарные препараты, по-видимому, является отсутствие корреляции между результатами большинства доступных в настоящее время тестов [2, 3]. Оптическая агрегатометрия, введенная в начале 1960-х годов, остаётся золотым стандартом в оценке функциональной активности тромбоцитов. Метод основан на регистрации изменений светопропускания богатой тромбоцитами плазмы в ответ на стимуляцию

Для корреспонденции: Мансурова Джамия Анваровна, магистр мед. наук, докторант PhD, ассистент кафедры интернатуры по терапии; e-mail: mansurova_dzhami@mail.ru

Агрегационная функция тромбоцитов у мужчин и женщин

Показатель	Мужчины (n = 16; 45,7%)	Женщины (n = 19; 54,3%)	p
АТц с 5 мкг/мл АДФ, %	81,9 (23,4) (67,2–90,6)	88,0 (10,4) (67,9–92,6)	0,385*
AUC с 5 мкг/мл АДФ	74,0 (21,3) (49,5–84,6)	79,4 (9,9) (58,6–85,9)	0,230*
	Мужчины (n = 18; 51,4%)	Женщины (n = 17; 48,6%)	
АТц с 10 мкг/мл АДФ, %	86,7 ± 5,4 (75,0–93,6)	87,3 ± 5,2 (76,5–94,7)	0,757**
AUC с 10 мкг/мл АДФ	78,9 ± 6,1 (63,7–86,1)	80,4 ± 4,9 (70,4–88,2)	0,525**

Примечание. Здесь и табл. 2: параметры показателей представлены в виде: * – Me (IQR) – медиана (межквартильный диапазон), ** – $M \pm SD$ (среднее арифметическое и стандартное отклонение), min и max значения, АТц – активность тромбоцитов, AUC – площадь под кривой агрегации тромбоцитов, АДФ – аденозин-5'-дифосфат, $p < 0,05$.

несколькими агонистами в разных концентрациях [2, 4, 5]. Несмотря на трудоёмкость и технические сложности, в каждой клинической лаборатории рекомендовано устанавливать свои референсные интервалы (РИ) [3, 5, 6]. Характеристики референсных популяций и уровень выполненных аналитических процедур в лабораториях в используемых источниках должны быть сопоставимы [7-9]. Однако в реальности лаборатории часто используют опубликованные РИ, установленные на других измерительных системах и для другой популяции, что может привести к значительным ошибкам при интерпретации результатов исследования [8].

Цель исследования – установить референсные значения агрегации тромбоцитов у практически здоровых людей на агрегометре AggRAM.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 45 здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 79 лет в период с июня 2016 г. по ноябрь 2016 г. Критерии исключения: наличие соматической патологии, приём антиагрегационных и нестероидных противовоспалительных препаратов в течение 2 нед. Предварительно с целью стандартизации преаналитического этапа участники были ознакомлены с инструкцией по подготовке к анализу, медицинский персонал – с инструкцией по взятию крови и транспортировке пробирок, ежедневной калибровке аппарата согласно инструкции по эксплуатации прибора. До включения в исследование все участники дали информированное согласие. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Государственного медицинского университета г. Семей (ГМУ г.Семей) (№ 4 от 14.10.2015г.).

Забор крови производили утром натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки с 3,8% цитратом натрия (в соотношении 9:1) с кратковременным наложением жгута, диаметр иглы 0,8 мм. В течение 20–30 мин образцы крови доставлялись в лабораторию и анализировались около 40 мин с момента поступления. Плазму, богатую тромбоцитами, получали с использованием центрифуги ОПн-3.02 «Дастан» (Киргизия) при 1000 об/мин. в течение 10 мин, бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием при 3000 об/мин до 15 мин. Функциональную активность тромбоцитов в одном образце крови определяли на оптическом агрегометре AggRAM (Helena BioSciences Europe), в котором имеется 4 независимых канала для одновременного измерения основных типов антиагрегантов при времени считывания до 10 мин. Использовались реагенты: аденозин-5'-дифосфат (АДФ) 5 и 10 мкг/мл (фирмы «Технология-Стандарт», Россия). Результаты исследования функции тромбоцитов оценивались по максимальному проценту агрегации (max %) в ответ на стимуляцию индукторами и площадью под агрегационной кривой (AUC – area under curve), которую в инструкции фирмы-производителя рекомендуют вычислять в научно-исследовательских целях.

Статистический анализ. Статистическая обработка проводилась с использованием программы SPSS (версия 20.0): описательные статистики (M – среднее арифметическое и SD – стандартное отклонение, минимальное и максимальное значения, Me – медиана, IQR – межквартильный диапазон), критерий Колмогорова–Смирнова, U-тест Манна–Уитни для независимых выборок, корреляционный анализ Спирмана между max% агрегации тромбоцитов (АТц) и AUC. Различия между сравниваемыми переменными считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Средний возраст всех участников составил 46 лет (минимальный возраст 25 лет, максимальный – 79 лет). Среди них 25(55,6%) мужчин в возрасте 46 лет (минимальный возраст 25 лет, максимальный – 79 лет) и 20 (44,4%) женщин в возрасте 45 лет (минимальный возраст 27 лет, максимальный – 73 года). Исследование состояло из двух этапов. На первом этапе выявляли и исключали из дальнейшего исследования статистические выбросы по результатам определения агрегационной функции тромбоцитов с 5 и 10 мкг/мл АДФ (ГОСТ Р 53022.3-2008). С помощью метода Тьюки из исследования исключили по 10 результатов определения агрегационной функции тромбоцитов с 5 и 10 мкг/мл АДФ и AUC соответственно, что составило 22,2%.

На втором этапе исследования определяли средние показатели АТц и AUC у мужчин и женщин, выявляли наличие различий (табл. 1).

Средние значения функциональной активности тромбоцитов у женщин оказались несколько выше, однако статистической значимости не было выявлено. Референсные значения фирмы-производителя, а также РИ, выявленные в исследованиях с другими анализаторами, установлены для всей референсной популяции, следовательно, полученные нами результаты сопоставимы [9,10]. Однако в исследовании М. Otahbachi и соавт. [11] с использованием агрегометра

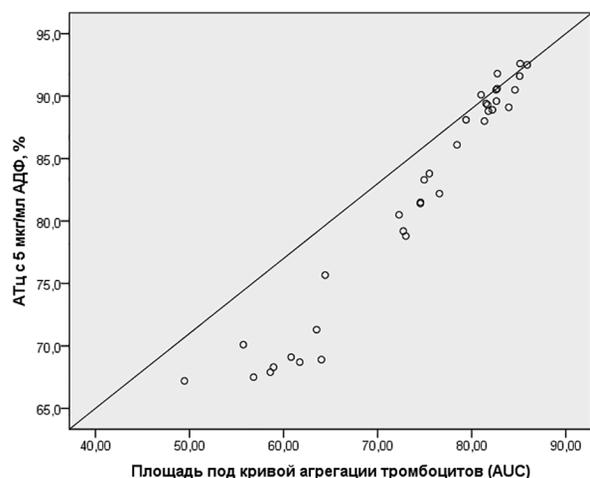


Рис.1. Корреляция между АТц с АДФ 5 мкг/мл и площадью под кривой агрегации (AUC).

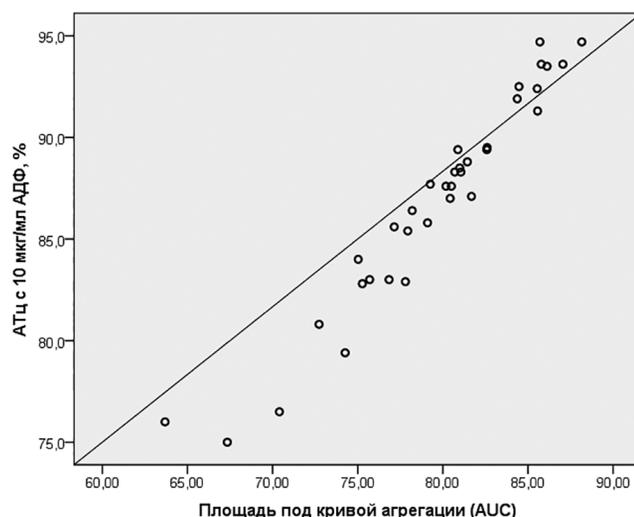


Рис.2. Корреляция между АТц с АДФ 10 мкг/мл и площадью под кривой агрегации (AUC).

Таблица 2

Сравнение полученных показателей АТц с 10 и 5 мкг/мл АДФ и AUC с РИ фирмы-производителя

Показатель	Ме (min–max) (n = 35)	Полученный РИ (n = 35)	РИ фирмы-производителя, (n = 20)
АТц с 5 мкг/мл АДФ, %	83,8 (67,2–92,6)	67,4–92,5*	Более 60
AUC с 5 мкг/мл АДФ,	76,6 (49,5–85,9)	54,5–85,3*	-
АТц с 10 мкг/мл АДФ, %	87,6 (75,0–94,7)	76,8–97,2**	Более 60
AUC с 10 мкг/мл АДФ	80,5 (63,7–88,2)	68,8–90,4**	-

Примечание. Ме (медиана), min и max значения, * – РИ представлены в виде перцентилей 5–95-й, ** – РИ в виде $M \pm 1,96SD$.

Chrono-Log Co с участием 36 здоровых лиц независимо от этнической принадлежности активность тромбоцитов в ответ на все тестируемые агонисты была выше у женщин, чем у мужчин. В результате проведенного популяционного исследования Т. Intermann и соавт. установили, что различные лабораторные методы и референсные популяции могут привести к несоответствию результатов [12]. Таким образом, учитывая вышеизложенное, объединив мужчин и женщин, можно проводить расчёт РИ для всей референсной группы.

Расчёт РИ зависит от количества лиц в группе и типа распределения значений АТц. В небольшой референсной группе (менее 40 человек) при нормальном распределении показателей рекомендовано использовать параметрический метод для оценки РИ, который рассчитывается по формуле $M \pm 1,96SD$, а при ненормальном распределении переменных РИ рассчитывается в виде перцентилей 5–95-й, согласно которому у 90% здоровых лиц выявляются нормальные лабораторные показатели и у 10% – ненормальные (ГОСТ Р 53022.3-2008) [13]. В исследовании правильность распределения выборки была определена с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Распределение АТц с 5 мкг/мл АДФ и AUC соответственно было ненормальным и РИ рассчитывался в виде перцентилей 5–95-й. Распределение АТц с 10 мкг/мл

АДФ и AUC соответственно было нормальным, РИ рассчитывался по формуле $M \pm 1,96SD$. В табл. 2 представлены полученные референсные значения в сравнении с РИ фирмы-производителя.

Из табл. 2 видно, что референсные значения в нашем исследовании получились выше нижней границы фирмы-производителя. Так как AUC рекомендуется вычислять в научно-исследовательских целях, то РИ для этого показателя не указаны и их сравнение не представляется возможным. Однако между АТц (5 и 10 мкг/мл) АДФ и AUC, соответственно, получена очень высокая линейная корреляция ($Rho = 0,968$ и $Rho = 0,973$; $p < 0,001$) (рис. 1, 2), что делает необходимым использование обоих показателей в клинической практике.

Заключение. Таким образом, в результате нашего исследования установлено, что пол не влияет на средние значения АТц и AUC. Выявленная очень высокая линейная корреляция ($Rho = 0,968$ и $Rho = 0,973$; $p < 0,001$) между АТц (5 и 10 мкг/мл) АДФ и AUC соответственно делает необходимым дополнительно к АТц анализировать AUC. Референсные интервалы АТц с 5 мкг/мл АДФ и AUC составили 67,4–92,5% и 54,5–85,3; АТц с 10 мкг/мл АДФ и AUC составили 76,8–97,2% и 68,8–90,4. Установленные интервалы АТц и AUC могут быть использованы в качестве референсных в клиничко-диагностической лаборатории

Университетского госпиталя ГМУ г. Семей. Каждая лаборатория должна иметь свои референсные значения, и наш опыт может быть полезен в лабораториях, где используются аналогичные аналитические системы (автоматический агрегометр AggRAM Helena BioSciences Europe).

Ограничением нашего исследования является небольшой размер выборки, в связи с чем не учитывалась расовая принадлежность.

Благодарность. Авторы выражают благодарность проф. А.Ю. Гаспаряну за ценные комментарии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–6, 10–13 см. REFERENCES)

7. Воробьева И.И. Современные методы оценки функции тромбоцитов и их клиническое значение у больных с острым коронарным синдромом. *Креативная кардиология*. 2012; 1: 50–63.
8. Казакова М.С., Луговская С.А., Долгов В.В. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 6: 43–9.
9. Петрова О.В., Шашин С.А., Жукова Е.Р., Панова Е.В., Грачева Н.П. Референсные значения агрегации тромбоцитов у взрослого населения Астраханской области на агрегометре Multiplate. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 46–8.

REFERENCES

1. Sambu N., Curzen N. Monitoring the effectiveness of antiplatelet therapy: opportunities and limitations. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2017; 72(4): 683–96.
2. Koltai K., Kesmarky G., Feher G., Tibold A., Toth K. Platelet

Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int. J. Mol. Sci.*; 2017; 18(8).

3. Gasparyan A.Y. Aspirin and clopidogrel resistance: methodological challenges and opportunities. *Vasc. Health. Risk. Manag.* 2010; 6:109–12.
4. Hvas A.M., Favalaro E.J. Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. *Methods in molecular biology*. 2017; 1646: 321–31.
5. Cattaneo M., Cerletti C., Harrison P., Hayward CPM, Kenny D., Nugent D. et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11(6): 1183–9.
6. Falcone M., Granero R. Platelet aggregation reference interval for healthy individuals. *Acta bioquímica clinica Latinoam.* 2012; 46(4): 655–9.
7. Vorob'eva I. I. Sovremennye metody otsenki funktsii trombocitov i ikh klinicheskoe znachenie u bol'nykh s ostrym koronarnym sindromom. *Kreativnaya kardiologiya*. 2012; 1: 50–63. (in Russian)
8. Kazakova M.S., Lugovskaia S.A., Dolgov V. V. The reference values of indicators of total blood analysis of adult working population. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 6: 43–9. (in Russian)
9. Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G. Reference Values of Platelet Aggregation in Impedance Aggregometry with Adenosine Diphosphoric Acid on Aggregometer Multiplate. *Sovrem. Tehnol. v Med.* 2016; 8(3):100–4.
10. Beyan C., Kaptan K., Ifran A., Savasci S., Ozturk Y., Okmen B. Effect of sex difference on platelet aggregation using an optical method in healthy subjects. *Clin. Lab. Haematol.* 2006; 28(1):14–6.
11. Otahbachi M., Simoni J., Simoni G., Moeller J.F., Cevik C., Meyerrose G.E. et al. Gender differences in platelet aggregation in healthy individuals. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2010; 30(2):184–91.
12. Ittermann T., Roser M., Wood G., Preez H., Lüdemann J., Völzke H. et al. Reference intervals for eight measurands of the blood count in a large population based study. *Clin. Lab.* 2010; 56(1–2): 9–19.
13. Horowitz G.L. Estimating Reference Intervals. *Am. J. Clin. Pathol.*; 2010; 133(2):175–7.

Поступила 30.03.18
Принята к печати 25.05.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.151.5-053.31-074

Кузьменко Г.Н., Попова И.Г., Назаров С.Б., Клычева М.М., Ситникова О.Г., Харламова Н.В., Парейшвили В.В.

ГЕМОСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПУПОВИННОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ НОВОРОЖДЁННЫХ ПО ДАННЫМ ТРОМБОЭЛАСТОГРАФИИ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ, Иваново

Проведён сравнительный анализ показателей тромбоэластографии пуповинной и венозной крови на 1–3-и сутки жизни у доношенных и недоношенных новорождённых. Обследовано 40 доношенных и 68 недоношенных новорождённых на 1–5-й день жизни. Масса тела детей составила соответственно $3413,8 \pm 54,6$ и $2039,4 \pm 75,9$ г, гестационный возраст – $40,0 \pm 0,3$ и $33,5 \pm 0,33$ нед. Исследовалась смешанная пуповинная и венозная кровь, взятая из локтевой вены у ребёнка на 1–3-и сутки жизни.

Полученные данные указывают на то, что основная направленность в показателях тромбоэластограмм у недоношенных и доношенных новорождённых в пуповинной и венозной крови сохраняется. У недоношенных новорождённых в пуповинной крови снижена активность плазменного звена и функциональная активность тромбоцитов, а также снижен коагуляционный потенциал в целом. После рождения у недоношенных новорождённых в венозной крови выявлено замедление свертывания крови, снижение скорости образования и прочности сгустков. Отмечается также снижение функциональной активности тромбоцитов, индекса коагуляции и более выраженное изменение гемостатического потенциала в сторону гипокоагуляции. У доношенных детей установлена гиперкоагуляционная направленность гемостаза при рождении. Показатели функционального состояния тромбоцитов и лизис сгустка в пуповинной и венозной крови после рождения существенно не изменяются.

Ключевые слова: новорожденные; пуповинная кровь; гемостаз; тромбоэластограмма; гемостатический потенциал крови.

Для цитирования: Кузьменко Г.Н., Попова И.Г., Назаров С.Б., Клычева М.М., Ситникова О.Г., Харламова Н.В., Парейшвили В.В. Сравнительная характеристика гемостатического потенциала в пуповинной крови и в крови у недоношенных и доношенных новорожденных после рождения по данным тромбоэластографии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 553-556. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-553-556>

Kuzmenko G. N., Popova I. G., Nazarov S. B., Klycheva M. M., Sitnikova O. G., Kharlamova N. V., Pareyshvili V. V.

HEMOSTATIC POTENTIAL OF THE UMBILICAL CORD AND VENOUS BLOOD OF NEWBORNS ACCORDING TO THE THROMBOELASTOGRAPHY

Ivanovo research Institute of Maternity and Childhood. V. N. Gorodkova, Ivanovo, Russia

The comparative characteristic of indicators of thromboelastography of umbilical cord blood and venous blood for 1-3 days of life at full-term and premature newborns is carried out. The study included 40 full term and 68 preterm infants at 1-5 days of life. Body weight of children was 3413.8 ± 54.6 g and 2039.4 ± 75.9 g, gestational age - 40.0 ± 0.3 and 33.5 ± 0.33 weeks, respectively. Mixed umbilical cord blood and venous blood taken from the ulnar vein of a child for 1-3 days of life were studied. The obtained data indicate that the main focus in the performance of thromboelastograms in premature and full-term newborns in the umbilical and venous blood are preserved. In preterm infants in cord blood decreased activity of the plasma level and functional activity of platelets, as well as reduced coagulation potential in General. After birth, premature newborns in the venous blood showed a slowdown in blood clotting, a decrease in the rate of formation and strength of clots. There is also a decrease in the functional activity of platelets, coagulation index and a more pronounced change in hemostatic potential in the direction of hypocoagulation. In full-term children, changes in the functional state of platelets and clot lysis in the umbilical and venous blood after birth do not change significantly. Hypercoagulable orientation of hemostasis in these children at birth was established.

Key words: newborn, umbilical cord blood, hemostasis thromboelastogram, the hemostatic potential of blood.

For citation: Kuzmenko G. N., Popova I. G., Nazarov S. B., Klycheva M. M., Kharlamova N. V., Pareyshvili V. V. Comparative characteristics of the hemostatic potential in cord blood and in blood from premature and full-term newborns after birth according to the thromboelastography. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (9): 553-556. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-553-556>

For correspondence: Popova I. G., candidate of medical sciences, researcher of laboratory of clinical biochemistry and medical genetics; e-mail: i_g_popova@mail.ru

Information about authors :

Kuzmenko G.N. <http://orcid.org/0000-0001-5772-9271>

Nazarov S.B. <http://orcid.org/0000-0003-1545-7655>

Sitnikova O.G. <http://orcid.org/0000-0003-2604-0724>

Pareyshvili V.V. <http://orcid.org/0000-0002-1497-1006>

Popova I.G. <http://orcid.org/0000-0003-1836-3523>

Klycheva M. M. <http://orcid.org/0000-0002-1725-8505>

Kharlamova N.V. <http://orcid.org/0000-0003-2867-1693>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 27.04.2018
Accepted 11.05.2018

Для корреспонденции: Попова Ирина Геннадьевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клин. биохимии и мед. генетики; e-mail: i_g_popova@mail.ru

Введение. Исследование свертывания крови имеет особое значение для диагностики нарушений гемостаза у новорождённых, однако до настоящего времени остаётся множество нерешённых вопросов, связанных с экстренной и правильной оценкой этих нарушений особенно у недоношенных новорождённых [1]. Одним из методов, позволяющих быстро получить общую оценку состояния гемостаза, а также оценку функций, которую невозможно получить при выполнении обычных базисных тестов коагуляции, является тромбоэластография (ТЭГ). Принципиальное отличие ТЭГ от стандартных коагулологических тестов состоит в том, что она позволяет одновременно оценивать состояние плазменных ферментных систем крови, противосвертывающих механизмов клеточного звена (тромбоцитов, эритроцитов, лейкоцитов) и системы фибринолиза. ТЭГ даёт возможность получить характеристику функционального состояния всех этапов коагуляции от инициации свертывания до его распространения, кинетику образования сгустка, его прочность, взаимодействие компонентов плазмы и тромбоцитов в процессе образования сгустка, а также интенсивность лизиса. ТЭГ предполагает выполнение исследования в малых количествах цельной крови. Показатели нормальных диапазонов для показателей ТЭГ у новорождённых представлены Т. Strauss и соавт. [2], у новорождённых и детей – E. Oswald и соавт. [3]. R. Edwards и соавт., используя классическую ТЭГ и выполняя исследования образцов пуповинной крови, выявили более короткое время свертывания крови и снижение твёрдости сгустка у недоношенных новорождённых в сроке гестации 34–36 нед по сравнению со взрослыми [4]. N. Goldenberg и соавт. при исследовании ТЭГ новорождённых отметили повышенную свёртываемость (укорочение времени реакции и увеличение максимальной амплитуды) цельной крови [5].

Актуальными для неонатологии остаются вопросы о возможности использования образцов пуповинной крови для оценки состояния системы гемостаза у новорождённых и применения современных диагностических методов исследований системы гемостаза.

Цель работы – представить сравнительную характеристику состояния клеточного и плазменного компонентов системы гемостаза по показателям ТЭГ из пуповинной и венозной крови недоношенных и доношенных новорождённых.

Материал и методы. Обследовано 40 доношенных и 68 недоношенных новорождённых на 1–5-й день жизни. Масса тела детей составила соответственно $3413,8 \pm 54,6$ и $2039,4 \pm 75,9$ г, гестационный возраст – $40,0 \pm 0,3$ и $33,5 \pm 0,33$ нед. Критерии включения в группу доношенных новорождённых: срок гестации не менее 37 нед; течение беременности и родов у матерей без осложнений; отсутствие экстрагенитальной патологии; течение периода ранней неонатальной адаптации без патологических осложнений. Все дети данной группы были выписаны из родильного дома в удовлетворительном состоянии на 5–6-е сутки после рождения.

Критериями включения в группу «условно здоровых» недоношенных новорождённых являлись сроки гестации менее 37 нед и отсутствие тяжёлых осложнений во время беременности и родов, течение раннего неонатального периода без осложнений. Критериями исключения из группы недоношенных являлись развитие ДВС-синдрома, тяжёлых и среднетяжелых перина-

льных поражений ЦНС, геморрагической болезни, инфекций, гемолитической болезни, врождённых пороков развития и выраженных метаболических и гемодинамических нарушений. Клиническое обследование проводилось в динамике раннего неонатального периода.

Исследовали смешанную пуповинную кровь, собранную в течение 30 мин после родоразрешения, и венозную кровь, взятую у новорождённых на 1–3-и сутки жизни. Взятие крови осуществляли стандартизированным способом венопункции в пробирки, содержащие 3,2% раствора цитрата натрия. Измерение параметров стабилизированной цитратом пуповинной и венозной крови проводили на тромбоэластографе TEG – 5000 (Haemoscope Corporation, США). Исследование выполняли в течение 20–30 мин от момента забора крови до старта теста после рекальцификации 340 мл цельной крови 0,2 М раствором хлорида кальция. При выполнении ТЭГ пуповинной крови процесс свертывания крови активировали каолином.

При интерпретации графической информации оценивались следующие параметры ТЭГ: R – показатель представляет собой характеристику энзиматической части плазменного звена на стадии инициации свертывания крови и характеризуется отрезком прямой от начала записи до расширения в 1 мм (референтные значения у взрослых в цельной крови 9–27 мин). K – время с момента начала образования сгустка до достижения фиксированного уровня прочности сгустка (амплитуды в 20 мм). Этот показатель отражает фазу усиления свертывания (скорость образования тромбина) и кинетику увеличения прочности сгустка (референтные значения у взрослых в цитратной крови 2–9 мм). α (Angle) – угол, построенный по касательной к тромбоэластограмме из точки начала образования сгустка, отображает скорость роста фибриновой сети (увеличение прочности сгустка) и фазу распространения коагуляции. Показатель характеризует динамику образования фибрина из фибриногена – чем быстрее происходит свертывание крови, тем больше угол, и наоборот. Референтные значения у взрослых в цитратной крови 22–58. MA – максимальная амплитуда – отражает функциональную активность тромбоцитов, количество и качество фибриногена. MA характеризует максимум динамических свойств соединения фибрина и тромбоцитов посредством рецепторов GPII b/III a и отображает максимальную прочность сгустка. Максимальная амплитуда обусловлена на 80% количеством и свойствами (способностью к агрегации) тромбоцитов, на 20% – количеством образовавшегося фибрина. Референтные значения у взрослых в цитратной крови 46–66 мм. TMA – время достижения максимальной амплитуды в минутах. Показатель G характеризует прочность сгустка. Референтные значения у взрослых составляют $3,6–8,5$ dyn/cm², E – максимальную эластичность сгустка. Максимальная эластичность сгустка рассчитывается по формуле $E = 100 \times MA/100 - MA$. Референтные значения у взрослых 80–180 d/sc. LY30 – характеристика процесса лизиса сгустка в процентах (%). CI – коагуляционный индекс, который является производным параметром от R, K, MA и угла α , он характеризует коагуляционный потенциал крови пациента в целом. Референтные значения для коагуляционного индекса лежат в диапазоне между -3,0 и +3,0. Положительные значения вне этого диапазона (CI > 3,0) указывают, что образец находится в состоянии гиперкоагуляции, тогда как отрицательные значения вне этого диапазона (CI < -3,0) указывают, что образец в

Таблица 1



Графическое изображение показателей тромбозластограммы.

гипокоагуляции. Графическая информация, отображенная анализатором ТЭГ, представлена на рисунке.

Статистический анализ результатов исследования выполнен с помощью компьютерной программы статистической обработки данных Statistica 6.0 (StatSoft) for Windows. Для усреднения параметрических признаков использованы медианы и квартили (Me, Q25; Q75). В случаях, когда гипотеза нормальности отвергалась, показатель достоверности p рассчитывали на основе рангового непараметрического критерия Манна – Уитни. В остальных случаях расчёт проводили с помощью критерия Стьюдента. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы p принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Данные ТЭГ пуповинной крови представлены в табл. 1.

По данным исследования показатели ТЭГ пуповинной крови у недоношенных и доношенных новорождённых существенно различаются. У недоношенных детей выявлено увеличение времени начальной активации тромбообразования (R) (замедлена фаза иницирования коагуляции) и снижение коагуляционного индекса крови по сравнению с доношенными. Показатели максимальной амплитуды (MA) снижены, что указывает на снижение функциональной активности тромбоцитов, ($p < 0,001$). Индекс коагуляции (CI) также снижен в 1,3 раза, что свидетельствует о развитии гипокоагуляции. Таким образом, у недоношенных новорождённых в пуповинной крови отмечается гипокоагуляция плазменного звена на этапе иницирования гемостатических реакций, снижение функциональной активности тромбоцитов и замедление свертывания крови в сравнении с доношенными детьми.

Данные результатов исследований венозной крови новорождённых методом ТЭГ представлены в табл. 2.

После рождения в венозной крови у недоношенных новорождённых отмечается замедление скорости свертывания крови (R) и кинетики увеличения прочности сгустка (K) по сравнению с доношенными новорождёнными, что указывает на замедление фазы усиления коагуляции. Скорость роста фибриновой сети (угол α , в градусах) замедлена у недоношенных детей в сравнении с доношенными новорождёнными ($p < 0,01$). Угол α оценивает скорость образования тромба, он уменьшается при снижении уровня фибриногена, тромбоцитов, компонентов плазменного звена, а также при изменении их функциональной активности. Этот показатель косвенно отражает взаимодействие рецепторов GPIIb / IIIa тром-

Показатели тромбозластографии в пуповинной крови доношенных и недоношенных новорождённых, Me (25%–75%)

Параметры ТЭГ, референтные значения	Доношенные новорождённые (пуповинная кровь) $n = 40$	Недоношенные новорождённые (пуповинная кровь) $n = 68$	p
	1-я группа	2-я группа	
R (мин)	3,99	6,42*	$p_{1-2} < 0,001$;
2–8	3,5–4,45	4,1–8,2	
K (мм)	2,18	3,93	$p_{1-2} < 0,001$;
1–3	1,5–2,6	1,8–6,2	
α (угол)	63,6	55,2	$p_{1-2} < 0,001$;
55–78	60,8–70,9	52,9–68,5	
MA (мм)	61,1	49,9*	$p_{1-2} < 0,001$;
51–69	56,5–66	38,6–59,8	
TMA (мин)	26,8	26,7	$p_{1-2} < 0,001$
	22,5–30,7	21,3–34,8	
G (dyn/cm ²)	8,28	6,07	$p_{1-2} < 0,001$
4,6–10,9	6,55–9,75	3,1–7,4	
E (d/sc)	165,3	121,5	$p_{1-2} < 0,001$
92–218	130,5–194,3	62,8–142,6	
LY30 (%)	0,5	0,9	$p_{1-2} < 0,001$
0–8	0–1,15	0–1,7	
CI	2,25	-1,7*	$p_{1-2} < 0,001$
-3–3	0,85–3,2	-4,1–1,1	

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с предшествующей группой при $p < 0,001$, p_{1-2} – статистическая достоверность различий между 1-й и 2-й группами.

Таблица 2

Показатели тромбозластографии в венозной крови доношенных и недоношенных новорождённых, Me (25%–75%)

Параметры ТЭГ, референтные значения	Доношенные новорождённые (1–3-и сутки жизни) $n = 40$	Недоношенные новорождённые (1–3-и сутки жизни) $n = 68$	p
	3-я группа	4 группа	
R (мин)	8,90	12,05**	$p_{3-4} < 0,01$
9–27	5,65–11,1	8,1–14,6	
K (мм)	2,4	3,8*	$p_{3-4} < 0,05$
2–9	1,9–3,2	2,7–6,3	
α (угол)	59,3	43,7**	$p_{3-4} < 0,05$
22 - 58	53,6–66,0	31,5–55,1	
MA (мм)	58,8	47,1***	$p_{3-4} < 0,05$
44 - 64	55,1–63,5	39,8–50,7	
TMA (мин)	30,2	31	$p_{3-4} < 0,05$
	22,5–30,7	20,0–40,2	
G (dyn/cm ²)	7,05	4,5**	$p_{3-4} < 0,05$
3,6–8,5	6,1–8,5	3,3–5,1	
E (d/sc)	137,8	89,1***	$p_{3-4} < 0,05$
72 - 169	130,5–194,3	66,0–102,9	
LY30 (%)	0,6	0,35	$p_{3-4} < 0,05$
0–8	0,05–1,1	0–4,9	
CI	1,7	-1,1***	$p_{3-4} < 0,05$
-3–3	0–2,5	-2,5–(-0,6)	

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с предшествующей группой при $* < p 0,05$, ** – $< p 0,01$, *** – $< p 0,001$, p_{3-4} – статистическая достоверность различий между 3-й и 4-й группами.

боцитов и фибриногена [6]. Снижение MA указывает на выраженную гипокоагуляцию в фазе распространения свертывания и снижение функциональной активности

тромбоцитов у недоношенных в сравнении с доношенными новорожденными ($p < 0,001$). Снижение прочности G (dyn/cm^2) и эластичности E (d/sc) сгустков у недоношенных при сравнении с доношенными новорожденными косвенно свидетельствуют об особенностях полимеризации фибрина и особенностях агрегации менее функционально активных тромбоцитов. Индекс коагуляции (CI) у недоношенных снижен в 1,5 раза, по сравнению с доношенными новорожденными, что указывает на развитие гипокоагуляции. Лизис сгустка на 30-й минуте у новорожденных существенно не различался, имея большой размах минимальных и максимальных значений – от 0 до 6,2% у недоношенных детей. Таким образом, у недоношенных новорожденных в венозной крови выявлено замедление свертывания крови, снижение скорости образования и прочности сгустков, отмечается также снижение функциональной активности тромбоцитов, индекса коагуляции и изменение гемостатического потенциала в сторону гипокоагуляции в сравнении с доношенными новорожденными.

При анализе изменений в пуповинной и венозной крови у доношенных и недоношенных новорожденных выявлено, что у недоношенных новорожденных после рождения отмечается более выраженная гипокоагуляция плазменного звена на этапе инициирования гемостатических реакций, а также снижение скорости образования сгустка и коагуляционного потенциала в целом. У доношенных детей изменения показателей функционального состояния тромбоцитов и лизис сгустка в пуповинной и венозной крови после рождения существенно не изменяются.

Заключение. Основная направленность показателей ТЭГ пуповинной и венозной крови, взятой после рождения, у недоношенных и доношенных новорожденных сохраняется.

У недоношенных новорожденных в пуповинной крови отмечается снижение активности плазменного звена и функциональной активности тромбоцитов, а также снижение коагуляционного потенциала в целом по сравнению с доношенными детьми.

После рождения в венозной крови у недоношенных новорожденных по сравнению с доношенными ново-

рожденными регистрируется изменение гемостатического потенциала в сторону гипокоагуляции на этапе инициирования гемостатических реакций, замедление скорости образования и прочности сгустков. Отмечается также снижение функциональной активности тромбоцитов, индекса коагуляции.

У доношенных детей в венозной крови в первые дни после рождения отмечается гиперкоагуляционная направленность гемостаза по сравнению с пуповинной кровью. Показатели функционального состояния тромбоцитов и лизис сгустка в пуповинной и венозной крови существенно не изменяются.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-6 см. REFERENCES)

1. Кузьменко Г. Н., Назаров С. Б., Попова И. Г. Инновационная технология оценки гемостатического потенциала крови недоношенных новорожденных. *Российский педиатрический журнал*. 2015; 2: 4-10.

REFERENCES

1. Kuzmenko G.N., Nazarov S.B., Popova I.G. Innovative technology in the evaluation of the hemostatic potential of the blood in premature infants. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2015; 2: 4-10. (in Russian)
2. Strauss T., Levy-Shraga Y., Ravid B. et al. Clot formation of neonates tested by thromboelastography correlates with gestational age. *Thromb. Haemost* 2010;103: 344-50.
3. Oswald E., Stalzer B., Heitz E. et al. Thromboelastometry (ROTEM) in children: age-related reference ranges and correlations with standard coagulation tests. *Br.J.Anaesth*. 2010; 105: 827-35.
4. Edwards R.M., Naik-Mathuria B.J., Gay A.N., Olutoye O.O., Teruya J. Parameters of thromboelastography in healthy newborns. *Am. J. Clin. Pathol*. 2008; 130: 99-102.
5. Goldenberg N. A. et al. A new global assay of coagulation and fibrinolysis. *Thromb. Res*. 2005; 116(4): 345-56.
6. Lang T., Toller W., Gutl M. et al. Different effects of abciximab and cytochalasin D on clot strength in thrombelastography. *J.Thromb. Haemost*. 2004; 2:147-53.

Поступила 27.04.18

Принята к печати 11.05.18

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.842.14.83.136

Шепелин А.П.¹, Полосенко О.В.¹, Марчихина И.И.¹, Шолохова Л.П.¹, Ажермачева Н.И.¹, Ершова М.Г.², Полетаева Е.Д.²

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ НАКОПЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, пос. Оболенск, Серпуховский район, Московская область;

²ГБУЗ Ярославской области «Инфекционная клиническая больница», 150040, Ярославль

*Сальмонеллёзные инфекции остаются серьёзной проблемой современной медицины. Являясь возбудителями кишечных инфекций, представители рода *Salmonella* проявляют себя как патогенные бактерии, особенно при развитии внутрибольничных инфекций. Если учесть полиморфизм клинических проявлений сальмонеллёзов, лабораторные исследования с применением бактериологических и серологических методов являются важным звеном в их диагностике. Профилактика сальмонеллёза включает мероприятия по выявлению бактерионосителей, обеспечению контроля над заболеваемостью сельскохозяйственных животных и птиц, контролю пищевых продуктов и т. д. Перечень питательных сред для выделения и идентификации сальмонелл обширен и неуклонно расширяется, выбор конкретных сред во многом определяется исходя из характера исследуемого материала и представления о возможном содержании в нём бактерий рода *Salmonella*. При этом учитываются исследования, диагнозы или эпидемическую ситуацию. В ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора разработаны две питательные среды, предназначенные для накопления и выделения сальмонелл из различных образцов клинического материала: питательная среда для накопления сальмонелл сухая (магниева среда) и питательный агар с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой сухой (БФЛС-ГРМ-агар)». Проведена сравнительная оценка ростовых и ингибиторных свойств новых питательных сред производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» с коммерческими отечественными и зарубежными аналогами с использованием клинического материала. Доказано соответствие отечественных питательных сред: магниевой среды и БФЛС-ГРМ-агара коммерческим аналогам при использовании этих сред с целью селективного накопления, выделения и учёта сальмонелл из клинического материала и получения объективных результатов бактериологического контроля.*

Ключевые слова: питательные среды; БФЛС-ГРМ-агар; магниевая среда; энтеробактерии.

Для цитирования: Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Ажермачева Н.И., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 557-563. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563>

Shepelin A. P.¹, Polosenko O. V.¹, Marchikhina I. I.,¹ Sholokhova L. P.,¹ Azhermacheva N. I.,¹ Ershova M. G.,² Poletaeva E. D.²

CLINICAL TRIALS OF SALMONELLA ENRICHMENT MEDIUM

¹Federal State Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology, Rospotrebnadzor, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

²State budgetary institution of health care Infectious disease hospital, 150040 Yaroslavl, Russia

*Salmonella infections continue to be a serious problem in modern medicine. Being intestinal infections-associated pathogens, representatives of the genus *Salmonella* manifest themselves as pathogenic bacteria, especially in developing nosocomial infections. Given the polymorphism of clinical symptoms of salmonellosis, laboratory studies using bacteriological and serological methods are an important link in the diagnosis. In addition, the general prevention of salmonellosis includes measures to identify bacteria carriers, to ensure control over the incidence in farm animals and birds, food safety, etc. The list of nutrient media to isolate and identify *Salmonella* is lengthy and steadily extending, and the choice of specific media is largely relies on the nature of the material under study as well as on the idea of the potential availability of *Salmonella* bacteria in it, with research, diagnosis or epidemic situation being taken into account. The SRCAMB (Rospotrebnadzor) has designed two nutrient media allowing the enrichment and isolation *Salmonella* from various clinical samples. These are “Nutrient Medium for Enrichment of *Salmonella*, Dry (Magnesium medium) and “Nutrient Agar with Brilliant Green, Phenolic Red, Lactose and Sucrose, Dry (BPLS-FMH agar).” Growth and inhibitory properties of the new culture media produced by the SRCAMB and commercial domestic and foreign counterparts have been compared by using clinical material. Domestic nutrient media such as Magnesium medium and BPLS-FMH agar were proved to correspond to their commercial analogues when being used for enrichment, isolating and counting *Salmonella* bacteria in clinical specimens to have bacteriological control real data.*

Key words: nutrient media; BPLS-FMH agar; Magnesium medium; enterobacteria.

For correspondence: Polosenko O. V., candidate of biological sciences, leading researcher of the sector for microbiology; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

For citation: Shepelin A. P., Polosenko O. V., Marchikhina I. I., Sholokhova L. P., Azhermacheva N. I., Ershova M. G., Poletaeva E. D. Clinical trials of salmonella enrichment medium. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (9): 557-563 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-557-563>

Для корреспонденции: Полосенко Ольга Владимовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. сектора микробиологических исследований; e-mail: polosenko.olga@yandex.ru

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

Acknowledgment. *The work was carried out within the sectoral program of Rosпотребнадзор.*

Received 02.04.2018
Accepted 25.05.2018

Ежегодно большое количество людей страдает пищевыми отравлениями и инфекциями пищевого происхождения, вызванными сальмонеллами.

По статистической информации о состоянии здравоохранения по Российской Федерации в целом и по субъектам Российской Федерации за 2016 г., заболеваемость населения сальмонеллёзными инфекциями составила 38,1 тыс. человек, что по сравнению с предыдущим годом увеличилось на 1,2 тыс. человек [4].

В этиологической структуре доля сальмонеллы группы D (*Salmonella enteritidis*) составляет 78–81% всех диагностированных случаев. В последние годы появились данные о возрастающей роли сальмонелл группы С (*S. infantis*), что свидетельствует о формировании новых резервуаров возбудителя в природе и требует дальнейших исследований для определения возможных источников инфекции, не имеющих большого значения в предыдущие годы [9].

Большинство сальмонелл патогенны как для человека, так и для животных и птиц, но в эпидемиологическом отношении наиболее значимы для человека лишь несколько из них: *Salmonella enterica* subsp. *typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enteritidis*, *S. enterica* subsp. *panama*, *S. enterica* subsp. *infantis*, *S. enterica* subsp. *london* и некоторые другие вызывают 85–91% случаев сальмонеллёзов. При этом на долю первых двух приходится 75% всех изолятов, выделяемых в настоящее время от больных людей.

Серьёзной проблемой современной медицины являются сальмонеллёзные, нозокомиальные инфекции. В подавляющем большинстве случаев (более 80%) возбудителем нозокомиального сальмонеллёза как в России, так и за рубежом является *S. enterica* subsp. *typhimurium* [1].

Механизм передачи сальмонеллёзной инфекции фекально-оральный, основной путь передачи – пищевой и главным образом через продукты животного происхождения.

Санитарные правила (СП 3.1.7.2836-11 «Профилактика сальмонеллёза») [12] устанавливают основные требования к комплексу организационных, санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения сальмонеллёза среди населения.

Несмотря на стремительное развитие ускоренных методов диагностики (молекулярно-генетические, иммунохроматографические методы, иммуноферментный анализ и другие) различных заболеваний, в соответствии с санитарными правилами в качестве основного метода для подтверждения наличия сальмонелл является культуральный [2, 8, 13].

Культуральный метод основан на выделении и идентификации чистой культуры возбудителя из исследуемого материала. Его эффективность зависит от правильного и адекватного выбора питательных сред, что позволяет определить таксономически значимые признаки клинических изолятов и правильно их идентифицировать.

К числу общепризнанных питательных сред для накопления сальмонелл относятся магниевая среда, селе-

нитовый бульон, бульон Раппопорта – Вассилиадиса, среда Мюллера – Кауфмана и другие.

Магниевая среда используется для выделения сальмонелл в обычной концентрации (для исследования малых объёмов – испражнений, пищевых продуктов, сточных вод), в двойной концентрации (для исследования больших объёмов – сточных вод, воды открытых водоёмов), в виде концентрированных растворов («экспедиционная» модификация) [5].

Из плотных селективных дифференциально-диагностических питательных сред, производимых в РФ, широко применяются среда Левина, агар Эндо, агар Плоскирева, висмут-сульфит-агар, XLD-агар и другие.

Высокая питательная ценность селективного питательного агара с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой (БФЛС-ГРМ-агар) обеспечивает хороший рост сальмонелл и их чёткую дифференциацию от лактозо- и сахарозоположительных микроорганизмов, увеличенная концентрация бриллиантового зелёного и дополнительное содержание малахитового зелёного в значительной степени подавляют рост грамположительных бактерий.

Следует отдавать предпочтение отечественным сухим питательным средам известных производителей, имеющим регистрационные удостоверения и разрешённым к применению на территории Российской Федерации для лабораторной диагностики [10].

Перечень питательных сред для выделения и идентификации возбудителей кишечных инфекций, в частности энтеробактерий, неуклонно расширяется. Практически весь ассортимент питательных сред ФБУН «ГНЦ ПМБ» внесён в ГОСТы и МУК для бактериологических исследований в клинической и санитарной микробиологии. Эти среды широко используются бактериологическими лабораториями России для выделения и идентификации энтеробактерий, диагностики особо опасных инфекций, дисбиозов, дифтерии, гнойных бактериальных менингитов, при контроле микробной загрязнённости нестерильных лекарственных средств и др. [3, 14–16].

Цель работы – внедрить в практику бактериологических исследований для выделения сальмонелл отечественные сухие питательные среды: питательную среду для накопления сальмонелл, сухую (магниевая среда) и питательный агар с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой сухой (БФЛС-ГРМ-агар), не уступающих по качеству импортным коммерческим аналогам.

Материал и методы. В микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы г. Ярославля в рамках Соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ФБУН «ГНЦ ПМБ» и ГБУЗ ЯО «ИКБ» от 06.06.2016 совместно с сотрудниками ФБУН «ГНЦ ПМБ» проведены исследования образцов клинического материала с применением питательной среды для накопления сальмонелл сухой (магниевая среда) по ТУ 9385-228-78095326-2015, БФЛС-ГРМ-агара по ТУ 9385-201-78095326-2013 производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» для подтверждения возможности использования данных сред по назначению.

Сравнительная характеристика питательных сред по биологическим показателям на контрольных тест-штаммах микроорганизмов

Тест-штамм	Разведение	Питательный БФЛС-ГРМ-агар ФБУН «ГНЦ ПМБ»	BPLS – agar for the isolation of <i>Salmonella</i> фирмы «MERCK»
		число колоний, диаметр в мм	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhimurium</i> 79	10 ⁻⁶	87 2,5–3,2	85 1,6–1,8
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	Колонии круглые, гладкие, розового цвета
<i>S. enterica</i> subsp. <i>gallinarum</i> 665	10 ⁻⁶	105 1,6–1,8	Нет роста
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>paratyphi</i> A 225	10 ⁻⁶	125 1,4–1,8	103 1,8–2,0
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	Колонии круглые, гладкие, розового цвета
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhi</i> H-901 ГДР/ГИСК	10 ⁻⁶	79 1,0–1,8	45 0,6
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	Колонии круглые, гладкие, бледно-розового цвета
<i>S. flexneri</i> 1 a 8516	10 ⁻⁶	92 1,4–1,6	Нет роста
		Колонии круглые, гладкие, розового цвета	
<i>E. coli</i> O ₅₅ :K ₅₉ 3912/41	10 ⁻⁶	46 1,0–1,8	47 1,0–1,6
		Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета	Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета
<i>E. coli</i> 25922	10 ⁻⁶	49 1,6–2,0	38 1,2–1,4
		Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета	Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета
<i>P. vulgaris</i> HX 19222	10 ⁻⁶	125 1,8–2,0	85 1,0–1,2
		Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета, роения нет	Колонии круглые, гладкие, жёлтого цвета, роения нет
<i>S. aureus</i> 209-P	10 ⁻⁵	Нет роста	Нет роста

Проанализировано 520 образцов патогенных биологических агентов (ПБА). Клинический материал представляет собой 436 образцов испражнений (кал), 74 образца мочи, 5 мазков из гнойных ожоговых ран, 5 образцов крови.

Препараты сравнения для магниевой среды – селенитовый бульон, предоставленный ГУЗ ЯО «ИКБ № 1», для БФЛС-ГРМ-агара – SS-агар, среда Левина-ГРМ, BPLS – agar for the isolation of *Salmonella* фирмы «MERCK».

В качестве вспомогательных сред и сред сравнения для выделения энтеробактерий использованы:

- питательный бульон для накопления сальмонелл по Раппопорту – Вассилиадису сухой (RVS-бульон);
- транспортная питательная среда Кэри – Блэра;
- питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (агар Клиггера-ГРМ);
- питательная среда для выделения энтеробактерий сухая (агар Эндо-ГРМ);
- питательная среда с эозин-метиленовым синим сухая (среда Левина-ГРМ);
- питательная среда для выделения сальмонелл и шигелл сухая (SS-агар);
- селенитовый бульон для накопления сальмонелл;
- питательная среда для контроля микробной загрязнённости (цитратный агар Симмонса) (питательная среда № 14 ГРМ);
- среда Гисса с сорбитом, с индикатором;
- питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Гисса с глюкозой);
- питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Гисса с лактозой);
- среда с лизином;
- Ornitin Decarboxylase Broth HiMedia 0000238812;
- Gram Stain Kit REF 212539 LOT 4140910 2015 – 10-31 «Becton, Dickinson»;

– сыворотки ПЕТСАЛ СПБНИИВС диагностические сальмонеллезные адсорбированные для реакции агглютинации (РА), лиофилизат для диагностических целей.

Взятие исследуемого материала и посев на питательные среды проводили в соответствии с нормативными документами [6, 7, 11].

Результаты и обсуждение. ФБУН «ГНЦ ПМБ» выпускает среды для накопления и выделения сальмонелл и шигелл, такие как RVS-бульон, агар Плоскирева, SS-агар, агар Мак-Конки, висмут-сульфит-агар, XLD-агар. При разработке новых сред, в частности при планировании целенаправленных и организованных экспериментов по оптимизации состава, например БФЛС-агара, использован статистический метод с варьированием нескольких факторов, влияющих на качество питательной среды. Магниевая среда и БФЛС-ГРМ-агар – питательные среды, предназначенные для накопления и выделения сальмонелл из различных материалов, полностью адаптированы к сырьевой базе ФБУН «ГНЦ ПМБ» [10]. По результатам экспериментальных работ определён оптимальный компонентный состав отечественного БФЛС-агара, обладающего стабильными физико-химическими и биологическими свойствами. Качество разработанных сред оценивалось по основным биологическим показателям с использованием набора тест-штаммов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН «ГНЦ ПМБ». Проведена сравнительная оценка качества разработанной питательной среды с коммерческим аналогом BPLS – agar for the isolation of *Salmonella* фирмы «MERCK» (табл. 1).

Совокупность компонентов разработанной питательной среды для накопления сальмонелл (магниевой среды) обеспечивает питательные потребности для роста и накопления сальмонелл из исследуемых образцов различ-

Таблица 2

Показатели эффективности магниевой среды и RVS-бульона через 6 ч инкубации при 37,0 ± 1°C

Тест-штамм, разведение	Магниевая среда			Показатель эффективности
	рост на ГРМ-агаре (число колоний, морфология, диаметр в мм)			
	до подращивания	после подращивания		
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhimurium</i> 79, 10 ⁻⁶	20 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1500 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		75
<i>S. enterica</i> subsp. <i>abony</i> IHE 103/39, 10 ⁻⁶	8 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	820 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		102
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritidis</i> 11272, 10 ⁻⁶	33 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1500 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		45
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhi</i> «bismuth», 10 ⁻⁶	17 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	85 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>paratyphi</i> B 8006, 10 ⁻⁶	15 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1000 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		66
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> <i>meunchen</i> O ₆ , 10 ⁻⁶	22 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	517 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		24
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhimurium</i> 79, 10 ⁻⁶	46 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1200 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		26
<i>S. enterica</i> subsp. <i>abony</i> IHE 103/39, 10 ⁻⁶	21 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1000 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		47
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritidis</i> 11272, 10 ⁻⁶	40 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	1000 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		25
<i>S. enterica</i> subsp. <i>typhi</i> «bismuth», 10 ⁻⁶	12 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	4 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		-
<i>S. enterica</i> subsp. <i>paratyphi</i> B 8006, 10 ⁻⁶	27 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	45 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		16
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> <i>meunchen</i> O ₆ , 10 ⁻⁶	25 Круглые, бесцветные 2,0–2,5	390 Круглые, бесцветные 2,0–2,5		15

ной степени биологического загрязнения с показателем эффективности не менее 10. Селективные свойства среды основаны на низком значении pH и ингибирующем действии хлористого магния, малахитового зелёного, бриллиантового зелёного в отношении ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий. Разработанная магниевая среда по своим ингибирующим свойствам идентична RVS-бульону и обеспечивает визуальное отсутствие роста сопутствующих микроорганизмов в первые 6 ч инкубации посевов при 37 ± 1°C. Сравнительная характеристика эффективности накопления сальмонелл в магниевой среде и RVS-бульоне представлена в табл. 2.

В соответствии с ТУ эффективность магниевой среды должна быть не менее 10, что подтверждается экспериментальными данными.

В микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы г. Ярославля проведены клинико-лабораторные испытания на трёх сериях каждой из вышеуказанных питательных сред – БФЛС-ГРМ-агаре и магниевой среде. Образцы питательных сред представлены ФБУН «ГНЦ ПМБ» по акту передачи образцов. Средами сравнения для БФЛС-ГРМ-агара служили

SS-агар и среда Левина-ГРМ, для магниевой среды – селенитовый бульон, предоставленные ГУЗ ЯО «ИКБ № 1».

Испытания проводились в 2 этапа.

1-й этап: входной контроль предоставленных для испытания трёх серий каждой из испытываемых сред на соответствие требованиям, заложенным в ТУ и описанным в паспортах качества (внешний вид, растворимость, прозрачность и цветность раствора), определяя визуально, pH – потенциометрическим методом.

2-й этап: проводили испытания медицинских изделий БФЛС-ГРМ-агар по ТУ 9385-201-78095326-2013 и магниевой среды по ТУ 9385-228-78095326-2015 производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» с целью подтверждения возможности использования их по назначению.

Подготовка и исследование образцов клинического материала с использованием БФЛС-ГРМ-агара проведена в соответствии с приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 и приказом Минздрава СССР от 16.08.1989 № 475.

Исследовано в двух повторностях 520 образцов ПБА, поступивших в лабораторию для исследования от 520 пациентов, госпитализированных в различные отделения ГБУЗ ЯО «ИКБ». Клинический материал представлен 436 образцами испражнений (кал), 74 образцами мочи, 5 мазками из гнойных ожоговых ран, 5

образцами крови. Каждый образец зашифрован (номера всех образцов, указанных в протоколе, соответствуют номерам, присвоенным этим образцам в журнале регистрации ПБА, поступающих для исследования при энтеропатогенных инфекциях по форме 512/у (ГБУЗ ЯО «ИКБ»)). Каждый образец сопровождался направлением от лечащего врача с указанием предварительного диагноза (острые кишечные инфекции, пищевые токсикоинфекции, сепсис и т. д.) и необходимости культурального исследования на патогены, в том числе сальмонеллы. Посевы и учёт результатов проводились параллельно двумя специалистами (врач-бактериолог ГБУЗ ЯО «ИКБ» и сотрудник ФБУН «ГНЦ ПМБ») в разных помещениях одной лаборатории.

Доставленный в транспортной питательной среде Кэри – Блэра клинический материал засеивали на питательные среды Левина-ГРМ, SS-агар и испытываемый БФЛС-ГРМ-агар. Равные количества транспортных сред Кэри – Блэра с оставшимися в них образцами залиты соответственно селенитовым бульоном и магниевой средой для инкубации посевов с целью селективного накопления сальмонелл.

Ферментативные свойства клинических изолятов, подозрительных на сальмонеллы, выросших на БФЛС-ГРМ-агаре

Подозри- тельные колонии на БФЛС- ГРМ-агаре, № образца	Сероводород	Лактоза	Глюкоза (газ)	Сахароза	Мочевина	Подвижность	Индол	Фенилаланиндезаминаза	Цитрат Симмонса	Лизиндекарбоксилаза	Орнитиндекарбоксилаза	Сорбит	Мальтоза	Маннит	Дульцит	Рамноза	Ксилоза	Арабиноза	Инозит	Предва- рительная идентифика- ция (род)	Серовар
253	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
345	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
684	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
823	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>london</i>
955	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1229	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1249	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1251	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1663	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1803	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
343	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
371	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>stanley</i>
455	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
771	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>bovismorbificans</i>
865	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>enteritidis</i>
1163	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>	<i>virchow</i>

Через 24 ч инкубации посевов на плотных дифференциально-диагностических питательных средах учитывали рост колоний с характерной для искомым микроорганизмов морфологией: – круглые, гладкие, розового цвета диаметром от 1,5 до 3,0 мм на БФЛС-ГРМ-агаре и бледно-розовые с почернением или без него на SS-агаре и розовые на среде Левина.

По культуральным свойствам отобраны 112 чашек с ростом на SS-агаре, среде Левина-ГРМ, БФЛС-ГРМ-агаре, где обнаружены лактозоотрицательные колонии. Отобранные чашки с ростом – посев 59 образцов кала на SS-агаре, 59 образцов кала на среде Левина и 58 образцов на БФЛС-ГРМ-агаре.

По истечении срока накопления образцов в селени-товом бульоне и магниевой среде во всех посевах клинических образцов визуально наблюдался рост в виде диффузного помутнения с обесцвечиванием среды или без него. Из всех пробирок бактериологической петлём проводились штриховые пересевы на плотные среды: – среду Левина-ГРМ, SS-агар, агар Эндо-ГРМ. Посевы инкубировались 24 ч при 37 ± 1°С. Для дальнейшей идентификации отобрано 105 чашек с характерной для искомым микроорганизмов морфологией лактозоотрицательных колоний.

После накопления в селениновом бульоне выявлено 62 образца кала, а после накопления в магниевой среде – 53 образца кала, обсеменённые лактозоотрицательными микроорганизмами.

На чашках с посевами остальных образцов кала, мочи, гноя, крови подозрительных колоний не обнаружено ни на чашках с прямым посевом образцов, ни на чашках после накопления в магниевой среде и селениновом бульоне. Отрицательный результат посевов крови под-тверждён на анализаторе Vact/Alert 3D 60.

Подозрительные на принадлежность к роду *Salmo-nella* колонии по 1–6 с чашки идентифицировались по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным и антигенным свойствам. Рост колоний на SS-агаре, среде Левина-ГРМ, БФЛС-ГРМ-агаре пред-ставлен на рис. 1., см. обложку.

На отобранных чашках Петри с исследуемой и кон-трольными питательными средами обнаружены сфор-мированные колонии с типичной для сальмонелл мор-фологией. На SS-агаре наблюдался рост розовых, бесц-ветных колоний и колоний с чёрным центром, на среде Левина-ГРМ – розовых, бесцветных колоний и колоний тёмно-фиолетового цвета без металлического блеска, на БФЛС-ГРМ-агаре – розовых колоний и колоний жёлто-го цвета. Рост колоний на SS-агаре после накопления в магниевой среде и селениновом бульоне представлен на рис. 2 и 3, см. обложку.

После накопления в магниевой среде выявление сальмонелл упрощается, поскольку сопутствующая ми-крофлора после культивирования в средах накопления в значительной степени подавлена.

Ферментативные свойства бактерий, подозритель-ных на принадлежность к сальмонеллам, определялись на среде Клигера и средах длинного «пестрого ряда». После дополнительных тестов для всех лактозоотрица-тельных микроорганизмов, выросших на испытуемых средах, родовая и видовая принадлежность к сальмо-неллам подтверждена только у 16 изолятов, остальным отобранным образцам дано отрицательное заключение «патогенные энтеробактерии не обнаружены» (табл. 3).

Антигенные свойства определяли в РА на стекле с агглютинирующими моно- и поливалентными О- и Н-сальмонеллёзными сыворотками по четырёхкrest-ной системе (рис. 4, см. обложку).

Таблица 4

Выявляемость искомых микроорганизмов на испытуемой и контрольных средах при посеве клинического материала

Показатель	БФЛС-ГРМ-агар		Контрольная среда (SS-агар**)
	среднее значение	среднее значение	
	1-й специалист	2-й специалист	
Количество посевов клинических образцов	520	520	520
Количество положительных образцов*:	58	54	59
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enteritidis</i>	12	12	12
<i>S. enterica</i> subsp. <i>london</i>	1	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>stanley</i>	1	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>bovismorbificans</i>	1	1	1
<i>S. enterica</i> subsp. <i>virchow</i>	1	1	1
Лактозоотрицательные	42	38	43
Выявляемость и % ± m совпадений результатов исследования положительных проб	95 ± 2		95 ± 2

Примечание. * – при доверительной вероятности 90%, учёте среднего результата, полученного двумя специалистами на БФЛС-ГРМ-агаре; ** – на контрольной среде Левина-ГРМ получен аналогичный результат.

Сравнительная оценка выявляемости сальмонелл с использованием испытуемой и контрольных питательных сред из клинического материала представлена в табл. 4.

Выводы. Испытуемые среды: питательная среда для накопления сальмонелл сухая (магниева среда) и питательный агар с бриллиантовым зелёным, феноловым красным, лактозой и сахарозой сухой (БФЛС-ГРМ-агар) полностью соответствуют заявленным в ТУ требованиям по внешнему виду, растворимости, прозрачности, цветности и рН раствора.

Сравнительная оценка качества испытуемых сред и коммерческих аналогов по биологическим показателям на расширенном наборе тест-штаммов микроорганизмов доказывает полное соответствие назначению каждой из этих питательных сред и ряд преимуществ по показателям чувствительности и эффективности. БФЛС-ГРМ-агар в отличие от BPLS-agar for the isolation of *Salmonella* фирмы «MERCCK» обеспечивает рост, а, следовательно, и выделение из исследуемых образцов *S. gallinarum* 665 и *S. flexneri* 1a 8516. Количество прорастаемых от посевной дозы колоний в отношении *S. typhi* Н-901 ГДР/ГИСК на БФЛС-ГРМ-агаре более чем на 40% выше.

Магниева среда превосходит контрольный селенистый бульон по показателю эффективности накопления сальмонелл при инкубации посевов контрольных тест-штаммов микроорганизмов в течение 6 ч при 37 ± 1 °С и соответствует требованиям ТУ для данной среды с показателем эффективности более 10.

При исследовании 520 образцов клинического материала в микробиологической лаборатории Инфекционной клинической больницы г. Ярославля при посеве на БФЛС-ГРМ-агар и после инкубации посевов образцов в магниева среде с целью накопления сальмонелл выявлено 16 изолятов для дальнейшей идентификации. При

использовании контрольных питательных сред также выделено 16 изолятов сальмонелл.

Выявляемость результатов исследования положительных проб на контрольном БФЛС-ГРМ-агаре и контрольных SS-агаре и среде Левина-ГРМ составила 95 ± 2%.

Питательный БФЛС-ГРМ-агар и питательная магниева среда производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» полностью соответствуют требованиям, предъявляемым к средам аналогичного назначения.

Доказана возможность использования БФЛС-ГРМ-агара производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» с целью выделения сальмонелл наряду со средами аналогичного назначения.

Многолетний опыт производства и система контроля качества питательных сред гарантируют потребителям полное соответствие требованиям нормативной документации.

Использование разработанных питательных сред по совокупности признаков и достигаемому эффекту при проведении микробиологических исследований не меняют алгоритмы работы диагностических лабораторий практического здравоохранения.

Питательная магниева среда и питательный БФЛС-ГРМ-агар рекомендуются для выявления сальмонелл в клинической бактериологии.

Обоснованное применение отечественных питательных сред позволит в полном объёме удовлетворить потребности клинической и санитарной микробиологии и отказаться от импортных поставок, не снижая при этом качества микробиологических исследований. Это обеспечит поддержание безопасности Российской Федерации на должном уровне и адекватный ответ на возникающие вызовы и новые биологические угрозы.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Акимкин В.Г. Современные аспекты эпидемиологии и профилактики нозокомиального сальмонеллеза/Акимкин В.Г. *Медицинский совет*. 2013; 5-6: 33-9.
- Воробьев А.А., ред. *Медицинская микробиология, вирусология и иммунология*. Учебник для студентов медицинских вузов. 2-е изд., испр. и доп. М.: ООО Медицинское информационное агентство; 2012.
- Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин В.А., Алёшкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.
- Здравоохранение в России. Статистический сборник. М., 2017.
- Методические рекомендации по применению магниева среды для выявления сальмонелл из испражнений больных и носителей, пищевых продуктов, сточных жидкостей и воды открытых водоемов от 20.06.1973. М.: МЗ СССР; 1973.
- Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями. МУ 04-723/3. М.: МЗ СССР; 1984.
- Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. МУК 4.2.2316-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
- Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Клюкина Т.В. Основы клинической микробиологии и иммунологии: Учебное пособие. Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ; 2011.

9. Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. М.: Династия; 2017.
10. Шепелин И.А., Миронов А.Ю., Шепелин К.А. Питательные среды: Справочник бактериолога. 2-е изд. М: ЗАО А-Принт; 2015.
11. Приказ Минздрава СССР № 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений, 1985.
12. СП 3.1.7.2836-11. Профилактика сальмонеллеза. Санитарно-эпидемиологические правила. Изменения и дополнения № 1 к СП 3.1.7.2616-10. Зарег. в Минюсте РФ 14.03.2011 № 20089. М.; 2011.
13. Лабинская А.С., Блиникова Л.П., Ешена А.С. *Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований*. Учебное пособие. 2-е изд. СПб: Лань; 2017.
14. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Дятлов И.А. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение*. 2015; 56 (4): 39-43.
15. Шепелин А.П. Современное состояние и направления развития производства питательных сред в России. *Современная лабораторная диагностика*. 2015; 16 (2): 18-20.
16. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (6) : 63-5.
- for identifying Salmonella in feces of patients and carriers, food products, sewage and open reservoir water of 20.06.1973. Moscow: Minzdrav SSSR; 1973. (in Russian)
6. Guidelines for microbiological diagnosis of enterobacteria-associated diseases. MU 04-723/3. Moscow: Minzdrav SSSR; 1984. (in Russian)
7. Methods to control bacteriological nutrient media. Methodical instructions. MUK 4.2.2316-08. Moscow: Federal Center for Hygiene & Epidemiology. Rospotrebnadzor; 2008. (in Russian)
8. Mironov A.Yu., Kharseeva G.G., Klyukina T.V., eds. Fundamentals of clinical Microbiology and immunology [Osnovy klinicheskoy mikrobiologii i immunologii: Uchebnoe posobie]. Rostov-na-Donu: GOU VPO Rostovskiy gosudarstvennyi universitet; 2011. (in Russian)
9. Shepelin A.P., Dyatlov I.A. Culture media for enterobacteria [Pital'nye sredy dlya jenterobakteriy. Monografiya]. Moscow: Dinastiya; 2017. (in Russian)
10. Shepelin I.A., Mironov A.Yu., Shepelin K.A. Nutrient medium [Pital'nye sredy: Spravochnik bakteriologa]. 2nd ed. Moscow: ZAO A-Print; 2015. (in Russian)
11. The order of Ministry of Health, USSR No.535 On unification of microbiological (bacteriological) research methods being used by clinical diagnostic laboratories structured into medical-preventive institutions. 1985. (in Russian)
12. SR 3.1.7.2836-11 Prevention of salmonellosis. Sanitary and epidemiological rules. Moscow; 2011. (in Russian)
13. Labinskaya A.S., Blinnikova L.P., Eshena A.S. eds. Private medical Microbiology with technique of microbiological researches [Chastnaya medicinskaya mikrobiologiya s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij :Uchebnoe posobie] 2rd ed. St. Peterburg: Lan'; 2017. (in Russian)
14. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Dyatlov I.A. Nutrient media to identify staphylococci in clinical and sanitary microbiology. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2015; 56 (4): 39-43. (in Russian)
15. Shepelin A.P. Current state and directions of development of culture medium production in Russia. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 16 (2): 18-20. (in Russian)
16. Shepelin A.P. Modern approaches to the problem of import substitution in the production of culture media. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian)

REFERENCES

1. Akimkin V.G. Modern aspects of epidemiology and prevention of nosocomial salmonellosis. *Medsitsinskiy sovet*. 2013; 5-6: 33-9. (in Russian)
2. Vorob'ev A.A., ed. *Medical Microbiology, Virology and immunology* [Medsitsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: Uchebnik dlya studentov meditsinskikh vuzov]. 2nd ed. Moscow: OOO Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012. (in Russian)
3. Dyatlov I.A. The state and tendencies of development of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(8):61-5. (in Russian)
4. Health in Russia [Zdravoohranenie v Rossii]. Statisticheskij sbornik. Moscow; 2017. (in Russian)
5. Methodical recommendation of the use of Magnesium medium

Поступила 02.04.18
Принята к печати 25.05.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.842.23.083.137

Бынина М. П., Андрюков Б. Г., Матосова Е. В., Ляпун И. Н., Дробот Е. И.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СРЕДЫ СЕРОВА И ОСНОВЫ СЕЛЕКТИВНОГО АГАРА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЙ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова» (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г. П. Сомова), 690087, Владивосток, Россия

Интерес к проблеме энтеропатогенных иерсиниозов в мире связан с повсеместным распространением этих инфекций и клиническим значением их возбудителей – Yersinia enterocolitica и Yersinia pseudotuberculosis. Несмотря на появление новых средств диагностики, основным методом их верификации является культуральный. Американскими и Европейскими практическими руководствами рекомендован селективный питательный агар для иерсиний, который хорошо зарекомендовал себя во многих странах для выделения патогенных Yersinia из клинического материала. Проведено сравнение дифференциально-диагностических свойств этой питательной среды с одним из рекомендованных действующими отечественными нормативными документами субстратов для иерсиний – средой Серова. На основе проведённых исследований сделан вывод о том, что использование среды Серова для идентификации энтеропатогенных иерсиний по своим дифференциально-диагностическим свойствам не уступает зарубежному аналогу.

Ключевые слова: основа селективного агара для иерсиний; среда Серова; Yersinia enterocolitica; Yersinia pseudotuberculosis.

Для цитирования: Бынина М. П., Андрюков Б. Г., Матосова Е. В., Ляпун И. Н., Дробот Е. И. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических свойств среды Серова и основы селективного агара для выделения энтеропатогенных иерсиний. Клиническая лабораторная диагностика 2018; 63 (9): 564-567. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-564-567>

Bynina M. P., Andryukov B. G., Matosova E. V., Lyapun I. N., Drobot E. I.

A COMPARATIVE EVALUATION OF DIFFERENTIAL AND DIAGNOSTIC PROPERTIES OF THE SEROV'S AGAR MEDIUM AND THE BASE OF SELECTIVE AGAR FOR ISOLATING ENTEROPATHOGENIC YERSINIA

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

The interest in the problem of enteropathogenic yersinioses in the world is associated with the ubiquitous distribution of these infections and the clinical significance of their pathogenic agents, Yersinia enterocolitica and Y. pseudotuberculosis. In spite of the novel diagnostic tools, microbiological cultivation on nutrient media still remains the main method of their verification. As an agar of choice, American and European practical guidelines recommend a selective agar for Yersinia, which is widely used in many countries for isolating pathogenic Yersinia from clinical material. The authors compare the differential and diagnostic properties of the base of selective agar with those of the Serov's agar medium, as one of the substrates for Yersinia recommended by the current Russian regulatory documents. Based on the studies conducted, a conclusion has been made that the Serov's agar medium is not inferior to its foreign analogue in the differential and diagnostic properties for identification of enteropathogenic Yersinia.

Key words: the basis of selective agar for Yersinia; the Serov's agar medium; Yersinia enterocolitica; Yersinia pseudotuberculosis.

For citation: Bynina M. P., Andryukov B. G., Matosova E. V., Lyapun I. N., Drobot E. I. A comparative evaluation of differential and diagnostic properties of the Serov's agar medium and the base of selective agar for isolating enteropathogenic yersinia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (9): 564-567 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-564-567>

Information about authors:

Bynina M. P., <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>
Andryukov B. G., <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>
Matosova E. V., <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>
Lyapun I. N., <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>
Drobot E. I., <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

For correspondence: Bynina M.P., junior researcher of the laboratory of molecular microbiology; e-mail: marina.bynina@mail.ru

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 28.04.2018
Accepted 04.05.2018

Введение. Yersinia являются грамотрицательными бактериями, относящимися к семейству Enterobacteriaceae. На протяжении последних десятилетий энтеропатогенные

Для корреспонденции: Бынина Марина Павловна, мл. науч. сотр. лаб. молекулярной микробиологии; e-mail: marina.bynina@mail.ru

виды Y. enterocolitica и Y. pseudotuberculosis являются актуальными возбудителями таких серьёзных заболеваний людей и животных как кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулёз, характеризующихся различными клиническими проявлениями [1-3]. Интерес к проблеме иерсиниозов в мире, связанный с повсеместным распространением

этих инфекций и клиническим значением их возбудителей, возрастает с каждым годом [3, 4]. В значительной степени этому способствует генотипическая близость возбудителей иерсиниоза и псевдотуберкулеза с возбудителем чумы – *Yersinia pestis* [1, 5, 6].

Для изоляции *Yersinia* разработаны несколько питательных сред. Предложена основа селективного агара CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) в качестве альтернативы лактозосодержащим питательным средам MacConkey и Cellobiose-Arginine-Lysine (CAL-agar), используемым для выделения энтеропатогенных иерсиний [7, 8]. Добавление антибиотиков в эту питательную среду вызывает специфическое ингибирование грамотрицательных и грамположительных бактерий и высокую селективность в отношении выделения *Yersinia* spp. [3, 9].

Многолетнее использование основы селективного агара в бактериологических лабораториях зарубежных клиник при рутинных микробиологических исследованиях показало его высокую эффективность для идентификации энтеропатогенных иерсиний и селективные преимущества перед альтернативными питательными средами [3, 9]. Это дало основание авторитетным международным научно-медицинским обществам США (American Society for Microbiology, ASM) и Европы (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease, ESCMID) рекомендовать использование основы селективного агара CIN в качестве стандарта лабораторной практики для выделения иерсиний [8, 10].

Отечественными нормативно-методическими документами в качестве питательных сред для культивирования иерсиний в клинических, санитарно-эпидемиологических, научных микробиологических исследованиях рекомендовано использовать дифференциально-диагностические питательные среды: Эндо, с бромтимоловым синим (СБТС) и Серова^{1,2} [11]. Г. П. Сомов с соавт. в 2001 г. оценили селективные свойства указанных сред и сделали однозначные выводы в пользу среды Серова [12].

Цель работы состояла в сравнительном исследовании дифференциально-диагностических свойств питательной среды Серова и основы селективного агара для выделения энтеропатогенных бактерий рода *Yersinia*.

Материал и методы. В работе использованы клинические штаммы из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова: *Y. pseudotuberculosis* 512 (серотип 01b); *Y. enterocolitica* 4626 (серотип O:6.31).

Используемые питательные среды: дифференциально-диагностическая среда Серова для выделения иерсиний и основа селективного агара (HiMedia Laboratories) для выделения иерсиний, приготовленные в лаборатории питательных сред НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова.

Для посева на чашки с исследуемыми средами использовали суточную культуру, выращенную на питательном агаре. Культуру иерсиний на средах инкубировали в термостате при 37° С в течение 24 часов и подрачивали при комнатной температуре (22°-24° С). Для иерсиний дополнительная и параллельная инкубация посевов при комнатной температуре обеспечивает более четкое проявление биохимических свойств.

Описание культуральных свойств проводили визуально после окончательного культивирования. Морфологию микроорганизмов оценивали с использованием микроскопической системы после предварительной окраски бактерий по Граму. Одновременно проводили сравнительную оценку биохимических свойств выращивания культур.

Результаты. На среде Серова *Y. pseudotuberculosis* образовывали колонии неправильной формы диаметром до 5 мм, с перламутровым блеском и неровными фестончатыми краями и выпуклыми острыми темно-красными центрами. Поверхность колоний матовая. Консистенция плотная, при взятии петлей перемещается по поверхности среды (рис. 1, а, см.обложку).

На основе селективного агара колонии *Y. pseudotuberculosis* диаметром до 3 мм, круглые, с выпуклыми сосцевидными центрами малинного цвета. Периферическая зона прозрачная, нежная. Края ровные. Поверхность колоний блестящая. Легко снимается петлей (рис. 1, б, см.обложку).

Колонии *Y. enterocolitica* на среде Серова имели выпуклую форму в виде неправильных многоугольников с сосочками в центре темно-красного цвета. Края более светлые по сравнению с центром, опалесцирующие. Диаметр от 2 до 3 мм. Колонии более плотные по сравнению с *Y. pseudotuberculosis* и легко снимаются петлей (рис. 1, в, см.обложку).

На основе селективного агара колонии *Y. enterocolitica* правильной круглой формы, выпуклые, с более темными центрами и прозрачными краями. Блестящие, влажные («бычий глаз»). Диаметр до 3 мм. Колонии легко снимаются петлей (рис. 1, г, см.обложку).

На среде Серова клетки *Y. pseudotuberculosis* полиморфные, чаще овоидной формы. Располагаются по одному, в виде цепочек и небольшими скоплениями. Грамотрицательные. Окрашиваются биполярно (рис. 2, а).

На основе селективного агара *Y. pseudotuberculosis* полиморфной, чаще овоидной формы. Располагаются одиночно, короткими цепочками из 2-5 клеток или попарно. Грамотрицательные. Окрашивание равномерное и интенсивное (рис. 2, б).

На среде Серова клетки *Y. enterocolitica* полиморфные, чаще овоидной формы. С закругленными концами, мелкие. С выраженным биполярным окрашиванием. Грамотрицательные. Формирует короткие цепочки чаще из клеток овоидной формы (рис. 2, в).

На основе селективного агара *Y. enterocolitica* клетки палочковидные с закругленными краями и более удлиненной формы, чем на среде Серова (рис. 2, г).

Обсуждение. Многообразие клинических проявлений иерсиниозов часто скрывается под маской других заболеваний, поэтому правильная и своевременная верификация их возбудителей играют решающую роль в проведении лечебных и профилактических мероприятий [13].

За последние годы появились новые иммунологические и молекулярно-генетические технологии, позволившие значительно улучшить диагностику иерсиниозов [14, 15], но золотым стандартом по-прежнему остаётся культуральный метод, не утративший своего значения [1, 3, 16].

¹ Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. М.: Медицина; 1986.

² Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза: МУ 3.1.1.2438-09. М.: Госсанэпиднадзор; 2009.

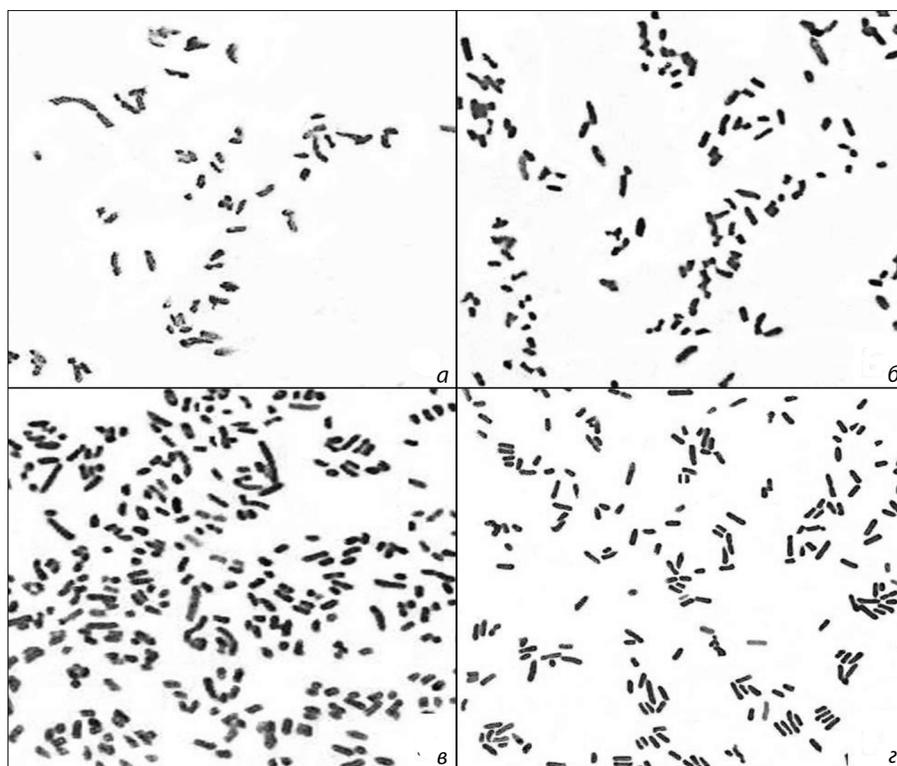


Рис. 2. Морфология *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* выращенные на среде Серова и на основе селективного агара. а – *Y. pseudotuberculosis* на среде Серова; б – *Y. pseudotuberculosis* на основе селективного агара; в – *Y. enterocolitica* на среде Серова; г – *Y. enterocolitica* на основе селективного агара.

Анализ состава исследуемых питательных сред позволяет выявить особенности селективного агара и дифференциально-диагностической среды Серова для выделения энтеропатогенных иерсиний (см. таблицу).

В среде Серова источником углерода служит мочевины и глюкоза, в соответствии с основными потребностями иерсиний. В качестве индикаторов используются водные растворы конго-рот и генцианвиолета, которые усиливают селективные свойства среды и при наложении друг на друга дают тёмно-красный цвет, что позволяет дифференцировать бактерии рода *Yersinia* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Добавление в среду 30% водного раствора сухой желчи подавляет рост *Proteae*. В качестве питательных веществ и для стимуляции роста – сухой агар и молибденовокислый аммоний. Генцианвиолет подавляет кокковую флору, находящуюся в исследуемом материале.

В основе селективного агара источником углерода служит маннит. Ингибитором грамположительной контаминирующей микрофлоры является дезоксихолат натрия, в качестве индикатора кислотообразования – генцианвиолет. Иерсинии окисляют маннит с образованием кислоты, поэтому колонии окрашиваются в красный цвет вследствие изменения цвета индикатора генцианвиолета. Источником питательных веществ необходимых для

роста микроорганизмов является агар-агар и дрожжевой экстракт. Пируват натрия ослабляет токсический эффект кислорода и способствуют росту иерсиний, тогда как хлорид натрия поддерживает осмотический баланс. Сульфат магния является поставщиком ионов магния, необходимых в различных ферментативных реакциях и репликации ДНК. Сопутствующая грамотрицательная микрофлора подавляется смесью антибиотиков (селективная CIN-добавка).

Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10273-2013 для выделения энтеропатогенных иерсиний из разных клинических материалов и пищевых продуктов (для ветеринарии) рекомендует использовать основу с селективными добавками³. Но при этом отсутствие разрешения на использование основы селективного агара в нормативной документации РФ ограничивает законность её применения в клинической микробиологии⁴.

При использовании с селективными добавками основа для выделения иерсиний рекомендуетсся Межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10273-2013 для выделения энтеропатогенных иерсиний из разных клинических материалов и пищевых продуктов (для ветеринарии). На территории РФ основа селективного агара для выделения иерсиний разрешена для продажи⁵.

³ГОСТ ISO 10273-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения условно-патогенной бактерии *Yersinia enterocolitica*. М.: Стандартинформ; 2014.

Приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. М.: Медицина; 1986.

⁵Регистрационное удостоверение на медицинское изделие МЗ РФ №2003/1663 от 23.12.2003 выданное Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (РОСЗДРАВНАДЗОР).

Состав исследуемых дифференциально-диагностических сред для выделения иерсиний

Дифференциально-диагностическая среда Серова	Основа селективного агара для иерсиний
Сухой агар	Агар-агар
Молибденовокислый аммоний	Дрожжевой экстракт
Конго-рот	Конго-рот
Генцианвиолета	Генцианвиолет
Раствор сухой желчи	Натрия дезоксихолат
Мочевина	Маннит
Глюкоза	Натрия пируват
Сода безводная	Магния сульфат
	Натрия хлорид
	Пептон специальный

Заключение. На основе проведенных исследований, можно сделать вывод о возможности использования основы селективного агара для идентификации энтеропатогенных бактерий рода *Yersinia*. Среда Серова, применяемая в РФ для идентификации иерсиний, по своим дифференциально-диагностическим свойствам не уступает основе селективного агара. Сложность в изготовлении среды Серова затрудняет её выпуск в промышленном масштабе, влияет на качество стандартизации и длительность приготовления в лабораторных условиях.

Стоит обратить внимание на то, что использование рекомендованных нормативными документами РФ питательных сред в научных микробиологических исследованиях, связанных с выделением *Yersinia*, ограничивает возможность публикаций полученных результатов в зарубежной печати.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-10, 13-16 см. REFERENCES)

- Смирнов И.В. Возбудитель иерсиниоза и близкие к нему микроорганизмы. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2004; 6(1): 10-21.
- Сомова Л.М., Андруков Б.Г., Плехова Н.Г. Проблема иерсиниозов в современном мире. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 12(4): 661-7.
- Панин А.Л., Краева Л.А., Сбойчаков В.Б., Белов А.Б., Болахан В.Н., Власов Д.Ю. и др. Микробиологический мониторинг иерсиний как основа санитарно - эпидемиологического надзора за иерсиниозами в организованных коллективах. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(3): 217-28.
- Сомов Г.П. Современное представление о сапронозах (основные итоги изучения проблемы). *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2001; 2. 67-73.

REFERENCES

- Smirnov I.V. The causative agent of yersiniosis and microorganisms close to it. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2004; 6 (1): 10-21 (in Russian)
- Somova L.M., Andrukov B.G., Plekhova N.G. The Yersinia-caused infections problem in modern world. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2015; 12 (4): 661-7. (in Russian)
- Tan L.K., Ooi P.T., Carniel E., Thong K.L. Evaluation of a modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar for isolation of *Yersinia* spp. *PLoS One*. 2014; 9(8):e106329.
- Galindo C.L. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J. Pathog.* 2011; 2011: 182051.
- Martínez-Chavarría L.C., Vadyvaloo V. Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis infection: a regulatory RNA perspective. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 956.
- Fukushima H., Gomyoda M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on cefsulodin-Irgasan-novobiocin agar. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24(1):116-20.
- Schiemann D.A. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* 1979; 25:1298-1304.
- Clinical microbiology procedures handbook. American Society Press for Microbiology. 6th. Henry D. Isenberg, ed. Washington DC: ASM Press; 2012.
- González M., Gude M.J., Seral C., Abad M.P., Algarate S. Castillo F. Comparación de dos métodos para la recuperación de *Aeromonas* spp. de heces a partir de agar CIN (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina). *Rev. Esp. Quimioter.* 2010; 23(4):217-8.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC. *Official Journal L262*. 2000:0021-0045.
- Panin A.L., Kraeva L.A., Sboychakov V.B., Belov A.B., Bolekhan V.N., Vlasov D.Yu. et al. Microbiological monitoring of *Yersinia* as the basis of sanitary and epidemiological surveillance of yersiniosis in organized groups. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3 (3): 217-28. (in Russian)
- Somov G.P. The modern idea of sapronoses (the main results of the study of the problem). *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2001; 2. 67-73. (in Russian)
- Dekker J.P., Frank K.M. *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Clin. Lab. Med.* 2015; 35(2): 225-46.
- Kalia V.C., Kumar P. Genome Wide Search for Biomarkers to Diagnose *Yersinia* Infections. *Indian. J. Microbiol.* 2015; 55(4): 366-74.
- Jaakkola K., Somervuo P., Korkeala H.. Comparative Genomic Hybridization Analysis of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* Identifies Genetic Traits to Elucidate Their Different Ecologies. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 760494.
- Priyanka B., Patil R.K., Dwarakanath S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian J. Med. Res.* 2016; 144(3):327-38.

Поступила 28.04.18
Принята к печати 04.05.18

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.46.03:616.314-089]:579.22

Царёв В.Н., Степанов А.Г., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С., Царёва Т.В.

КОНТРОЛЬ ПЕРВИЧНОЙ АДГЕЗИИ МИКРООРГАНИЗМОВ И ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЁНОК НА СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ТРАНСДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ ПРИ ЗУБОСОХРАНЯЮЩИХ ОПЕРАЦИЯХ

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия

Трансденальная имплантация – эффективный способ восстановления утраченных биомеханических свойств резецированного или ампутированного зуба. Выбор конструкционных материалов для имплантата с точки зрения адгезии к ним представителей агрессивной микробиоты является важнейшим этапом лечения.

Цель. Охарактеризовать адгезию микроорганизмов пародонтопатогенной и кариесогенной групп in vitro к экспериментальным образцам диоксида циркония и сплавам титана, используя культуральные и электронно-микроскопические методы оценки адгезии, как первого этапа формирования биоплёнки.

Образцы для эксперимента готовили в форме таблетки стандартной формы, на которые наносили исследуемые штаммы в количестве 10^6 КОЕ/мл. После стряхивания непритянувшихся клеток с помощью ультразвука производили высевы на плотные питательные среды для определения их количества. Всего в эксперименте было использовано 14 штаммов пародонтопатогенной и кариесогенной групп (включая три референс-штамма). Для визуализированной оценки адгезии микроорганизмов применяли сканирующую электронную микроскопию.

Исследования адгезии к никелиду титана и диоксиду циркония показали значительное её снижение для всех видов микроорганизмов. Во всех вариантах (со всеми штаммами) показатели адгезии к никелиду титана и диоксиду циркония были статистически достоверно ниже, чем при использовании образцов из традиционного титанового сплава. При проведении сканирующей электронной микроскопии на образцах диоксида циркония определялись единичные клетки тестовых штаммов пародонтопатогенных микроорганизмов, в то время как на сравниваемых конструкционных материалах наблюдали значительное количество клеток и начальную фазу формирования биоплёнки.

Диоксид циркония можно рассматривать как оптимальный материал выбора для изготовления трансденальных имплантатов, который по своим технологическим характеристикам и низким показателям адгезии микробов превосходит традиционно используемые сплавы титана.

Ключевые слова: трансденальная имплантация; адгезия микроорганизмов; биопленка; сканирующая электронная микроскопия; диоксид циркония; никелид титана; хронический апикальный периодонтит.

Для цитирования: Царёв В.Н., Степанов А.Г., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С., Царёва Т.В. Контроль первичной адгезии микроорганизмов и формирования биоплёнок на стоматологических материалах, используемых для трансденальной имплантации при зубосохраняющих операциях. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63 (9): 568-573

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-568-573>

Tsarev V.N., Stepanov A.G., Ippolitov E.V., Podporin M.S., Tsareva T.V.

CONTROL OF PRIMARY ADHESION OF MICROORGANISMS AND FORMATION OF BIOFILMS ON STOMATOLOGICAL MATERIALS USED FOR TRANSDENTAL IMPLANTATION IN DENTAL STABILIZING OPERATIONS

Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Yevdokimov. Ministry Of Health Of Russia, 127473, Moscow, Russia

Transdental implantation is an effective way to restore the lost biomechanical properties of a resected or amputated tooth. The choice of structural materials for the implant is the most important stage of treatment, in relation to the adhesion of aggressive microbiota to them.

To characterize the adhesion of microorganisms of periodontopathogenic and cariogenic groups in vitro to experimental samples of zirconium dioxide and titanium alloys using cultural and electronic microscopic methods of adhesion evaluation as the first stage of biofilm formation.

Samples for the experiment were prepared in the form of a tablet of standard form, on which the test strains were applied in an amount of 10^6 CFU/ml. After shaking the unattached cells with ultrasound, they were seeded into dense nutrient medium to determine their number. In total, 14 strains of periodontopathogenic and cariogenic groups (including 3 reference strains) were used in the experiment. Scanning electron microscopy was used to visualize the adhesion of microorganisms.

The results of the adhesion test to titanium nickelide and zirconium dioxide showed a significant reduction in adhesion for all microorganism species. In all variants (with all strains) the adhesion values to titanium nickelide and zirconium dioxide were statistically significantly lower than when using samples from a traditional titanium alloy. In scanning electron microscopy, single cells of test strains of periodontopathogenic microorganisms were determined on zirconium dioxide samples, while a considerable number of cells and the initial phase of biofilm formation were observed on the compared structural materials.

Zirconium dioxide can be considered as an optimal choice material for the manufacture of transdental implants, which, in terms of its technological characteristics and low adhesion characteristics of microbes, is superior to the traditionally used titanium alloys.

Key words: *transdental implantation; adhesion of microorganisms; biofilm; scanning electron microscopy; zirconium dioxide; titanium nickelide; chronic apical periodontitis.*

For citation: Tsarev V.N., Stepanov A.G., Ippolitov E.V., Podporin M.S., Tsareva T.V. Control of primary adhesion of microorganisms and formation of biofilms on stomatological materials used for transdental implantation in dental stabilizing operations. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (9): 568-573 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-568-573>

For correspondence: Tsarev V.N., Dr. Sci. Med., Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Yevdokimov; e-mail: nikola777@rambler.ru

Information about authors:

Tsarev V.N., <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>
Stepanov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-6543-0998>
Ippolitov E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1737-0887>
Podporin M.S., <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>
Tsareva T.V., <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 03.04.2018
Accepted 13.06.2018

Хронический апикальный периодонтит является одним из самых распространённых осложнений кариеса зубов (от 32 до 50% в сроки наблюдения в пределах двух–трёх лет после лечения), что связано с персистенцией очага инфекции в периодонте [1–3]. При этом в периодонтальном очаге обнаруживаются различные патогенные микроорганизмы. Установлено, что в корневых каналах зубов, поражённых хроническим периодонтитом, в 50–80% случаев выделены высоковирулентные штаммы микроорганизмов: стрептококки с гемолитической активностью, актиномицеты, грибы кандиды, пародонтопатогенные виды бактероидов, фузобактерии и трепонемы [4, 5]. Расположение очага инфекции внутри корневого канала создаёт благоприятные условия для размножения и поддержания воспаления. Постоянная активация макрофагов, лимфоцитов и нейтрофилов вызывает резорбцию костной ткани и формирование очага грануляции [6]. При длительном существовании патогенной грануляционной ткани нарушаются механические свойства зуба, что приводит к его потере [7].

В последние годы исследователи уделяют большое внимание изучению механизмов формирования микробных биоплёнок, формирующихся при проникновении микроорганизмов в полость зуба и дентинные каналы и соответственно к выяснению эффективности их эрадикации при различных видах эндодонтического лечения [8, 4, 9]. В частности, с помощью сканирующей электронной микроскопии впервые получены данные об obturации дентинных каналов образующимися биоплёнками и о возможности контроля их удаления при разных методиках лечения [4], разработка которых интенсивно продолжается [3, 5, 6, 9, 10].

Восстановление утраченных биомеханических свойств резецированного или ампутированного зуба решается путём их армирования стандартными эндодонто-эндооссальными или трансдентальными имплантатами, проходящими через зуб. В настоящее время предложены индивидуальные трансдентальные имплантаты, изготовленные из новых материалов на основе титана и диоксида циркония методом компьютерного фрезерования с корректируемыми параметрами физической формы [11, 12].

Появление новых конструкционных материалов поставило новые вопросы перед стоматологами, важнейшим из которых является обоснованный выбор конструк-

ционного материала для изготовления трансдентальных имплантатов с точки зрения адгезии к ним представителей агрессивной микробиоты и формирования биоплёнки [6, 10, 13]. Современные подходы к решению этого вопроса отражены в данном исследовании.

Цель исследования: охарактеризовать адгезию микроорганизмов пародонтопатогенной и кариесогенной групп *in vitro* к экспериментальным образцам диоксида циркония и сплавам титана, используя культуральные и электронно-микроскопические методы оценки адгезии, как первого этапа формирования биоплёнки.

Материал и методы. Для сравнительных исследований были выбраны следующие материалы, используемые для изготовления эндодонто-эндооссальных и индивидуальных фрезерованных трансдентальных имплантатов:

– диоксид циркония “Prettau” 95Н10 с химическим составом: ZrO_2 –95,0%, Y_2O_3 –4,0%, Al_2O_3 < 1%, SiO_2 –0,02%, Fe_2O_3 –0,01%, Na_2O –0,04% (фирмы “ZirkonZahn”, Италия);

– титановый сплав 5 95Н10 с химическим составом Ti–90%, Al–6%, V–3%, Fe < 1%, O < 1% (фирмы “ZirkonZahn”, Италия) – данный материал использовался в эксперименте в качестве контрольного;

– наноструктурированный никелид титана в комбинации с гранулятом пористого никелида титана (частицы размером 40–100 мкм) в аморфном наноструктурированном геле гидроксиапатита (частицы в гидратной оболочке 30–50 нм) (производство «Томского НИИ Медицинских материалов и имплантатов с памятью формы»).

Образцы для экспериментального исследования готовили в форме таблетки стандартной округлой формы (диаметром 5 мм, толщиной 1мм) с полированными поверхностями и краями в условиях зуботехнической лаборатории [7].

В качестве штаммов для изучения процессов адгезии к образцам материалов использовали клинические изоляты микробов пародонтопатогенной и кариесогенной групп, выделенных из полости рта стоматологических пациентов: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus intermedius*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Candida albicans* ATCC 90028™, *Candida krusei* (пародонтопатогенная группа), *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, Ac-

Результаты сравнительной оценки первичной адгезии микроорганизмов пародонтопатогенной группы к исследуемым образцам в эксперименте *in vitro*

Материал	<i>E. faecium</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>F. periodonticum</i>	<i>P. gingivalis</i>
Титановый сплав (контроль)	0,80±0,05**	0,65±0,04	0,72±0,04	0,82±0,06	0,63±0,05	0,65±0,05	0,85±0,05
Никелид титана	0,54±0,05*	0,52±0,04*	0,62±0,03*	0,71±0,03*	0,47±0,06*	0,44±0,05*	0,56±0,06*
Диоксид циркония	0,46±0,05**	0,40±0,05**	0,63±0,05*	0,68±0,05*	0,32±0,05**	0,31±0,04**	0,53±0,05*

Примечание. * – показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с контрольным сплавом ($p \leq 0,05$), ** – показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с титановым сплавом ($p \leq 0,05$).

tinomyces israelii, *Actinomyces odontolyticus*, *Lactobacillus casei* DN-11400, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 (ацидогенная или кариесогенная группа). Всего в эксперименте было использовано 11 штаммов – клинических изолятов и 3 референс-штамма.

Тест-штаммы наносили на поверхность образцов в виде взвеси с концентрацией микробных клеток по оптической плотности 6,0 McF/ml и проводили инкубацию во влажной камере, соблюдая условия анаэробнозиса, согласно общепринятой методике [14] с некоторыми модификациями. В частности, для удаления микроорганизмов, не вступивших в процесс адгезии, осуществляли следующие процедуры:

1. Образцы трижды отмывали в 10 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия для удаления всех не прилипших (не вступивших в специфическую адгезию) бактериальных (или дрожжевых) клеток.

2. Затем каждый образец помещали в специальные ёмкости, содержащие 1,0 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, и подвергали обработке в ультразвуковой ванне «UltraEst-M» («Геософт», РФ) с частотой 60 кГц в течение 10 мин. Это обеспечивало перевод во взвешенное состояние бактериальных (или дрожжевых) клеток, вступивших в процесс первичной адгезии с поверхностью исследуемого образца.

3. Далее из полученной взвеси делали посев на кровяной агар с гемином на основе Columbia Blood Agar Base (HiMedia Labs, Индия) для анаэробных бактерий и стрептококков или на селективную среду HiCrome Candida Agar (HiMedia Labs, Индия) для грибов кандиды путём отпечатков и распределяли микробные клетки по поверхности питательной среды стерильной платиновой петлёй для получения изолированных колоний.

4. Посевы помещали в анаэроустат и инкубировали при 37°C в анаэробных условиях (для анаэробных бактерий) или в обычных условиях при температуре 22–24°C (для дрожжевых грибов рода *Candida*).

Результаты получения изолированных колоний оценивали с помощью исследовательского стереомикроскопа (Nikon, Япония) и определяли их количество в КОЕ/мл. Затем вычисляли десятичный логарифм этой величины и рассчитывали индекс адгезии для каждого из исследуемых штаммов тестируемых микробов (определяли частное от деления величин десятичных логарифмов до и после постановки эксперимента).

Для визуализированной оценки адгезии микроорганизмов применяли сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) с использованием двулучевого микроскопа «Quanta 200 3D» (FEI Company, США) в режиме высокого вакуума, при ускоряющих напряжениях 5 кВт, с предварительным напылением золотом (999) в установке «SPI-Module Sputter/Carbon Coater System»

(SPI Inc. USA) на базе лаборатории анатомии микробов ЦНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАН.

Статистическую обработку результатов проводили по Манну–Уитни с использованием компьютерной программы Biostat 9,0 (достоверность при $p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение. Результаты сравнительной оценки первичной адгезии микроорганизмов пародонтопатогенной группы к образцам стоматологических материалов из металлов (диоксида циркония и сплавов титана), используемых для изготовления имплантатов, представлены в табл. 1

Из представленных результатов видно, что традиционный титан, используемый для изготовления трансдентальных имплантатов, отличается довольно высоким уровнем адгезии бактерий пародонтопатогенной группы и дрожжевых грибов – от 0,63–0,65 у *Prevotella intermedia*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium periodonticum* до 0,80–0,85 у *Enterococcus faecium*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida krusei*.

Результаты исследования адгезии к никелиду титана и диоксиду циркония свидетельствовали о значительном снижении адгезии для всех видов микроорганизмов. Разброс данных у никелида титана составлял от 0,44 у *Fusobacterium periodonticum* до 0,56 у *Porphyromonas gingivalis*. Максимальная адгезия была у грибов кандиды 0,62–0,71. Разброс данных для диоксида циркония был несколько ниже и составлял от 0,31–0,32 у *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium periodonticum* до 0,40–0,46 у *Streptococcus intermedius*, *Enterococcus faecium*. Максимальная адгезия была отмечена у грибов *Candida*, и показатели достоверно не отличались от таковых у образцов никелида титана – 0,63–0,68.

Во всех вариантах (со всеми штаммами) показатели адгезии к никелиду титана и диоксиду циркония были статистически достоверно ниже, чем при использовании образцов из титанового сплава. Однако следует подчеркнуть, что большая часть микробов пародонтопатогенной группы (кроме грибов кандиды и *Porphyromonas gingivalis*) продемонстрировала более низкие и статистически достоверные показатели адгезии к диоксиду циркония по сравнению с таковыми к никелиду титана.

При проведении сканирующей электронной микроскопии установлено, что соотношение площади, занимаемой исследуемыми штаммами, составляло 1:4:10 (диоксид циркония: никелид титана: титановый сплав). Достоверных различий между грамположительными и грамотрицательными бактериями не выявлено. На образцах диоксида циркония определялись единичные клетки тестовых штаммов пародонтопатогенных микроорганизмов *P. gingivalis*, в то время как на сравниваемых конструкционных материалах наблюдали начальную фазу формирования биоплёнки (рис. 1).

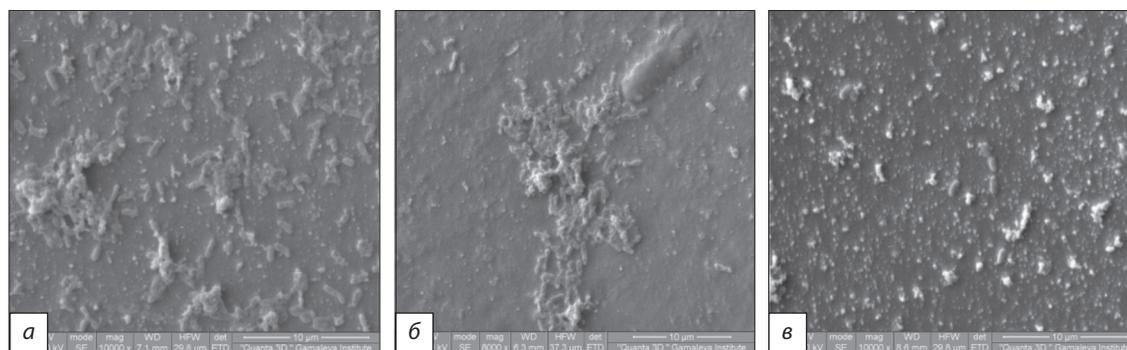


Рис. 1. Адгезия бактерий *P. gingivalis* к образцам материалов, используемых для изготовления трансдентальных имплантатов. СЭМ. Ув. 8000–10 000).

a – многочисленные делящиеся бактериальные клетки, формирующие групповые скопления – начальная фаза формирования биоплёнки на поверхности титанового сплава; *б* - массивное групповое скопление бактериальных клеток – начальная фаза формирования биоплёнки на поверхности никелида титана; *в* - единичные бактериальные клетки на образцах из диоксида циркония – признаков формирования биоплёнки не выявлено.

Таблица 2

Результаты сравнительной оценки первичной адгезии микроорганизмов пародонтопатогенной группы к исследуемым образцам в эксперименте *in vitro*

Материал	<i>S. sanguis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>A. israelii</i>	<i>A. odontolyticus</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>
Титановый сплав (контроль)	0,74±0,04	0,82±0,03	0,80±0,06	0,76±0,05	0,42±0,04	0,46±0,05*
Никелид титана	0,51±0,04*	0,54±0,04*	0,57±0,04*	0,45±0,03*	0,25±0,04*	0,25±0,03*
Диоксид циркония	0,50±0,05*	0,33±0,05**	0,55±0,04*	0,44±0,04*	0,22±0,04*	0,24±0,04*

Примечание. * – показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с контрольным сплавом ($p < 0,05$), ** – показатель адгезии достоверно ниже по сравнению с титановым сплавом ($p < 0,05$).

Аналогичные результаты получены при проведении СЭМ с тестовыми штаммами дрожжевых грибов *C. albicans* (рис. 2).

Следовательно, на основании представленных сравнительных данных изучения адгезии к образцам материалов в эксперименте *in vitro* и методом СЭМ можно сделать заключение, что диоксид циркония оказывает более выраженное антиадгезивное действие как на грамотрицательные, так и на грамположительные пародонтопатогенные бактерии, чем сплав никелида титана и

титановый сплав. Исключение составляют *Porphyromonas gingivalis* и дрожжевые грибы *C. albicans*, которые не имели различий при исследовании образцов диоксида циркония и никелида титана. Однако диоксид циркония, так же как и сплав никелида титана, достоверно снижал показатели адгезии *Porphyromonas gingivalis* и дрожжевых грибов рода кандиды в отличие от титанового сплава.

Результаты сравнительной оценки первичной адгезии микроорганизмов кариесогенной группы к образцам

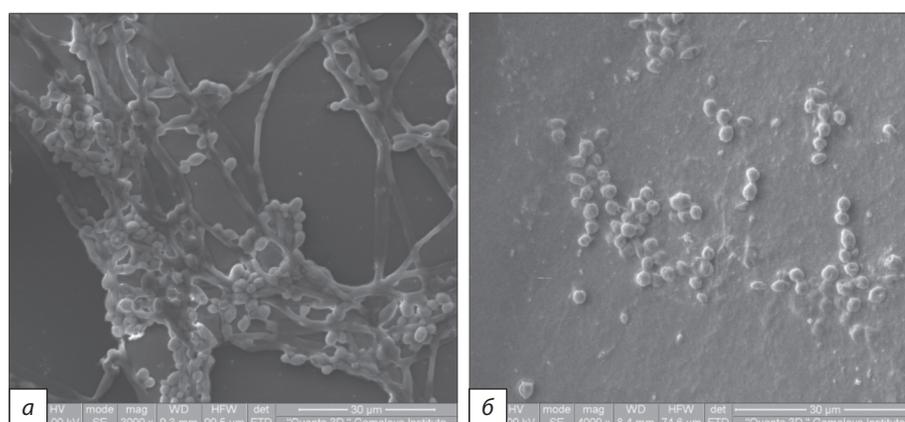


Рис. 2. Адгезия дрожжевых грибов *C. albicans* к образцам материалов, используемых для изготовления трансдентальных имплантатов. СЭМ. Ув. 3000-4000.

a - многочисленные делящиеся дрожжевые клетки, формирующие нитевидные элементы и мантию биоплёнки – выраженная фаза формирования биоплёнки на поверхности титанового сплава; *б* - единично расположенные дрожжевые клетки на поверхности диоксида циркония – признаков формирования биоплёнки не выявлено.

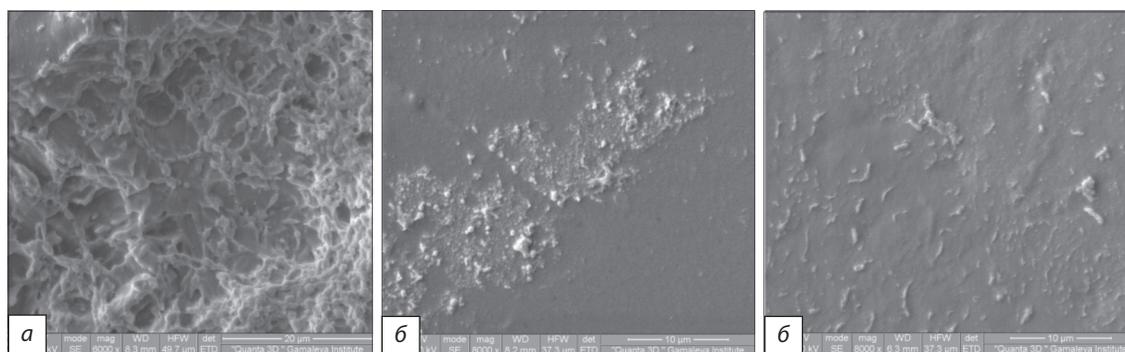


Рис. 3. Адгезия бактерий *S. mutans* к образцам материалов, используемых для изготовления трансдентальных имплантатов. СЭМ. Ув. 8000–10 000).

a - многочисленные делящиеся бактериальные клетки, формирующие групповые скопления с элементами мантии, - начальная фаза формирования биоплёнки на поверхности титанового сплава; *б* - массивное групповое скопление бактериальных клеток – начальная фаза формирования биоплёнки на поверхности никелида титана; *в* - единичные бактериальные клетки на образцах из диоксида циркония – признаков формирования биоплёнки не выявлено.

стоматологических материалов из металлов (диоксида циркония и титанового сплава), используемых для изготовления имплантатов, представлены в табл. 2.

Как видно из представленных результатов, разброс данных для титанового сплава был весьма значительным: от относительно низких показателей адгезии – 0,42–0,46 у представителей молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* – до крайне высоких – 0,74–0,82 у актиномицетов и кислотопродуцирующих стрептококков.

При исследовании образцов никелида титана и диоксида циркония мы наблюдали значительное снижение показателей адгезии при сохранении данной тенденции. Так, адгезия молочнокислых бактерий составляла 0,25 у никелида титана и 0,22–0,24 у диоксида циркония. Показатели адгезии других кариесогенных видов колебались в пределах 0,45–0,57 для образцов никелида титана и 0,33–0,55 для образцов диоксида циркония. Максимальная адгезия к образцам диоксида циркония была отмечена у актиномицетов и *Streptococcus sanguinis*, при этом показатели адгезии достоверно не отличались от таковых у образцов никелида титана, но были статистически достоверно ниже, чем у традиционного титана. Кроме того, следует подчеркнуть, что наиболее чувствительным к диоксиду циркония оказался *Streptococcus mutans*, показатель адгезии которого составил 0,33 против 0,54 у никелида титана.

При проведении СЭМ установлено, что соотношение площади, занимаемой исследуемыми штаммами стрептококков и актиномицетов, составляло 1:5:15 (диоксид циркония: никелид титана: титановый сплав). Несколько ниже был уровень адгезии лактобацилл и бифидобактерий – 1:3:10 (диоксид циркония: никелид титана: титановый сплав). На образцах диоксида циркония определялись единичные клетки тестовых штаммов кариесогенных микроорганизмов, на образцах никелида титана – отдельные группы клеток тестовых штаммов, а на титановом сплаве наблюдали начальную фазу формирования биоплёнки (рис. 3).

Следовательно, во всех вариантах со всеми штаммами кариесогенной группы микробов показатели адгезии к никелиду титана и диоксиду циркония были статистически достоверно ниже, чем при использовании образ-

цов из титанового сплава, что подтверждено данными СЭМ.

Как показали наши исследования по изучению микробной адгезии *in vitro* с электронно-микроскопическим контролем результатов эксперимента, адгезивные свойства представителей пародонтопатогенной и кариесогенной микробиоты полости рта диоксида циркония оказались статистически достоверно ниже, чем у образцов из сплавов титана, что позволяет рассматривать конструкционные материалы на основе диоксида циркония как оптимальные материалы для изготовления индивидуальных трансдентальных имплантатов.

Заключение. Таким образом, полученные результаты сравнительного изучения адгезии микробов *in vitro* позволяют сделать заключение, что антиадгезивные свойства в отношении представителей пародонтопатогенной и кариесогенной микробиоты полости рта у образцов из диоксида циркония обуславливают минимальную адгезию всех изученных представителей пародонтопатогенной и кариесогенной групп, включая грибы рода *Candida*, а диоксид циркония можно рассматривать как конкурентоспособный материал для изготовления трансдентальных имплантатов. По своим технологическим характеристикам и низким показателям адгезии микроорганизмов, диоксид циркония превосходит традиционные используемые сплавы титана и является оптимальным конструкционным материалом для изготовления трансдентальных имплантатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнов С.Д., Диханова В.Г., Брусов И.А. Алгоритмы эндодонтического лечения как фактор адекватного выбора и соблюдения медицинских технологий. *Эндодонтия Today*. 2011;1:67-70.
2. Вейсгейм Л.Д., Дубачева С.М., Гаврикова Л.М. Эффективность комплексного лечения хронического деструктивного апикального периодонтита. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2015;1:150.
3. Миронова В.В., Физюкова Г.Г., Соломатина Н.Н. Современные методы диагностики и лечения хронического верхушечного периодонтита. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2011;3:96-101.

4. Царев В.Н., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В. Применение сканирующей электронной микроскопии и биореактора для оценки эрадикации микробной биопленки корневых каналов при эндодонтическом лечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017;8(62):506-511.
5. José F. Siqueira Jr, Henrique S. Antunes, Isabela N. Rôças, Caio T. C. C. Rachid, Flávio R. F. Alves. Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162887.
6. Царёв В.Н., Дмитриева Л.А., Ипполитов Е.В., Нисанова С.Е. Последовательное применение антибактериальных и детоксицирующих препаратов при эндодонтическом лечении хронического апикального периодонтита (клинико-экспериментальное исследование). *Эндодонтия Today*. 2013;1:8-14.
7. Арутюнов С.Д., Ибрагимов Т.И., Царев В.Н., Лебеденко И.Ю., Савкина Н.И., Трефилов А.Г., Арутюнов Д.С., Климашин Ю.И. Микробиологическое обоснование выбора базисной пластмассы съёмных зубных протезов. *Стоматология*. 2002;3(81):4-8.
8. Диденко Л.В., Автандилов Г.А., Ипполитов Е.В., Царева Е.В., Смирнова Т.А., Шевлягина Н.В., Царев В.Н. Формирование биопленок на стоматологических полимерных материалах как основа персистенции микроорганизмов при патологии зубов и пародонта. *Эндодонтия Today*. 2015;4:13-17.
9. Su L., Gao Y., Yu C., Wang H., Yu Q. Surgical endodontic treatment of refractory periapical periodontitis with extraradicular biofilm. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 110(1): e40-4.
10. Оганыян А.И., Цаликова Н.А. Применение штифтовых конструкций из диоксида циркония для восстановления культи зуба. *Dental Forum*. 2013; 5(51): 45.
11. Арутюнов С.Д., Степанов А.Г., Зязиков М.Д., Деев М.С. Применение индивидуальных трансдентальных имплантатов, фрезерованных методом CAD/CAM технологий. *Dental Forum*. 2015; 1(56): 54-9.
12. Степанов А.Г., Зязиков М.Д. Экспериментальное определение физико-механических параметров, повышающих внутрикорневую фиксацию индивидуальных трансдентальных имплантатов, изготовленных CAD/CAM фрезерованием. *Стоматология*. 2015; 2(94): 100-1.
13. Тригolos Н.Н. Клинические аспекты патогенеза хронического верхушечного периодонтита. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2014; 2(42):18-23.
14. Давыдова М.М., Плахтий Л.Я. Методы микробиологического исследования, применяемые в стоматологии. В кн.: Царев В.Н. ред. *Микробиология, вирусология и иммунология полости рта*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009:260-5.
2. Veysgeym L.D., Dubacheva S.M., Gavrikova L.M. Efficiency of complex treatment of chronic destructive apical periodontitis. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2015; 1: 150. (in Russian)
3. Mironova V.V., Fizyukova G.G., Solomatina N.N. Modern methods of diagnosis and treatment of chronic apical periodontitis. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskij zhurnal*. 2011; 3: 96-101. (in Russian)
4. Tsarev V.N., Podporin M.S., Ippolitov E.V. The application of scanning electronic microscopy and bio-reactor for evaluating eradication of microbial biofilm of root channels under endodontic treatment. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017;8(62):506-11. (in Russian)
5. José F. Siqueira Jr, Henrique S. Antunes, Isabela N. Rôças, Caio T. C. C. Rachid, Flávio R. F. Alves. Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. *PLoS One*. 2016; 11(9): e0162887.
6. Tsarev V.N., Dmitrieva L.A., Ippolitov E.V., Nisanova S.E. The consistent application of antimicrobial and detoxifying agents with chronic apical periodontitis endodontic treatment (clinical and experimental study). *Endodontiya Today*. 2013; 1: 8-14. (in Russian)
7. Arutyunov S.D., Ibragimov T.I., Tsarev V.N., Lebedenko I.Yu., Savkina N.I., Trefilov A.G., Arutyunov D.S., Klimashin Yu.I. Microbiological substantiation of the choice of basic plastics of removable dentures. *Stomatologiya*. 2002; 3 (81): 4-8. (in Russian)
8. Didenko L.V., Avtandilov G.A., Ippolitov E.V., Tsareva E.V., Smirnova T.A., Shevlyagina N.V., Tsarev V.N. The formation of biofilms on dental polymeric materials as the basis for the persistence of microorganisms in the pathology of teeth and periodontium. *Endodontiya Today*. 2015; 4: 13-7. (in Russian)
9. Su L., Gao Y., Yu C., Wang H., Yu Q. Surgical endodontic treatment of refractory periapical periodontitis with extraradicular biofilm. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod*. 2010; 110(1): e40-4.
10. Oganyan A.I., Tsalikova N.A. The use of zirconia dioxide pins to restore the stump of the tooth. *Dental Forum*. 2013; 5 (51): 45. (in Russian)
11. Arutyunov S.D., Stepanov A.G., Zyazikov M.D., Deev M.S. The use of individual transcendental implants, milled by CAD / CAM technology. *Dental Forum*. 2015; 1 (56): 54-9. (in Russian)
12. Stepanov A.G., Zyazikov M.D. Experimental determination of physico-mechanical parameters increasing intra-root fixation of individual transcendental implants made by CAD / CAM milling. *Stomatologiya*. 2015; 2 (94): 100-1. (in Russian)
13. Trigolos N.N. Clinical aspects of the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Volgogradskij nauchno-medicinskij zhurnal*. 2014; 2 (42): 18-23. (in Russian)
14. Davydova M.M., Plakhtiy L.Ya. Methods of microbiological research used in dentistry. In the book: Tsarev V.N., ed. *Mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya polosti рта*. Moscow: GEOTAR-Media; 2009: 260-5. (in Russian)

REFERENCES

1. Arutyunov S.D., Dikhanova V.G., Brusov I.A. Algorithms of endodontic treatment as a factor of adequate choice and adherence to medical technologies. *Endodontiya Today*. 2011; 1: 67-70. (in Russian)

Поступила 03.04.18
Принята к печати 13.06.18

ПОЛИРЕЗИСТЕНТНАЯ МИКРОФЛОРА В СТРУКТУРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА

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

Целью работы являлось исследование структуры и определение фенотипов антибиотикорезистентности микрофлоры, выделенной из крови пациентов многопрофильного стационара за период с 2013 по 2017 г. Взятие материала осуществлялось во флаконы BacT/ALERT, содержащие питательные среды, с последующей инкубацией крови. В случае положительного результата материал из флаконов рассевался на плотные питательные среды. Видовая идентификация проводилась с использованием коммерческих биохимических тест-систем API и методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Оценка антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов выполнялась классическим диско-диффузионным методом. С 2013 по 2017 г. было проведено 3504 исследования крови, из них 16,8% дали положительные результаты. Из выделенных штаммов 69,6% являлись грамположительными, 27% – грамотрицательными, 3,4% относились к грибам. В структуру грамположительных бактерий входили *Staphylococcus* spp. – 71,46%, *Enterococcus* spp. – 21,22% и *Streptococcus* spp. – 7,32%. Среди стафилококков преобладали *S. aureus* (47,8%) (в 62,14% случаев являлись метициллинрезистентными) и коагулазонегативные стафилококки. Среди представителей рода *Enterococcus* преобладали *E. faecalis* (27% резистентны к макролидам, 14% – к фторхинолонам) и *E. faecium* (69% резистентны к пеницилинам, фторхинолонам, макролидам). Среди стрептококков были выделены *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и стрептококки из группы альфа-зеленящих. Клинически значимые виды стрептококков в 33,3% случаев были резистентны к макролидам и фторхинолонам. В структуре грамотрицательных бактерий преобладали *Enterobacteriaceae* – 71,07% (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*); доля неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ) составила 28,93%. Большинство грамотрицательных бактерий являлись продуцентами бета-лактамаз расширенного спектра. В структуре НФГОБ выделялись *Acinetobacter baumannii* – 56,5% (81% полирезистентны), *Pseudomonas aeruginosa* – 30,4% (50% – продуценты карбапенемаз), *Stenotrophomonas maltophilia* – 10,9% и другие. Таким образом, микробиологическое исследование крови при септических состояниях является неотъемлемой частью диагностического поиска, выбора этиотропной терапии и мониторинга её эффективности.

Ключевые слова: сепсис; антибиотикорезистентность; полирезистентность; продуценты бета-лактамаз расширенного спектра; неферментирующие грамотрицательные бактерии; внутрибольничные инфекции.

Для цитирования: Козлов А.В., Гусякова О.А., Лямин А.В., Кецко Ю.Л., Халиулин А.В., Ерещенко А.А. Полирезистентная микрофлора в структуре микроорганизмов, выделенных из крови пациентов многопрофильного стационара. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 574-578. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-574-578>

Kozlov A.V., Gusyaykova O.A., Lyamin A.V., Kezko J.L., Khaliulin A.V., Ereshchenko A.A.

POLYRESISTENT MICROFLORA IN THE STRUCTURE OF MICROORGANISMS DIVIDED FROM BLOOD OF PATIENTS OF THE GENERAL HOSPITAL

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia.

The aim of our research was to evaluate the structure and the determination of the phenotypes of antibiotic resistance of microflora isolated from patients' blood in a multidisciplinary hospital during the period from 2013 to 2017. The material was taken into BacT / ALERT bottles containing nutrient media, followed by incubation of blood. In case of a positive result, the material from the vials was dispersed into dense nutrient media. Species identification was carried out using commercial biochemical API test systems and MALDI-TOF mass spectrometry. The antibiotic resistance of the isolated microorganisms was evaluated by a classical disc-diffusion method. From 2013 to 2017, 3504 blood tests were performed, of which 16.8% were positive. Of the isolated strains, 69.6% were Gram-positive, 27% were Gram-negative, and 3.4% were fungi. The structure of Gram-positive bacteria included *Staphylococcus* spp - 71.46%, *Enterococcus* spp. - 21.22% and *Streptococcus* spp - 7.32%. *Staphylococcus aureus* (47.8%) prevailed among staphylococci (in 62.14% were methicillin-resistant) and coagulase-negative staphylococci. Among the genus *Enterococcus* spp, *Enterococcus faecalis* prevailed (27% resistant to macrolides, 14% to fluoroquinolones) and *Enterococcus faecium* (69% resistant to penicillins, fluoroquinolones, macrolides). *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and streptococci from the group of alpha-greening were isolated from streptococci. Clinically significant types of streptococci in 33.3% were resistant to macrolides and fluoroquinolones. In the structure of gram-negative bacteria, *Enterobacteriaceae* prevailed - 71.07% (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*); the proportion of non-fermenting Gram-negative bacteria (NFGOB) was 28.93%. Most Gram-negative bacteria were producers of extended-spectrum beta-lactamases (BLBRs). In NFGOB structure allocated *Acinetobacter baumannii* - 56.5% (81% polyresistant), *Pseudomonas aeruginosa* - 30.4% (50% - Carbapenemase Producing Organisms), *Stenotrophomonas maltophilia* - 10.9%. Thus, microbiological research in septic blood conditions is an integral part of the diagnostic search, selection of etiotropic therapy and monitoring of its effectiveness.

Key words: sepsis; antibiotic resistance; polyresistance; producers of expanded-spectrum beta-lactamase; non-fermenting gram-negative bacteria; nosocomial infection.

For citation: Kozlov A.V., Gusyaykova O.A., Lyamin A.V., Kezko J.L., Khaliulin A.V., Ereshchenko A.A. Polyresistent microflora in the structure of microorganisms divided from blood of patients of the general hospital. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (9): 574-578 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-574-578>

For correspondence: *Kozlov Andrey Vladimirovich*, assistant of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics; e-mail: kozlov.biochemistry@yandex.ru

Information about authors:

Kozlov A.V. <https://orcid.org/0000-0001-9384-6854>

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

Khaliulin A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4689-8904>

Gusyakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>

Kezko J.L. <https://orcid.org/0000-0002-2749-8692>

Ereshchenko, A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4221-4440>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 16.05.2018

Accepted 25.05.2018

Введение. Сепсис в настоящее время рассматривается как результат бесконтрольного системного воспалительного ответа на присутствие инфекционного агента в организме [1]. Септические состояния являются одной из актуальных медико-социальных проблем, обусловленной высокой летальностью (по данным ряда авторов, до 50% случаев сепсиса заканчиваются летально [2–4]), сложностью диагностики и высокими финансово-экономическими затратами [5]. На сегодняшний день наиболее часто сепсис встречается в хирургической практике, в отделении реанимации интенсивной терапии, гематологии, онкологии, гинекологии [6].

Терминологически для характеристики ответа организма на генерализованную инфекцию, кроме понятия «сепсис», используют также «тяжёлый сепсис», «септический шок», «синдром полиорганной дисфункции», «рефрактерный септический шок». Описанный понятийный аппарат был предложен в 1992 г. Американским колледжем пульмонологов и Обществом специалистов критической медицины (ACCP/SCCM) и включает ряд клинических, лабораторных и патогенетических признаков, отображающих глубину и тяжесть системного воспалительного ответа. В 2016 г. произошёл «переломный» момент во взглядах мирового медицинского сообщества на проблему сепсиса, что было отражено в сохранении двух чётко сформулированных понятий «сепсис» и «септический шок». Остальные классификационные группы ACCP/SCCM было рекомендовано исключить из использования [7]. Клинически тяжёлые состояния пациентов с сепсисом в отделениях ОРИТ оценивают с использованием набора клинико-прогностических шкал, позволяющих стратифицировать риск развития жизнеугрожающих осложнений в ряде случаев. Для определения и анализа степени органной дисфункции используют шкалу SOFA, которая учитывает состояние 6 систем организма. При этом ограничения применения данной шкалы связаны с детским возрастом пациентов, а также невозможностью оценки интенсивности проводимой терапии. [8]

С точки зрения диагностики септических состояний ситуация далеко неоднозначная и обусловлена в основном тем, что сепсис как клиничко-лабораторный синдром не имеет патогномоничных признаков и достаточно часто протекает в форме «масок» под видом неинфекционных заболеваний. Принимая во внимание, что любой инфекционный процесс – это взаимоотношение макро- и микроорганов, на современном этапе ведутся поиски специфичных и чувствительных маркёров системного воспалительного ответа со стороны организма, и в качестве таковых рассматриваются С-реактивный белок, интерлейкин-6, прокальцитонин, пре-сепсин. Однако необходимо отметить, что широкое использование определения уровней специфических белков привело к тому, что накопился достаточный практический опыт, показывающий, что биомаркёры не всегда обладают достаточной специфичностью и чувствительностью, соответственно трудности в дифференциации инфекционного или неинфекционного начала системного воспалительного ответа сохраняются [9]. Так, определение уровня С-реактивного белка для диагностики бактериального сепсиса всё больше критикует-

ся исследователями [10] в силу его неспецифичности и повышения при синдроме системной воспалительной реакции без наличия инфекции. Прокальцитонин является наиболее широко используемым маркёром, но и этот специфический белок обладает некоторыми ограничениями его использования как показателя инфекционной этиологии системного воспалительного ответа, что отражено в результатах исследований ряда авторов. Перспективным на настоящий момент представляется относительно новый предиктор сепсиса – пре-сепсин, являющийся растворимой частью комплекса CD14-липополисахарид-липополисахаридсвязывающий белок. Данный биомаркёр позволяет определить наличие сепсиса, тяжесть его течения, спрогнозировать осложнения и провести мониторинг эффективности антибактериальной терапии, но всё же подобрать этиотропное лечение на основании этого показателя не представляется возможным [11–13].

Наиболее надёжным подтверждением участия микроорганизмов в развитии септических состояний является выделение возбудителей из крови. В связи с этим встаёт вопрос об обязательном культуральном исследовании крови с целью выделения и идентификации этиологического фактора, хотя по данным ряда авторов, частота выявляемости положительных гемокультур при подозрении на сепсис колеблется от 23 до 45% [12, 14], что связано с нарушением правил взятия материала для исследования, недостаточной его кратностью, предшествующим применением антибактериальной химиотерапии, ингибиторными свойствами крови [4, 10]. Тем не менее ценность получаемых лабораторных данных при микробиологическом исследовании гемокультур сложно переоценить по причине возможности назначения этиотропной терапии и исключению эмпирического подбора антимикробного препарата из группы антибиотиков широкого спектра действия.

Отдельно необходимо отметить проблему полирезистентных микроорганизмов, которые будучи этиологическим фактором сепсиса во много раз усложняют терапевтическую тактику ведения пациента, увеличивают затраты на лечение, а также повышают смертность [15]. При этом в последнее время намечается тенденция к изменению спектра наиболее актуальных возбудителей сепсиса, и если раньше причинами сепсиса в основном являлись грамположительные кокки, то сейчас значимую долю «виновников» сепсиса чаще составляют грамотрицательные микроорганизмы – представители родов *Esherichia*, *Klebsiella* [15, 16].

Целью работы было исследование структуры и определение фенотипов антибиотикорезистентности микрофлоры, выделенной из крови пациентов многопрофильного стационара за период с 2013 по 2017 г.

Материал и методы. Исследование проведено на базе клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» (стационар учреждения рассчитан на 1100 коек). Взятие материала осуществлялось во флаконы BacT/ALERT, содержащие питательные среды для выделения аэробных и анаэробных микроорганизмов и адсорбирующие полимерные гранулы для возможности анализа образцов от пациентов, которым уже проводится антибактериальная те-

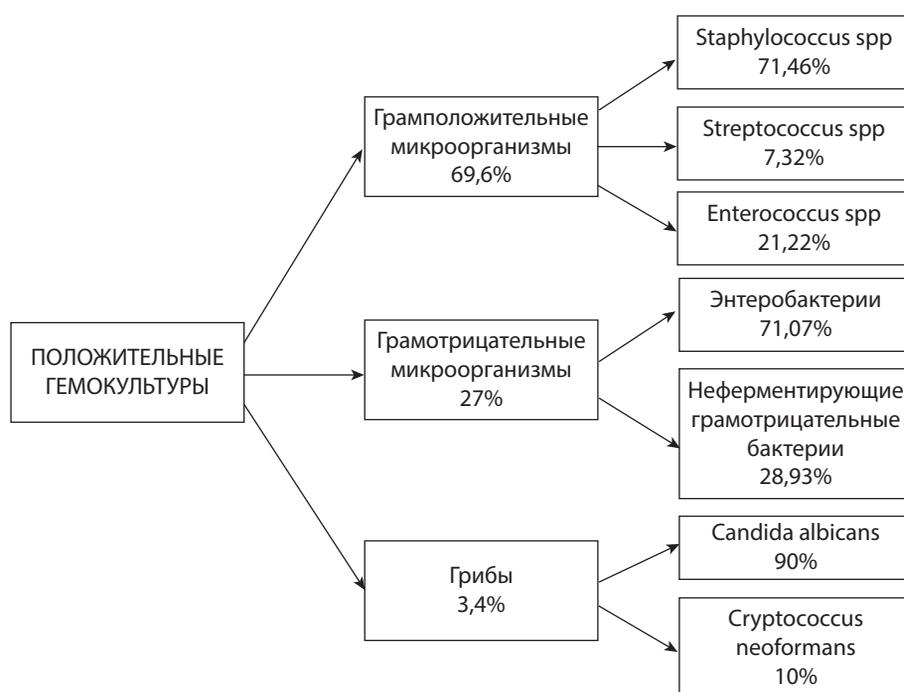


Рис. 1. Структура микрофлоры, выделенной из крови пациентов (клиники СамГМУ, 2013–2017 гг.).

рапия. Далее выполнялась первичная инкубация крови с помощью бактериологического анализатора BacT/ALERT 3D («bioMérieux»). В случае положительного результата материал из флаконов рассевался на плотные питательные среды: 5% кровяной агар, коммерческие хромогенные дифференциально-диагностические среды, среду Сабуро, агар Эндо. Для видовой идентификации в период исследований с 2013 по 2015 г. применялись коммерческие биохимические тест-системы API, с 2016 по 2017 г. стал доступен метод MALDI-TOF масс-спектрометрии при помощи масс-спектрометра Microflex LT («Bruker»). Оценка чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам проводилась классическим диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.1890-04, с 2015 г. использовались вновь вышедшие клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». У всех энтеробактерий в дополнение к основным методам определения антибиотикорезистентности осуществлялось выявление продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) с помощью метода двойных дисков. Среди неферментирующих грамотрицательных бактерий (НФГОБ) выявлялись штаммы, продуцирующие металло-бета-лактамазы с помощью метода двойных дисков с ЭДТА.

Результаты и обсуждение. Всего за период с 2013 по 2017 г. было проведено 3504 исследования крови, выявлено 589 (16,8%) случаев положительных посевов. При этом количество грамположительных микроорганизмов составило 69,6% (410), количество грамотрицательной флоры – 27% (159) и 3,4% (20) микроорганизмов относилось к грибам. Структура выделенной из крови пациентов микрофлоры представлена на рис. 1.

При рассмотрении состава грамположительной флоры отмечается наиболее частое выделение *Staphylococcus aureus* (47,8%) и коагулазонегативных стафилококков – их количество составило 52,2% от общего числа всех стафилококков. В основном это были *S. haemolyticus* (47,2% от общего числа коагулазонегативных стафилококков), *S. epidermidis*

(36%), *S. hominis* (16,8%). Данные микроорганизмы нередко являются представителями контаминирующей микрофлоры: их однократное выделение отмечалось у 97,6% пациентов, двукратное – у 1,6%, трёхкратное – у 0,8%. Данный факт демонстрирует низкую вероятность их участия в патологическом процессе. Результаты оценки антибиотикорезистентности выделенных штаммов *Staphylococcus* spp. представлены на рис. 2. Следует отметить, что 62,14% (87) выделенных изолятов *S. aureus* являлись метициллинрезистентными (MRSA), приоритетная роль данных возбудителей в развитии септических осложнений и распространении внутрибольничных инфекций (ВБИ) подтверждается данными и зарубежных исследователей [18, 19]. Среди коагулазонегативных стафилококков количество резистентных к оксациллину составило 56,86% (87), что свидетельствует о возможной контаминации проб микроорганизмами из внутрибольничной среды. Однако не стоит полностью исключать роль данных микроорганизмов в развитии патологических процессов, особенно у

пациентов с иммуносупрессией. Известно, что *S. epidermidis* выделяет протеолитические ферменты, схожие с протеазами *S. aureus*. Они имеют высокую гомологию аминокислотной последовательности цистеиновых протеаз, что указывает на их способность разрушать эластин, ингибитор плазмينا альфа-1, фибриноген и фибронектин [17].

Также была проведена оценка чувствительности к антибиотикам представителей рода *Enterococcus*. Были выделены 2 вида: *E. faecalis* и *E. faecium*. Среди *E. faecalis* 27% штаммов были резистентны к макролидам, 14% к фторхинолонам, в то время как в структуре *E. faecium* 69% штаммов проявляли антибиотикорезистентность к пенициллинам, фторхинолонам, макролидам. Среди представителей рода *Streptococcus* были выделены такие виды, как *S. pneumoniae* (56,7% от общего числа *Streptococcus* spp.), *S. pyogenes* (30%), 13,3% составили стрептококки из группы альфа-зеленящих: *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*. Данные микроорганизмы являются представителями нормальной флоры кожи и слизистых оболочек человека, соответственно их присутствие также может являться результатом контаминации. Среди клинически значимых видов стрептококков количество штаммов, резистентных к макролидам и фторхинолонам, составило 33,3%.

Особый интерес вызывает идентификация и исследование свойств грамотрицательной флоры, так как именно эти микроорганизмы наиболее часто вырабатывают механизмы резистентности к антибактериальным препаратам и дезинфицирующим средствам и как следствие являются возбудителями ВБИ. Среди бактерий семейства Enterobacteriaceae преобладали *Klebsiella pneumoniae* – 48,2% (54) и *Escherichia coli* – 41,1% (46). Также были выделены и идентифицированы бактерии рода *Enterobacter* – *E. cloacae* и *E. aerogenes*, их доля составила 8% (9). Кроме этого, встречались единичные штаммы энтеробактерий *Citrobacter koseri*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* – 2,7% (рис. 3).

При оценке антибиотикорезистентности выяснилось, что большинство возбудителей являются продуцентами БЛРС: среди *K. pneumoniae* их количество составило 77,8%



Рис. 2. Антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных из крови пациентов (клиники СамГМУ, 2013–2017 гг.).

(42), *E. coli* – 67,4% (31) и практически все представители рода *Enterobacter* – 88,9% (8). Таким образом, в нашем исследовании количество резистентных штаммов составило 71,7% от общего числа энтеробактерий, что примерно сопоставимо с данными по регионам РФ [20]. В отношении БЛРС-продуцирующих штаммов препаратами выбора должны являться карбапенемы, однако их высокая стоимость и необходимость сохранения в качестве препаратов резерва подталкивает к использованию ингибиторозащищённых пенициллинов и цефалоспоринов, что нередко является менее эффективным. Высокая выявляемость данных микроорганизмов подчёркивает необходимость проведения противоэпидемических мероприятий, включающих не только рациональное и обоснованное назначение антимикробных препаратов, но и регулярную ротацию дезинфицирующих средств.

Наиболее сложная ситуация обстоит с НФГОБ. Характерным признаком для микроорганизмов данной группы является их широкая распространённость во всех экологических нишах, однако попадая в больничную среду, отдельные представители НФГОБ приобретают патогенные свойства и выполняют ведущую роль в развитии нозокомиальных инфекций. В современной клинической и лабораторной практике важное значение имеет своевременное и качественное выделение из гемокультур НФГОБ, поскольку данные возбудители отличаются природной устойчивостью к ряду антибиотиков, значительно ограничивая клиницистов в выборе терапии, способностью образовывать биоплёнки на различных поверхностях, а также невосприимчивостью к некоторым дезинфицирующим средствам. Вызываемые данными микроорганизмами инфекции характеризуются тяжёлым длительным течением и высоким уровнем летальности. Все это в совокупности значительно осложняет терапию и приводит к распространению инфекций, вызванных этими микроорганизмами, возникновению ВБИ. В нашем исследовании из положительных гемокультур в структуре НФГОБ наиболее часто выделялись *A. baumannii* – 56,5% и *P. aeruginosa* – 30,4%, также были идентифицированы *Stenotrophomonas maltophilia* – 10,9% и 1 штамм *Achromobacter xylosoxidans* 2,2%.

Исследование антибиотикорезистентности НФГОБ также является важным этапом диагностики, так как у этой

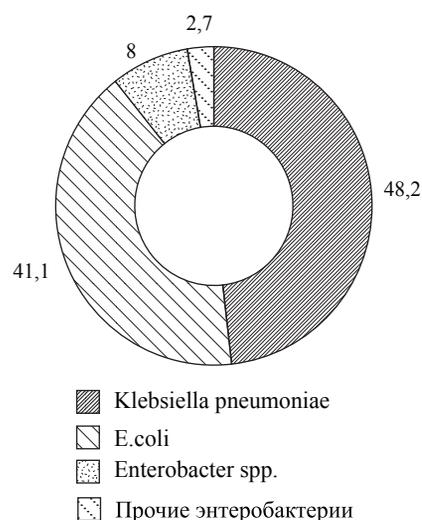


Рис. 3. Структура бактерий семейства Enterobacteriaceae, выделенных из крови пациентов (клиники СамГМУ, 2013–2017 гг.).

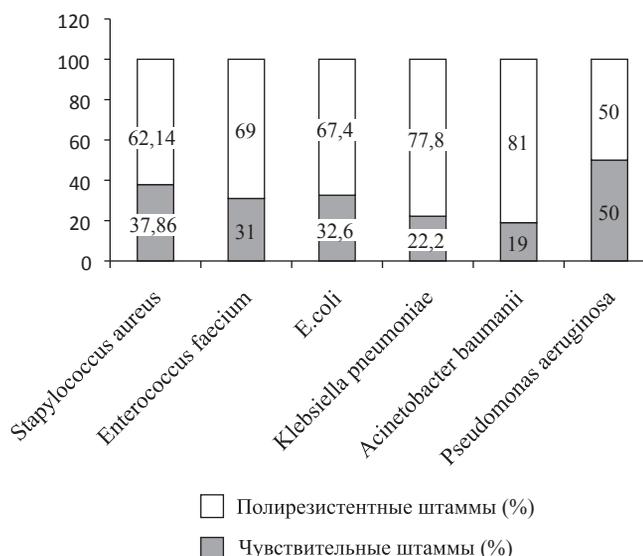


Рис. 4. Антибиотикорезистентность микрофлоры, выделенной из крови пациентов (клиники СамГМУ, 2013–2017 гг.).

группы микроорганизмов возможно формирование нескольких механизмов приобретённой устойчивости к антибактериальным препаратам; помимо продукции БЛРС, они нарушают проницаемость внешней мембраны микробной клетки, изменяют мишени действия препарата, обеспечивают функционирование системы активного выброса (эффлюкса) антибактериальных препаратов и выделяют металло-β-лактамазы (что делает невозможным применение карбапенемов). В нашем исследовании 81% штаммов *A. baumannii* проявляли полирезистентность, а среди *P. aeruginosa* 50% являлись продуцентами карбапенемаз, что значительно усложняло подбор этиотропного лечения и тактику ведения пациента, так как бактериемия, вызванная синегнойной палочкой, характеризуется высокой летальностью – до 40–50% и требует незамедлительной терапии [21].

Сводные результаты оценки антибиотикорезистентности выделенных микроорганизмов представлены на рис. 4.

Таким образом, микробиологическое исследование крови при септических состояниях является неотъемлемой частью не только диагностического поиска, но и мониторинга состояния пациента. Современные методы диагностики, такие как масс-спектрометрия, обеспечивают качественную и быструю видовую идентификацию, что позволяет своевременно назначить адекватную этиотропную терапию, а проведение исследований на антибиотикорезистентность даёт возможность её коррекции, что в целом способствует более быстрому выздоровлению пациента, снижению возможности развития осложнений, сокращению количества койко-дней, уменьшению экономического ущерба. Также информация о родстве возбудителей и их основных механизмах резистентности позволяет проводить эффективные противоэпидемические мероприятия, направленные на предотвращение формирования дополнительных факторов невосприимчивости к антибиотикам и дезинфицирующим средствам и распространения ВБИ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кишкун А.А. Современные технологические возможности этиологической диагностики сепсиса. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 9: 58.
2. Будкевич Л.И., Ликманов А.У., Сошкина В.В. Роль прокальцитонинового теста в ранней диагностике сепсиса у детей с обширными ожогами. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2011; 56(6): 107-13.
3. Грувер К.П. Диагностика и терапия сепсиса на современном этапе. *Детские инфекции*. 2011; 10(1): 14-8.
4. Боронина Л.Г. 5-летний опыт применения количественного исследования прокальцитонина при диагностике бактериемий и сепсиса. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2015; 4(55): 35-40.
6. Черенькая Т.В. Методы лабораторной диагностики возбудителей сепсиса. *Антибиотики и химиотерапия*. 2010; 55(5-6): 58-63.
7. Алиев С.А., Алиев Э.С., Ибрагимов Ф.И. Сепсис: эволюция взглядов, унификация критериев, дефиниции терминологии и классификации в свете современных представлений. Обзор литературы. *Вестник хирургической гастроэнтерологии*. 2017; 2: 8-16.
8. Козлов В.К. Сепсис, тяжелый сепсис, септический шок: патогенетическое обоснование диагноза, клиническая интерпретация, принципы и методология диагностики. *Клинико-лабораторный консиллиум*. 2014; 2(49): 20-40.
9. Руднов В.А. Сепсис: современные подходы к диагностике и интенсивной терапии (часть первая). *Вестник анестезиологии и реаниматологии*. 2010; 7(1): 48-57.
10. Звягин А.А., Демидова В.С., Смирнов Г.В. Биологические маркеры в диагностике и лечении сепсиса (обзор литературы). *Раны и раневые инфекции*. 2016; 3(2): 19-23.
11. Вельков В.В. Использование биомаркера «Пресепсин» для ранней и высокоспецифичной диагностики сепсиса. *Раны и раневые инфекции. Журнал имени профессора Б.М. Костюченко*. 2015; 2(1): 54-82.
12. Гординская Н.А., Лебедев М.Ю., Преснякова М.В. Значение определения пресепсина в диагностике сепсиса у пациентов с тяжелой термической травмой. *Вопросы травматологии и ортопедии*. 2014; 1(8): 7-11.
13. Русанова Е.В., Лопатин А.Ф. Микробиологические аспекты диагностики сепсиса. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 9: 59.
14. Лабинская А.С., Волина Е.Г., ред. *Руководство по медицинской микробиологии. Книга 3, том 2*. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2008.
15. Черенькая Т.В., Борисова Л.А., Александрова И.В., Косолапов Д.А. Этиологическая структура возбудителей бактериемии и сепсиса у больных реанимационного профиля в стационаре скорой помощи. *Неотложная медицинская помощь*. 2013; 2: 15-16.
16. Кишкун А.А. Диагностика и мониторинг эффективности лечения сепсиса с позиции доказательной медицины. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 9: 58-9.
20. Эдельштейн М.В., Строчунский Л.С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2005; 7(4): 323-36.

REFERENCES

1. Kishkun A.A. Modern technological possibilities of etiological diagnostics of sepsis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 9: 58. (in Russian)
2. Budkevich L.I., Lekmanov A.U., Soshkina V.V. Role of procalcitonin test in the early diagnosis of sepsis in children with extensive burns. *Rossiyskiy vestnik perionatologii i pediatrii*. 2011; 56(6): 107-13. (in Russian)
3. Gruver K. P. Diagnosis and Therapy of Sepsis at the Present Stage. *Detskie infektsii*. 2011; 10(1): 14-8. (in Russian)
4. Boronina L.G. Five years experience in the application of quantitative research procalcitonin in the diagnosis of bacteremia and sepsis. *Vestnik ural'skoy meditsinskoj akademicheskoy nauki*. 2015; 4(55): 35-40. (in Russian)
5. Moore L.J., Moore F.A., Jones S.L. et al. «Sepsis in general surgery: a deadly complication». *The American Journal of Surgery*. 2009; 198: 868-74.
6. Chemenkaya T.V. Methods for Laboratory Diagnosis of Sepsis Pathogens. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2010; 55(5-6): 58-63. (in Russian)
7. Aliev S.A., Aliev E.S., Ibrahimov F.I. Sepsis: evolution of views, unification of criteria for the definition of terminology and classification in the light of modern views. A review of the literature. *Vestnik khirurgicheskoy gastroenterologii*. 2017; 2: 8-16. (in Russian)
8. Kozlov V.K. Sepsis, severe sepsis, septic shock: pathogenetic consideration of the diagnosis, clinical interpretation, principles and methodology of diagnostics. *Kliniko-laboratornyi konsilium*. 2014; 2(49): 20-40. (in Russian)
9. Rudnov V.A. Sepsis: current approaches to diagnosis and intensive care (part one). *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2010; 7(1): 48-57. (in Russian)
10. Zvyagin A.A., Demidova V.S., Smirnov G.V. Biological marker medications in the diagnosis and treatment of sepsis (literature review). *Rany i ranevye infektsii*. 2016; 3(2): 19-23. (in Russian)
11. Vel'kov V.V. Use of the biomarker presepsin for the early and highly specific diagnosis of sepsis. *Rany i ranevye infektsii. Zhurnal imeni professora B.M. Kostjuchyonka*. 2015; 2(1): 54-82. (in Russian)
12. Gordinskaya N.A., Lebedev M.Yu., Presnyakova M.V. Significance of presepsin detection in sepsis diagnostics in patients with severe thermal injuries. *Voprosy travmatologii i ortopedii*. 2014; 1(8): 7-11. (in Russian)
13. Rusanova E.V., Lopatin A.F. Microbiological aspects of the diagnosis of sepsis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 9: 59. (in Russian)
14. Labinskaja A.S., Volina E.G., ed. *Manual on Medical Microbiology. Book 3, Volume 2. [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Kniga 3, tom 2]*. Moscow: BINOM. Laboratoriya znanij; 2008. (in Russian)
15. Cheren'kaja T.V., Borisova L.A., Aleksandrova I.V., Kosolapov D.A. The etiological structure of bacteremia and sepsis causative agents in patients with intensive care in an emergency hospital. *Neotlozhnaya meditsinskaja pomoshch'*. 2013; 2: 15-6. (in Russian)
16. Kishkun A.A. Diagnosis and monitoring of the effectiveness of the treatment of sepsis from the perspective of evidence-based medicine. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 9: 58-9. (in Russian)
17. Oleksey A., Golonka E., Banbuna A., et al. Growth phase-elastolytic cysteine proteinase by Staphylococcus epidermidis. *Biol. Chem*. 2004; 385: 525-35.
18. Loffler C.A., MacDougall C. Update on prevalence and treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2007; 5: 961-81.
19. Diab M., El-Damarawy M., Shemis M. Rapid identification of methicillin-resistant staphylococcal bacteremia among intensive care unit patients. *Medscape J. Med*. 2008; 10: 126.
20. Jedel'shtejn M.V., Strachunskij L.S. Trends in the Prevalence and Susceptibility of ESBL-producing Enterobacteriaceae to Various Antimicrobial Agents in Russian ICUs. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2005; 7(4): 323-36. (in Russian)
21. Osmon S., Ward S., Fraser V.J., Kollef M.H. Hospital mortality for patients with bacteremia due to Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa. *Chest*. 2004; 125: 607-16.

Поступила 16.05.18

Принята к печати 25.05.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.336.31-053.31-053.3

В. М. Червинец¹, Ю. В. Червинец¹, О. А. Петрова¹, Л. К. Антонова¹, С. В. Погасян¹, Е. Б. Ганина¹, А. Ю. Миронов²

МИКРОБИОТА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА НОВОРОЖДЕННЫХ ПЕРВОГО МЕСЯЦА ЖИЗНИ В ТВЕРСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава РФ, 170100, Тверь;

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

*Цель работы – выявить особенности формирования в Тверской области микробиоты желудочно-кишечного тракта у новорождённых первого месяца жизни. Для определения спектра и количества микроорганизмов ротовой жидкости и кишечника исследованы образцы ротовой жидкости, мекония, кала новорождённых детей первого месяца жизни от 21 недоношенного ребёнка и 38 доношенных детей обоего пола. Выявлено, что у доношенных младенцев, рождённых естественным путём, микробиота полости рта и кишечника характеризуется большим многообразием, чем у детей после оперативного родоразрешения, у которых отсутствовали лактобациллы, бифидобактерии, кишечная палочка, фузобактерии, клостридии, вейлонеллы. У недоношенных младенцев, особенно рождённых оперативным путём, выявлено резкое уменьшение частоты встречаемости и количества представителей нормальной ротовой и кишечной микробиоты, увеличение условно-патогенных грибов рода *Candida*. Показана эффективность действия *L. rhamnosus* и *L. paracasei*, выделенных из кишечника новорождённых, по отношению к тестовым условно-патогенным и патогенным культурам микроорганизмов, наиболее часто вызывающих инфекционный процесс в желудочно-кишечном тракте детей.*

Ключевые слова: микробиота; желудочно-кишечный тракт; новорождённые

Для цитирования: Червинец В. М., Червинец Ю. В., Петрова О. А., Антонова Л. К., Погасян С. В., Ганина Е. Б., Миронов А. Ю. Микробиота желудочно-кишечного тракта новорождённых первого месяца жизни в Тверской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (9): 579-583. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-579-583>

Chervinets V.M.¹, Chervinets Yu.V.¹, Petrova O.A.¹, Antonova L.K.¹, Pogasyan S.V.¹, Ganina E.B.¹, Mironov A.Yu.²
GASTROINTESTINAL MICROBIOTA OF THE NEWBORNS OF THE FIRST MONTH OF LIFE OF THE TVER REGION

¹Tver State Medical University, Tver¹, 170100;

²Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named by G. N. Gabrichevskogo, 125212, Moscow

*The purpose of our work was to identify the features of the newborn's microbiota formation during first month of their life on the model of the Tver region. The samples of oral fluid, meconium and feces of the first month newborns were examined in 38 full-term and 21 premature children of both sexes to determine the spectrum and quantity of oral fluid and intestine microorganisms. As the result, it was found that in full-term and vaginally delivered infants the microbiota of the oral cavity and intestine was characterized by greater diversity than in children delivered by C-section, in which Lactobacilli, Bifidobacteria, E. coli, Fusobacteria, Clostridia, and Veilonella were lacked. In premature infants, especially delivered by C-section, there was a sharp decrease in the incidence and number of representatives of normal oral and intestinal microbiota and an increase in opportunistic pathogens, for example yeast fungi of the genus Candida. The efficacy of *L. rhamnosus* and *L. paracasei*, isolated from the intestines of newborns, was shown in relation to conditionally pathogenic and pathogenic cultures of microorganisms that most often cause an infectious process in the gastrointestinal tract of children.*

Key words: microbiota; gastrointestinal tract; newborns.

For citation: Chervinets V. M., Chervinets Yu. V., Petrova O. A., Antonova L. K., Pogasyan S. V., Ganina E. B., Mironov A. Yu. Gastrointestinal microbiota of the newborns of the first month of life of the Tver region. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (9): 579-583 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-579-583>

For correspondence: Chervinets V. M., Doctor of Medical Sciences, professor, head of the department of microbiology and virology with course of immunology; e-mail: chervinets@mail.ru

Information about author:

Червинец Ю.В., <https://orcid.org/0000-0001-9209-7839>

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-523>

Ганина Е.Б., <https://orcid.org/0000-0002-8686-8526>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 28.05.2018

Accepted 13.06.2018

Введение. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) – комплексная экосистема, представленная ассоциацией резидентной микробиоты и клетками различных фенотипических

Для корреспонденции: Червинец Вячеслав Михайлович, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии; e-mail: chervinets@mail.ru

линий эпителиальной стенки. Взаимно дополняя друг друга, организм и бактерии образуют единую симбиотическую систему [1]. Организм представляет не только среду обитания, находясь в состоянии динамического равновесия с собственной микрофлорой, но и является частью этой системы [2]. Микробиота кишечника в значительной степени обуславливает здоровье человека: микробные сообщества во многом

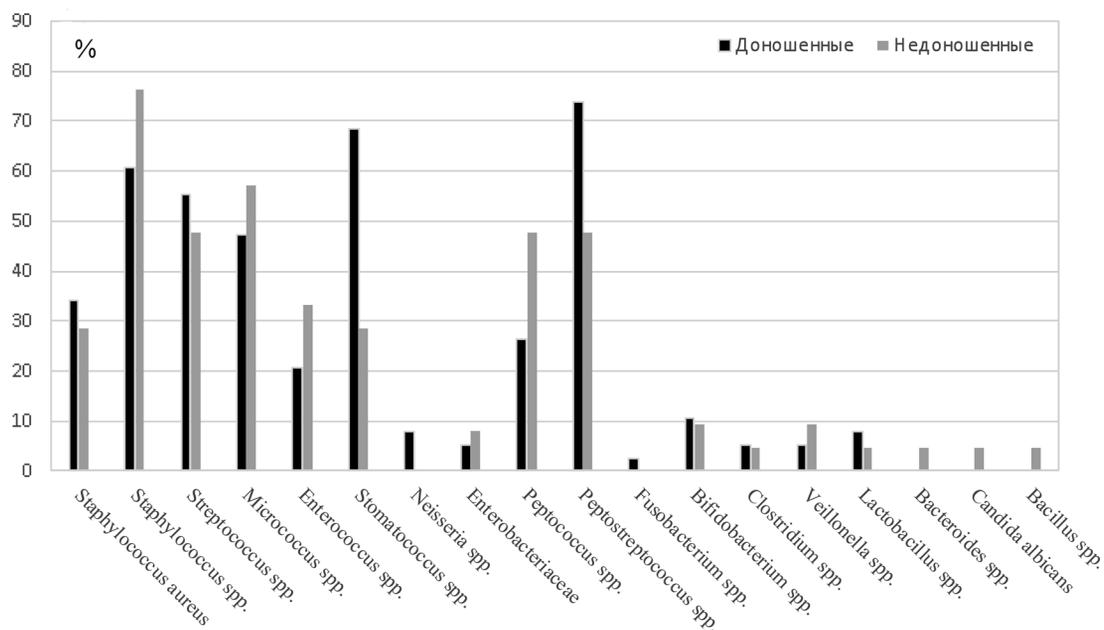


Рис. 1. Частота встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости доношенных ($n = 38$) и недоношенных новорождённых детей ($n = 21$); $p < 0,05$.

Здесь и на рис. 2, 3: по оси абсцисс – названия микроорганизмов; по оси ординат – распространённость микроорганизмов (в %).

определяют иммунный ответ и влияют на устойчивость к патогенам, участвуют в обмене практически всех макро- и микронутриентов [3, 4]. Состояние здоровья организма, его питание и окружающая среда влияют на состав микрофлоры кишечника. На ранних этапах формирования кишечной микробиоты большое значение имеет воздействие таких факторов, как осложнённое течение беременности, недоношенность, оперативное родоразрешение, позднее прикладывание к груди или искусственное вскармливание с рождения, антибиотикотерапия и т. п.

Млекопитающие изначально рождаются стерильными, без микроорганизмов [5]. Колонизация гастроинтестинального тракта начинается сразу же после рождения. Первые бактерии, колонизирующие кишечник, попадают из родовых путей матери и включают аэробные и анаэробные бактерии, такие как *Escherichia coli*, *Clostridium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.* и др. Ключевым моментом в формировании микробиоценоза кишечника является «первичная колонизация кишечника» на протяжении первых месяцев жизни [6, 7]. Однако известные представления о формировании микробиоты не всегда укладываются в современные теории.

Цель исследования – выявить особенности формирования микробиоты ЖКТ новорождённых первого месяца жизни в Тверской области.

Материал и методы. Для определения спектра и частоты встречаемости микроорганизмов исследованы образцы ротовой жидкости, мекония, кала новорождённых детей первого месяца жизни у 21 недоношенного ребёнка и у 38 доношенных детей обоего пола. Работа проводилась с разрешения этического комитета ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России.

Материал собирали в стерильные пробирки, доставляли в течение 2 ч в учебно-научную бактериологическую лабораторию Тверского государственного медицинского университета. Для выделения факультативно-анаэробных и аэробных бактерий использованы следующие питательные среды: хромогенный селективный агар для уропатогенных

кишечных бактерий, маннит-солевой агар (M118) для стафилококков, для выявления лецитиназной активности – агар Баэрда–Паркера, HiCrome Bacillus Agar для обнаружения и идентификации бацилл, MPC – лактоагар, HiCrome Enterococcus faecium Agar, желчно-эскулиновый агар с азидом натрия – для энтерококков, Колумбийский кровяной агар – для накопления, шоколадный агар – для нейссерий, хромогенные среды для выявления дрожжевых грибов рода *Candida*, HiCrom Listeria Agar – для листерий, Mitis Salivarius Agar – стрептококков (HiMedia). Для культивирования анаэробов использованы среды бифидоагар и кровяной агар Шедлера, желчно-эскулиновый агар для бактериоидов.

Анаэробноз создавался в анаэростатах при помощи газогенераторных пакетов BBL. Культивирование проводилось при температуре 37°C в течение 24–48 ч. Количество колоний выражали в lg КОЕ/г или lg КОЕ/мл. В работе использован программно-аппаратный комплекс Диаморф Цито (Диаморф, Россия). Идентификация микроорганизмов осуществлялась по биохимической активности с применением API тест-систем (bioMérieux). Исследование антагонизма лактобацилл и бифидобактерий к тестовым культурам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проводили согласно методике отсроченного антагонизма по Л. П. Блинковой, 2003 [8]. В качестве тест-культур использовали: *Candida albicans* ATCC 885-653, *Salmonella enterica* Typhimurium 415, *Shigella sonnei* 941 из коллекции культур НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАН; *Bacillus subtilis* 534 из коллекции МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 из государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Данные экспериментов обрабатывались с помощью прикладной программы «STATISTICA» (StatSoftRussia). Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования. У 38 доношенных детей из

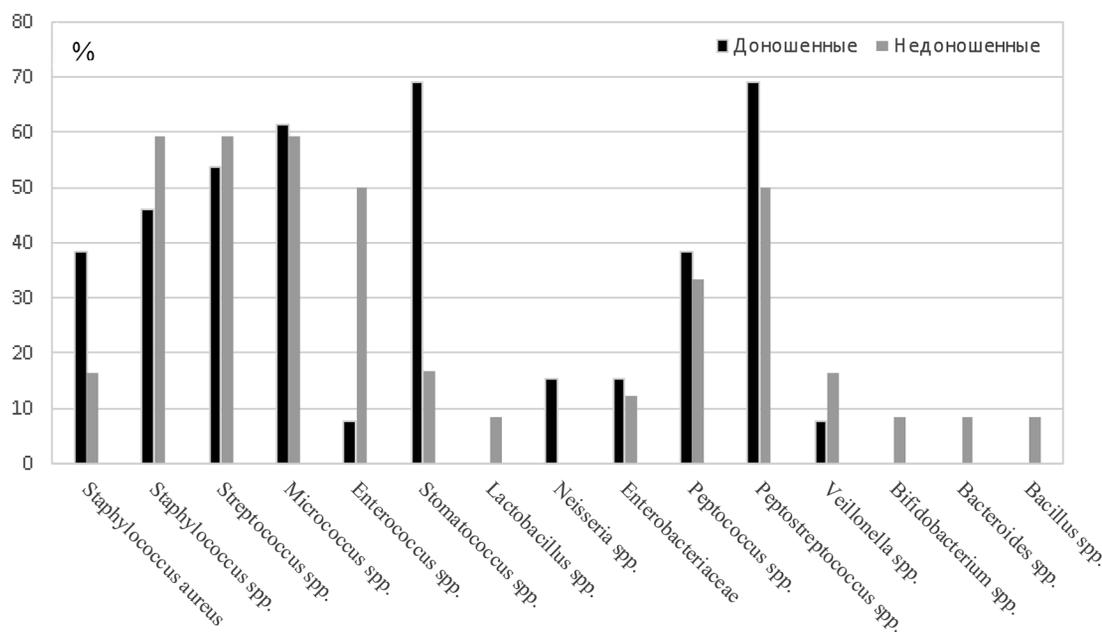


Рис. 2. Частота встречаемости микроорганизмов ротовой жидкости у доношенных ($n = 13$) и недоношенных ($n = 12$) новорождённых детей, родившихся оперативным путём; $p < 0,05$.

ротовой жидкости на 2–6-е сутки выделялись микроорганизмы 13 родов и одного семейства энтеробактерий (рис. 1). Преобладали представители родов *Staphylococcus* – 78,9%, *Peptostreptococcus* – 73,68%, *Stomatococcus* – 68,42%, *Streptococcus* – 55,26%, *Micrococcus* – 47,36%. В меньшем числе случаев выделялись: *Peptococcus spp.* (26,3%), *Enterococcus spp.* (20,5%), *Bifidobacterium spp.* (10,52%), *Lactobacillus spp.* (7,89%), *Clostridium spp.* (5,26%), *Veillonella spp.* (5,26%), *Neisseria spp.* (5,26%), энтеробактерии (5,26%), *Fusobacterium spp.* (2,63%). Частота встречаемости *Staphylococcus aureus* составила 34,2%, а количество – 5,34 Ig КОЕ/мл.

Количество выделенных микроорганизмов варьировало от 6,37 IgКОЕ/мл у пептострептококков до 4,7 IgКОЕ/мл у лактобактерий.

У 21 недоношенного ребёнка из ротовой жидкости выделялись (см. рис. 1) стафилококки в 80,95% случаев, микрококки – в 57,14%, пептострептококки, пептококки, стрептококки – в 47,62%, энтерококки – в 33,3%, стоматококки – в 28,57%. Менее чем в 10% случаев изолированы бифидобактерии, вейлонеллы, бактериоиды, клебсиеллы, *E. coli*, лактобациллы, протеи, клостридии, бациллы, кандиды. *S. aureus* выделялся в 28,57% случаев в количестве 6,01 Ig КОЕ/мл. Количество микроорганизмов составляло от 6,77 IgКОЕ/мл у клостридий и вейлонелл до 3,6 IgКОЕ/мл у *Proteus vulgaris*.

У 13 доношенных детей, рождённых оперативным путём, в ротовой жидкости, отсутствовали лактобациллы, бифидобактерии, кишечная палочка, фузобактерии, клостридии, протеи, клебсиеллы (рис. 2). Выделялись в основном стафилококки, пептострептококки, стоматококки – в 69,23% случаев, микрококки – в 61,54%, стрептококки – в 53,84%, пептококки – в 38,46%. Реже изолированы нейссерии, энтеробактерии – в 15,38%. В 7,69% случаев выявлялись энтерококки, вейлонеллы. Количество бактерий варьировало от 6,46 IgКОЕ/мл у пептострептококков до 3,3 IgКОЕ/мл у энтерококков. *S. aureus* изолирован в 38,46% случаев в количестве 6,19 Ig КОЕ/мл.

У 12 недоношенных детей, рождённых оперативным путём (см.рис. 2), в ротовой жидкости отсутствовали кишечная

палочка, фузобактерии, клостридии, кандиды. Микробиота представлена стафилококками (66,7%), стрептококками и микрококками (59,3%), энтерококками, пептострептококками (50%), пептококками (33,3%). В меньшем проценте случаев изолированы стоматококки, клебсиеллы, вейлонеллы (16,7%), в 8,3% – лактобациллы, бифидобактерии, бактериоиды, протеи, бациллы. Количество микроорганизмов варьировало от 6,77 IgКОЕ/мл у бифидобактерий до 3,6 IgКОЕ/мл у протея. *S. aureus* выделен в 16,6% случаев в количестве 6,77 Ig КОЕ/мл.

При исследовании фекалий 38 доношенных детей (рис. 3) на 2–6-е сутки высевались в 89,47% случаев стафилококки, причём *S. aureus* – в 50% случаев. В 86,84% высевались энтерококки (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*), в 50% – *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, в 47,36% – пептострептококки, в 36,84% – стоматококки, в 35,48% – бифидобактерии, в 34,21% – лактобациллы, в 21,05% – клостридии, в 15,79% – *Proteus vulgaris*, в 10,52% – бациллы, вейлонеллы, листерии, в 7,89% – актиномицеты, в 5,26% – псевдомонады, превотеллы, в 2,63% – нейссерии, иерсинии, энтеробактерии. Количество микроорганизмов составляло от 5 до 7 Ig КОЕ/г, в среднем 6,55 Ig КОЕ/г.

У 21 недоношенного ребёнка в фекалиях (см. рис. 3) микробиом выявлялся в меньшем количестве случаев. Стафилококки и энтерококки выделены в 61,9% случаев, *S. aureus* – в 23,8%, в 38,1% – лактобациллы, пептострептококки, клебсиеллы, в 33,3% – *E. coli*, бациллы, в 28,57% – пептококки, в 23,8% – микрококки, в 19% – стоматококки, в 14,28% – энтерококки, бактериоиды, менее чем в 10% – протеи, бифидобактерии, вейлонеллы, кандиды, менее чем в 5% – стрептококки, клостридии, стрептобациллы. Количество бактерий от 4,5 до 7,97 Ig КОЕ/г, в среднем составило 6,6 Ig КОЕ/г.

В фекалиях 13 новорождённых доношенных детей, рождённых оперативным путём, в большинстве случаев выделялись стафилококки и энтерококки (92,3%), *S. aureus* – в 53,84%. В 61,53% случаев высевали пептострептококки, в 46,15% – *E. coli*, в 38,46% – стоматококки, пептококки, клебсиеллы, в 30,76% – протеи и стрептобациллы, в 23% – лак-

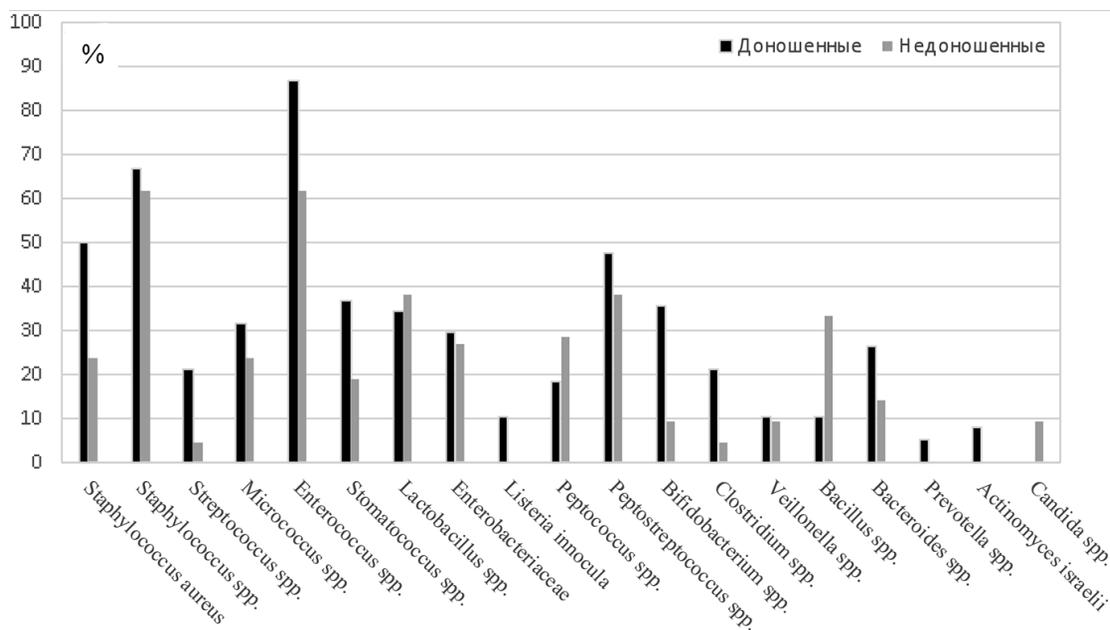


Рис. 3. Частота встречаемости микроорганизмов фекалий у доношенных ($n = 38$) и недоношенных ($n = 21$) новорождённых детей; $p < 0,05$

тобациллы, микрококки, клостридии, в 15,4% – бациллы, в 7,69% – листерии, энтеробактерии. Не выделялись бифидобактерии, фузобактерии, вейлонеллы. Количество микроорганизмов составляло от 5,43 до 7,47 lg КОЕ/г, в среднем – 6,35 lg КОЕ/г.

В фекалиях 12 новорождённых недоношенных детей, рождённых оперативным путём, микроорганизмов было меньше. В 91,66% случаев выделялись энтерококки, в 58,33% – стафилококки, пептострептококки, бациллы, *S. aureus* – в 25%. В 50% случаев высевали клебсиеллы, в 33,3% – лактобациллы, *E. coli*, в 25% – микрококки, пептококки, в 16,66% – вейлонеллы, в 8,33% – стоматококки, бактероиды. Отсутствовали бифидобактерии, фузобактерии, клостридии, кандиды. Количество бактерий варьировало от 6,54 до 7,97 lg КОЕ/г, в среднем составляло 7,2 lg КОЕ/г.

Из фекалий новорождённых доношенных и недоношенных детей выделены лактобациллы, принадлежащие к видам: *L. fermentum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*. Антагонистическая активность изученных лактобацилл варьировала в зависимости от их вида. *L. fermentum* и *L. pentosus* не показали антагонизма ни к одному штамму тестовых микроорганизмов. *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, выделенные из фекалий новорождённых, обладали высокой антагонистической активностью ко всем тестовым штаммам грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов: *C. albicans* ATCC 885-653, *S. enterica Typhimurium* 415, *S. sonnei* I фазы 941, *B. subtilis* 534, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 9027. Зоны задержки роста составили 20–28 мм.

Высокая антагонистическая активность отмечалась у бактерий рода *Bifidobacterium*. Регистрировалась большая зона задержки роста (более 20 мм) в отношении тест-штамма стафилококка в 65,2% случаев и клинических изолятов *S. aureus*, выделенных из фекалий новорождённых, в среднем в 35,5% случаев. Выявлен высокий антагонизм к грамотрицательным тест-штаммам кишечных бактерий (58,2%) и к клиническим изолятам *E. coli* (41,4%).

Обсуждение. В организме детей, в частности новорождённых, микроорганизмы распределены неравномерно в зависимости от занимаемого биотопа: пищеварительного трак-

та, дыхательных путей, кожи, мочеполовой системы. Наиболее изученным и многочисленным по видовому спектру и количеству микробиоты является ЖКТ, нормальное функционирование которого напрямую влияет на будущее здоровье младенца. На состав кишечного микробиома новорождённого влияют различные факторы, одним из них является характер родоразрешения (нормальные либо оперативные роды). При нормальных родах доношенный новорождённый в небольших количествах заглатывает представителей вагинальной и кишечной микробиоты матери. При оперативном родоразрешении одними из первых организм новорождённого колонизируют представители микробиоты кожи матери и медицинского персонала, принадлежащие к биотопам кожи и полости рта либо попавшие из окружающей среды [9, 10].

По данным метагеномного анализа фекальных образцов новорождённых первого месяца жизни, проведённого в Швеции, кишечная микробиота младенцев, родившихся естественным путём, обильно представлена представителями родов: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides*, *Escherichia/Shigella* ($p < 0,05$), попавших из организма матери [10]. Энтеробактерии высевались раньше и в большем количестве по сравнению с бактероидами и бифидобактериями. Наши результаты дополняют имеющиеся данные по микробиоте младенцев. У доношенных новорождённых детей ротовой и кишечный микробиом многообразен и представлен более чем 13 родами грамположительных и грамотрицательных бактерий в полости рта и более 23 родами в кишечнике. Среди них в ротовой жидкости в основном выделялись *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Stomatococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, в фекалиях – *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Peptostreptococcus spp.* Бифидобактерии и лактобациллы высевались только в 35% случаев.

По данным ряда авторов из университета Готенбурга, Швеция, кишечная микробиота младенцев, родившихся оперативным путём, имела значительно меньшее сходство с микроорганизмами их матерей. Микробиота кишечника новорождённых после оперативного родоразрешения первично колонизирована следующими бактериями: *Enterobacter hormaechei* / *E. cancerogenus*, *Haemophilus parainfluenzae* /

H. aegyptius / *H. influenza* / *H. haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus* / *S. lugdunensis* / *S. aureus*, *Streptococcus australis*, *Veillonella dispar* / *V. parvula*, что указывает на их принадлежность к биотопам кожи и полости рта либо на то, что они попали из окружающей среды [11]. По нашим данным у детей, рождённых оперативным путём, в ротовой жидкости присутствуют те же микроорганизмы, что и при естественных родах, но отсутствуют лактобациллы, бифидобактерии, кишечная палочка, фузобактерии, клостридии, протеи, клебсиеллы. Из фекалий новорождённых в основном высеивались, как и в других работах, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Stomatococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, но не выделялись бифидобактерии, фузобактерии, вейлонеллы.

Показано, что в меконии недоношенных детей (< 33 нед) по результатам секвенирования 16s РНК присутствуют *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Photorhabdus*, *Tannerella* [12]. По нашим данным у недоношенных детей из полости рта чаще выделялись *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Stomatococcus spp.* В фекалиях микробиом менее разнообразен, лактобациллы обнаруживались в 38% случаев, *E. coli* – в 33%, бифидобактерии – только в 10% случаев. У детей, рождённых оперативным путём, в ротовой жидкости присутствуют те же микроорганизмы, что и у детей при естественных родах, но лактобациллы, бифидобактерии, бактероиды, энтеробактерии присутствуют не более чем в 10% случаях. Спектр и количество микробиоты фекалий скудные, в основном выделяются *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Vacillus spp.*, реже – *Lactobacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, отсутствуют бифидобактерии, фузобактерии, клостридии [14].

L. rhamnosus и *L. paracasei* обладают высокой антагонистической активностью к тест-штаммам и клиническим изолятам *S. aureus* и условно-патогенным грамотрицательным бактериям. *L. fermentum* и *L. pentosus* не показали антагонизма ни к одному штамму тестовых микроорганизмов. Бифидобактерии менее активны, только в 35–65% случаев показывают высокий антагонизм к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

Полученные данные свидетельствуют о том, что *L. rhamnosus* и *L. paracasei* перспективны для конструирования новых пробиотиков для коррекции микробиома у новорождённых детей.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-7, 9-11 см. REFERENCES)

1. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Монография. Тверь: Издательство РИЦ ТГМА; 2016: 214.
2. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Шендеров Б.А. Современные представления о биотехнологическом потенциале симбиотической микробиоты человека. *Верхневолжский медицинский журнал*. 2018; 17(вып.1): 19-26.
8. Блинкова Л.П. Бактериоцины: критерии, классификация, методы выявления. *Журнал микробиологии*. 2003; 3: 109 – 13.

12. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Борисова С.С., Петрова О.А., Антонова Л.К. Динамика колонизации микробиотой недоношенных детей на первой неделе жизни. В книге: Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения». М.: 2017; 494.

REFERENCES

1. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Mironov A.Yu. Symbiotic relationship between lactobacilli and microorganisms of the gastrointestinal tract. [Simbioticheskie vzaimootnosheniya laktobacill i mikroorganizmov zheludochno-kishechnogo trakta]. Tver': Izdatel'skiy dom RITS Tverskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii; 2016: 214 (in Russian)
2. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Shenderov B.A. Modern representations about the biotechnological potential of symbiotic human microbiota. *Verkhnevolzhskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 17(1): 19-26. (in Russian)
3. Chervinets Yu., Chervinets V., Shenderov B., Belyaeva E., Lebedev S., Danilenko V. Adaptation and probiotic potential of lactobacilli isolated from the oral cavity and intestines of healthy people. *Probiotics and antimicrobial proteins*. Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. 2017; 10(1): 22-33
4. Yang Irene, Corwin Elizabeth J., Brennan Patricia A., Jordan Sheila, Murphy Jordan R., Dunlop Anne. The Infant Microbiome: Implications for Infant Health and Neurocognitive Development. *Nursing Research*. 2016; 65(1):76-88
5. De La Cochetière Marie France, Darmaun Dominique, Potel Gilles, Rouge Carole, Rozé Jean Christophe, Leguen Christele Gras. Intestinal Microbiota in Neonates and Preterm Infants: A Review. *Current Pediatric Reviews*. 2007; 3: 21-34.
6. Rutayisire Erigene, Huang Kun, Liu Yehao, Tao Fangbiao. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterology*. 2016; 16 (1): 86.
7. Biasucci G. Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development*. 2010; 86. Suppl 1: 13-5.
8. Blinkova, L.P. Bacteriocins: criteria, classification, methods of detection. *Zhurnal mikrobiologii*. 2003; 3: 109 – 13. (in Russian)
9. MacIntyre D.A., Chandiramani M, Lee YS, Kindinger L, Smith A, Angelopoulos N et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Science Reports*. 2015; 5: 8988.
10. Bäckhed F., Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell host and microbe*. 2015; 17(Issue 5): 690–703.
11. Ardisson Alexandria N., de la Cruz Diemel M., Davis-Richardson Austin G., Rechcigl Kevin T., Li Nan, Drew Jennifer C. et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*. 2014; 9: e90784.
12. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Borisova S.S., Petrova O.A., Antonova L.K. The dynamics of microbiota colonization of premature babies in the first week of life. Materials of the XI Congress of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists. “Ensuring Epidemiological Well-being: Challenges and Solutions». [Materialy XI s#ezda Vserossijskogo nauchno-prakticheskogo obshhestva jepidemiologov, mikrobiologov i parazitologov. «Obespechenie jepidemiologicheskogo blagopoluchija: vyzovy i reshenija»]. Moscow; 2017: 494. (in Russian)

Поступила 28.05.18

Принята к печати 13.06.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 613.636-084:614.4

Масягутова Л. М.¹, Бакиров А.Б.¹, Симонова Н.И.², Гизатуллина Л. Г.¹

ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭТАПНОСТИ И ОБЪЕМА ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ РАБОТЕ В УСЛОВИЯХ МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОЗДУХА РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

¹ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия;
²ЗАО «Клинский институт охраны и условий труда», 141607, Московская обл., г. Клин, Россия

Разработаны концептуальные и методические основы системы медицинского наблюдения с обоснованием этапности и регламентированного объема лабораторных исследований за работниками различных животноводческих производств, подвергающихся повышенной микробной нагрузке условно-патогенными микроорганизмами (возбудителями оппортунистических инфекций).

Ключевые слова: лабораторная диагностика; алгоритм лечебно-профилактических мероприятий; загрязнение воздушной среды производственных помещений условно-патогенной и сапрофитной микрофлорой.

Для цитирования: Масягутова Л. М., Бакиров А.Б., Симонова Н.И., Гизатуллина Л. Г. Лабораторное обоснование этапности и объема профилактических мероприятий при работе в условиях микробного загрязнения воздуха рабочей зоны. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63 (9): DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9-Masyagutova L.M.¹, Bakirov A.B.¹, Simonova N.I.², Gizatullina L.G.¹>

LABORATORY CONFIRMATION OF STAGING AND VOLUME OF PREVENTIVE MEASURES AT WORK UNDER THE CONDITIONS OF MICROBIAL POLLUTION OF WORK ENVIRONMENT AIR

¹ Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology, 450106, Ufa, Russia;

² Klin Institute of professional safety and working conditions, 141607, Moscow region, Russia

Conceptual and methodological basics of the medical surveillance system with confirmed staging and regulated volume of laboratory studies on workers of diverse industrial sectors exposed to increased microbial load with opportunistic infections have been developed.

Key words: laboratory diagnostics; algorithm of medical and preventive measures; pollution of work environment air with opportunistic and saprophytic microflora.

For citation: Masyagutova L.M., Bakirov A.B., Simonova N.I., Gizatullina L.G. Laboratory confirmation of staging and volume of preventive measures at work under the conditions of microbial pollution of work environment air. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (9): (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-9->

For correspondence: Masyagutova L.M., Doctor of Medicine, Head of the Department of Laboratory Research Methods ; e-mail: kdl.ufa@rambler.ru

Information about authors:

Масягутова Л.М., <https://orcid.org/0000-0003-0195-8862>

Бакиров А.Б., <https://orcid.org/0000-0001-7900-233X>

Симонова Н.И., <https://orcid.org/0000-0003-0020-4372>

Гизатуллина Л.Г., <https://orcid.org/0000-0001-6593-2704>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 02.04.2018

Accepted 25.05.2018

Современные социально-экономические условия диктуют необходимость расширения отечественного сельскохозяйственного производства. При этом неизбежно вовлечение большого количества лиц трудоспособного возраста в обеспечение технологического процесса.

Многочисленными исследованиями показано, что работники животноводческих предприятий находятся в зоне повышенного риска развития различных воспалительных заболеваний [6,10]. Потенциальными факторами развития

воспалительной реакции дыхательных путей признаны уровень β -глобулина и глифосата во вдыхаемом воздухе, которые способны потенцировать выработку IL-33, TSLP, IL-13, IL-5, эозинофилов и нейтрофилов и дегрануляцию тучных клеток [9,11]. Хроническое воздействие различных типов пыли на работников животноводческих предприятий индуцирует воспалительную реакцию и может способствовать низкой распространенности Th2-связанных заболеваний, но в то же время и представляет риск для развития других хронических заболеваний дыхательных путей. Профессиональная обусловленность доказана в отношении превышения выработки спонтанного уровня IL-17 и γ -интерферона. Отмечается повышение уровней провоспалительных транскриптов (интерлейкина IL -8, IL -6, и фактора некроза опухоли (ФНО- α))

Для корреспонденции: Масягутова Ляйля Марселевна, д-р мед. наук, зав. отделением лабораторных методов исследований; e-mail: kdl.ufa@rambler.ru

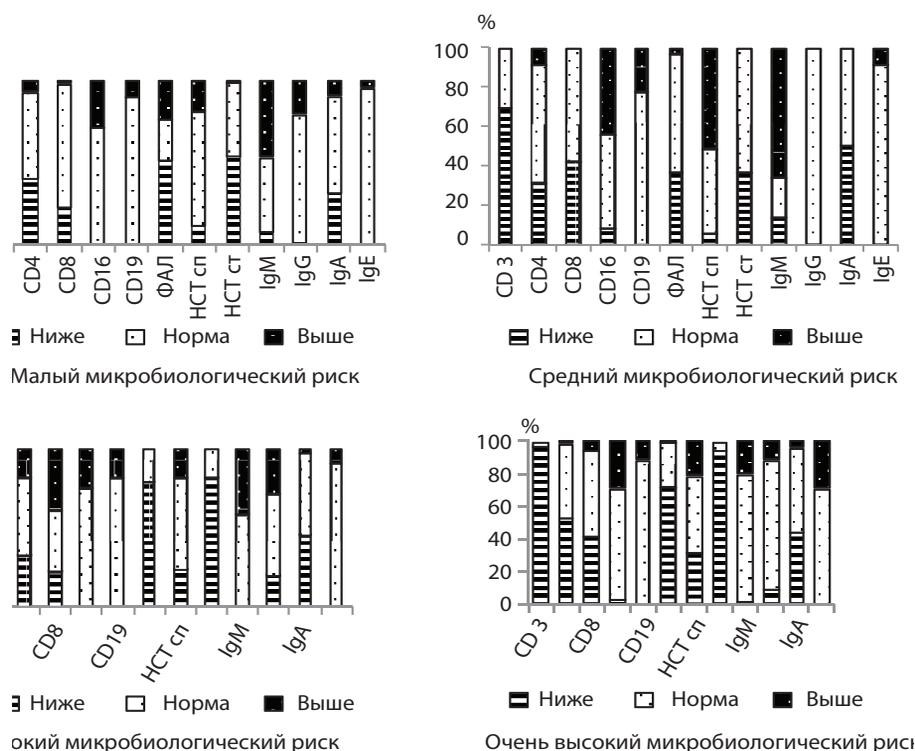


Рис. 1. Соотношение нормативных и отклоняющихся от нормы учтенных иммунологических показателей у работников с различным уровнем микробиологического риска (%).

уже через 2 ч после воздействия [15, 16]. Ключевую роль в формировании пути развития сигнального ответа реакции легких на сложные органические пыли современные исследователи придают молекуле MyD88. По их мнению, именно MyD88-зависимая сигнализация является основной в формировании воспалительных реакций эпителиальных клеток дыхательных путей [12]. Хроническое вдыхание сложных органических частиц, имеющих в своем составе пептидогликаны, грамположительные бактерии, компоненты клеточной стенки (β -D-глюканы) и грибы наряду с компонентами кормов, белков и витаминов обуславливают частоту и тяжесть заболевания [13, 14].

Вместе с тем, в современной научной литературе недостаточно работ, посвященных анализу формирования нарушений иммунного статуса у работников в условиях массового загрязнения воздушной среды производственных помещений и рабочих поверхностей условно – патогенной и сапрофитной микрофлорой.

Создание систем наблюдения за состоянием здоровья работников с целью выявления ранних или так называемых «некритичных» повреждений здоровья является приоритетом в повестке дня большинства исследований. При этом одна из главных задач, которая стоит перед нами - ответить на вопрос, какие профилактические мероприятия и когда необходимо проводить для повышения уровня здоровья и предотвращения заболеваний [1,3,5].

Цель работы: разработка и научное обоснование приоритетных мер по сохранению здоровья работников на основе оценки нагрузки условно-патогенными микроорганизмами.

Материал и методы. Для решения задач, поставленных в работе, в качестве модельных, были использованы результаты комплексных клинко-гигиенических исследований, проведенных на различных предприятиях животноводства. Дополнительно проведен анализ микробиологической обсеменен-

ности воздуха рабочей зоны. Установлено, что между уровнем микробного загрязнения и распространенностью болезней органов дыхания существует высокой силы прямая корреляционная связь ($r=0,8$; $p \leq 0,05$), что и позволило ранжировать степень обсемененности воздушной среды производственных помещений, а также сгруппировать их в четыре основные группы в зависимости от уровня микробиологического риска (MR) [2].

Изучения состояния здоровья проведено по результатам периодического медицинского осмотра, а также дополнительного иммунологического обследования работников животноводческих комплексов, выполненных стандартными методами [4].

Результаты. Проведенный статистический анализ полученных результатов показал, что с увеличением микробной нагрузки, наблюдается снижение удельного веса работников, иммунные показатели которых укладываются в диапазоны референтных значений. Одновременно заметно увеличивается доля лиц с показателями ниже нормативного диапазона и, соответственно, сокращается удельный вес работников с признаками адекватного иммунного ответа. Анализ количественных параметров клеточного и гуморального иммунитета в сравниваемых группах позволил выявить разномодальные отклонения показателей в ответ на микробную нагрузку (рис. 1).

Распределение безразмерных интегральных индексов, рассчитанных для каждого из взятых в анализ иммунологических показателей, показало, что повышение фагоцитарной активности лимфоцитов (ФАЛ), иммуноглобулинов класса А, а также снижение, либо повышение уровня иммуноглобулинов класса М можно предварительно рассматривать в качестве маркеров, более характерных для состояния иммунной системы при минимальной, либо относительно невысокой микробиологической нагрузке на организм, т.е. низком микробиологическом риске (рис. 2).

Следующая группа показателей, включающая повышение IgG, CD4, CD16 и уровня спонтанного теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ тест, сп) оказалась практически интактной, т.е. эти показатели примерно в равной степени и на близких уровнях встречаются у работников всех групп, независимо от уровня микробиологического риска.

Третья группа объединяет иммунологические показатели, величины которых, как правило, значительно изменяются с ростом микробиологической нагрузки, т.е., они чаще и на более высоких уровнях встречаются в группах высокого и очень высокого микробиологического риска.

Верхняя часть этого рангового ряда включает повышение CD19 на фоне снижения содержания CD4, Ig A, ФАЛ, CD8 и НСТ стимулированного. Далее идет подгруппа показателей, наиболее значимых для работников с высоким и очень высоким микробиологическим риском: снижение CD16, НСТ спонтанного и IgG на фоне повышения CD8. Последняя подгруппа характеризуется наименьшими величинами интегральных индексов, т.е. явно свидетельствует о преобладании показателей групп с высокой микробиологической нагрузкой.

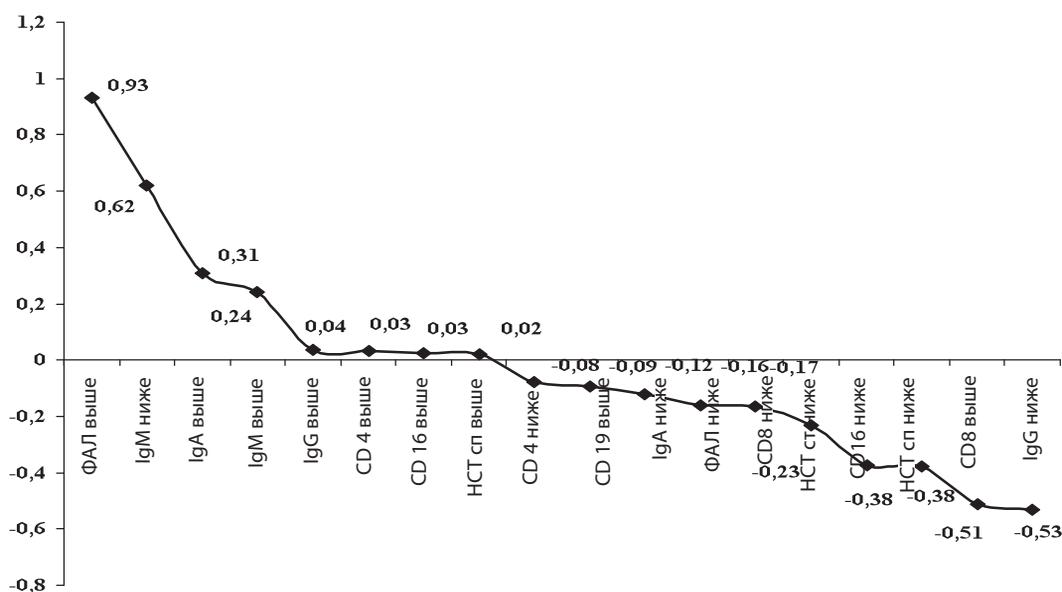


Рис. 2. Распределение иммунологических показателей по степени диагностической значимости при высокой обсемененности воздуха рабочей зоны по величине безразмерного интегрального индекса.

Для лиц, работающих в условиях загрязнения воздуха рабочей зоны условно-патогенными микроорганизмами, большое значение приобретает динамический контроль состояния иммунной системы, что предполагает тщательный отбор диагностических процедур и тестов в условиях массовых периодических медицинских осмотров.

Проведенный анализ состояния иммунной системы в зависимости от уровня микробной нагрузки показал, что при низком микробиологическом риске имеет место адекватная реакция организма, в том числе, иммунной системы на факторы производства. Стандартное иммунологическое обследование не выявило у работников с низким риском достоверно значимых изменений в показателях иммунного статуса, что свидетельствует о целесообразности его исследования в процессе периодических медицинских осмотров (ПМО).

У лиц со средним уровнем микробиологического риска отмечаются признаки срыва адаптации организма, достоверно ($p < 0,05$) повышается количество лиц со сниженными показателями, характеризующими клеточное звено иммунитета по сравнению с контрольной группой. Однако и для этой группы нет необходимости иммунологического обследования, достаточно использования стандартизованного опросника.

У лиц с высоким микробиологическим риском наблюдается развитие клинических симптомов иммунной недостаточности на фоне изменения как клеточного, так и гуморального звена ($p < 0,05$) относительно контроля. На данной стадии необходимо провести оценку иммунного статуса с использованием тестов первого уровня. Наконец, при очень высоком микробиологическом риске у работников наблюдаются признаки срыва адаптации, что требует более обширного обследования в

условиях стационара центра профпатологии (рис. 3).

Предложенная методика отвечает требованиям общедоступности и воспроизводимости при высокой степени значимости и достоверности полученных результатов и является достоверным критерием формирования групп для дальнейшего углубленного иммунологического обследования в целях своевременной профилактики.

Таким образом, предложенный нами алгоритм медицинского наблюдения за работниками животноводческих комплексов основан на этапности и регламентированном объеме медицинского обследования в зависимости от уровня микробиологического риска. На каждый этап программы получено свидетельство Федеральной службы по интеллектуальной собственности [7,8].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии финансовой поддержки.

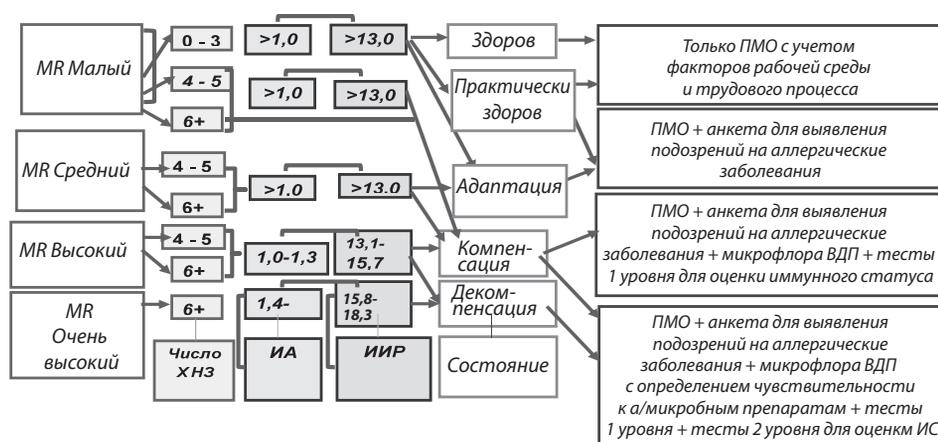


Рис. 3. Алгоритм выбора объема медицинских мероприятий с учетом микробиологического риска. ХНЗ – хронические неинфекционные заболевания; ИА – индекс аллергии; ИИР- индекс иммунорегуляции; ИС- иммунная система; ПМО – периодический медицинский осмотр.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 9-16 см. REFERENCES)

1. Артамонова В.Г., Баянов Э.И. Факторы риска и их роль в развитии заболеваний органов дыхания у рабочих современных птицефабрик. *Медицина труда и промышленная экология*. 2005; 4: 6 - 12.
2. Бакиров А.Б., Масыгутова Л.М., Бадамшина Г.Г. Способ прогнозирования развития болезней органов дыхания у лиц, подвергающихся воздействию биологического фактора. Патент РФ 2500353 - № 2011152688/14; 2013.
3. Безрукова Г.А., Спиринов В.Ф., Шалашова М.Л. Актуальные проблемы профпатологической помощи работникам сельского хозяйства. *Медицина труда и промышленная экология*. 2015; 9: 34.
4. Клиническая лабораторная диагностика профессиональных заболеваний. Потапов А.И., ред. Ярославль: Канцлер; 2013.
5. Колхир П.В. Доказательная аллергология-иммунология. М.: Практическая медицина; 2010.
6. Масыгутова Л. М., Бакиров А.Б., Рыбаков И.Д. Специфическая сенсибилизация и местный иммунитет полости рта в условиях хронической аэрогенной нагрузки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 4: 27-9.
7. Масыгутова Л.М., Бакиров А.Б., Гайнуллина М.К. и др. Способ определения целесообразности проведения иммунологического обследования у работников животноводческого комплекса. Патент РФ 2557956 - № 2014124289/14; 2015.
8. Масыгутова Л.М., Бакиров А.Б., Масыгутов Т.Р. Формирование групп диспансерного наблюдения в рамках обязательных медицинских осмотров работников, работающих в условиях антигенной нагрузки. Свидетельство РФ о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2015611125; 2015.
9. Masyagutova L.M., Bakirov A.B., Rybakov I.D. Specific sensitization and local immunity of the oral cavity in conditions of chronic aerogenic load. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 4: 27-9. (in Russian)
10. Masyagutova L.M., Bakirov A.B., Gainullina M.K. et al. A method of determining expediency of conducting immunological examination among agricultural workers. Patent RF 2557956 - № 2014124289/14; 2015. (in Russian)
11. Masyagutova L.M., Bakirov A.B., Masyagutov T.R. Russian Federation Certificate № 2015611125. The formation of the group for dispensary surveillance within the framework of mandatory health checkups of workers exposed to antigen load. Certificate RF of state registration of the computer programme № 2015611125; 2015 (in Russian)
12. Hawley B., Schaeffer J., Poole J.A. et al. Differential response of human nasal and bronchial epithelial cells upon exposure to size-fractionated dairy dust. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2015; 78: 583-94.
13. Lansford K.A., Shill D.D., Dicks A.B. et al. Effect of acute exercise on circulating angiogenic cell and microparticle populations. *Exp. Physiol*. 2016; 101: 155-67.
14. Kumar S., Khodoun M., Kettleison E.M. et al. Glyphosate-rich air samples induce IL-33, TSLP and generate IL-13 dependent airway inflammation. *Toxicology*. 2014; 325: 42-51.
15. Poole J.A., Wyatt T.A., Romberger et al. MyD88 in lung resident cells governs airway inflammatory and pulmonary function responses to organic dust treatment. *Respir. Res*. 2015; 16: 111.
16. Wählén K., Fornander L., Olausson P. et al. Protein profiles of nasal lavage fluid from individuals with work-related upper airway symptoms associated to moldy and damp buildings. *Indoor Air*. 2015; 25.
17. Serefhanoglu K., Timurkaynak E., Can E. et al. Risk factors for candidemia with non-albicans *Candida* spp. in intensive care unit patients with end-stage renal disease on chronic hemo-dialysis. *J. Formos. Med. Assoc*. 2012; 3: 325-32.
18. Charavaryamath C., Juneau V., Suri S.S., Janardhan K.S., Townsend H., Singh B. Role of Toll-like receptor 4 in lung inflammation following exposure to swine barn air. *Exp. Lung Res*. 2008; 34: 19-35.
19. Robbe P., Spierenburg E.A., Draijer C. Shifted T-cell polarisation after agricultural dust exposure in mice and men. *Thorax*. 2014; 69: 630-7.

REFERENCES

1. Artamonova V.G., Bayanov E.I. Risk factors and their role in the development of respiratory diseases in workers of modern poultry. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2005; 4: 6 - 12. (in Russian)
2. Bakirov A.B., Masyagutova L.M., Badamshina G.G. A method for prognosing the development of respiratory diseases in people exposed to a biological factor: Patent RF 2500353 - № 2011152688/14; 2013. (in Russian)
3. Bezrukova G.A., Spirin V.F., Shalashova M.L. Pressing problems of occupational medicine aid to agriculture worker. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2015; 9: 34. (in Russian)
4. Potapov A.I., ed. Clinical laboratory diagnosis of occupational diseases. Yaroslavl': Kantsler; 2013. (in Russian)
5. Kolkhir P.V. Evidence based allergology-immunology. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2010. (in Russian)

Поступила 02.04.18
Принята к печати 25.05.18

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.419-018.46-006:577.21.083

Горбенко А.С.^{2,3}, Столяр М.А.^{2,3}, Ольховский И.А.^{2,3}, Абдуллаев А.О.¹, Судариков А.Б.¹, Дунаева Е.А.⁴,
Мионов К.О.⁴, Шипулин Г.А.⁴

АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ И ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ В АЛГОРИТМЕ ВЫЯВЛЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ КАЛЬРЕТИКУЛИНА (CALR)

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 125167, Москва, Россия;

²Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

³ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

⁴ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия

Выявление соматических мутаций в гене CALR регламентировано клиническими рекомендациями для диагностики эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза. Выявление мутаций CALR обычно проводят трудоёмкими методами, требующими специальных навыков работы и дорогостоящего оборудования.

Цель работы – сравнение результатов выявления мутаций гена CALR в пробах венозной крови методами аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с последующим электрофорезом, фрагментным анализом и секвенированием по Сэнгеру и методом пиросеквенирования.

Исследованы 1284 образца крови пациентов с подозрением на хронические миелопролиферативные новообразования и 20 образцов крови доноров. Мутации в гене CALR I и II типа определяли с помощью аллель-специфической ПЦР-РВ, используя оригинальные праймеры и TaqMan-зонды. Редкие варианты мутаций CALR определяли с помощью электрофоретической детекции. Все положительные образцы были в дальнейшем исследованы методами фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру, а также разработанным методом пиросеквенирования с использованием прибора PyroMarkQ24.

Использование аллель-специфической ПЦР с последующей электрофоретической детекцией позволило определить наличие клинически значимых мутаций в гене CALR в 81 образце венозной крови JAK2- и MPL-негативных пациентов, в том числе 42 случая мутации I типа, 33 – II типа и 8 редких мутаций CALR. Ни в одном из 20 образцов доноров крови и 121 образце крови пациентов с истинной полицитемией мутаций в 9-ом экзоне CALR не было выявлено. В 20 отрицательных образцах мутации CALR также не были обнаружены и при использовании секвенирования по Сэнгеру. Все положительные образцы подтверждены фрагментным анализом и секвенированием.

Описанный сочетанный подход выявления мутаций гена CALR в образцах периферической крови может использоваться в лабораториях, имеющих стандартный комплект оборудования для ПЦР-РВ и электрофореза нуклеиновых кислот. В качестве подтверждающего теста предложен метод пиросеквенирования с использованием системы генетического анализа PyroMarkQ24.

Ключевые слова: хронические миелопролиферативные неоплазии; аллель-специфическая ПЦР; соматические мутации CALR.

Для цитирования: Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А., Абдуллаев А.О., Судариков А.Б., Дунаева Е.А., Мионов К.О., Шипулин Г.А. Аллель-специфическая полимеразная цепная реакция и электрофоретическая детекция в алгоритме выявления клинически значимых соматических мутаций в гене кальретикулина (calr). Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (8): 588-592. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-588-592>

Горбенко А.С.², Столяр М.А.^{2,3}, Olkhovskiy I.A.^{2,3}, Abdullaev A.O.¹, Sudarikov A.B.¹, Dunaeva E.A.⁴, Mironov K.O.⁴, Shipulin G.A.⁴

ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION AND ELECTROPHORETIC DETECTION IN THE DETECTION ALGORITHM CLINICALLY SIGNIFICANT SOMATIC MUTATIONS IN THE GENE OF CALRETI-CULIN (CALR)

¹ National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation;

² Krasnoyarsk branch of the "National Research Center for Hematology", 660036, Krasnoyarsk, Russia;

³ Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", 660036, Krasnoyarsk, Russia;

⁴ Central Research Institute of Epidemiology, 111123, Moscow, Russia

The detection of somatic mutations in the 9 exon of the calreticulin gene (CALR) is regulated by the clinical recommendations as a diagnostic criterion for chronic Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN). Some methods of nucleic acids testing are used to identify CALR gene mutations with different requirements for special skills of personnel and expensive equipment. The purpose of this work is to compare the results of the detection of CALR gene mutations in venous blood samples by allele-specific RT-PCR with subsequent electrophoresis, fragment analysis and Sanger- or pyro-sequencing. We used 1284 blood samples of patients with

suspected MPN and 20 blood donor samples. Mutations in the CALR gene of the I and II type were identified using PCR-RT with the original primers and TaqMan probes. Also, all samples were tested for mutations in the CALR gene by electrophoretic detection of PCR results in an agarose gel. The use of allele-specific RT-PCR followed by electrophoretic detection made it possible to determine clinically significant mutations in the CALR gene in 81 venous blood samples of JAK2- and MPL-negative patients, including 42 cases of type I mutation, 33 cases of type II mutation and 8 rare CALR mutations. Mutations in the 9 exon of the CALR gene were not detected in any of the 20 blood donor samples or in 121 blood samples of patients with polycythemia vera. In randomly selected 20 negative samples, CALR gene mutations were also not detected using Sanger sequencing. All positive samples were confirmed by fragment analysis, as well as with Sanger-sequencing and pyro-sequencing. The described combined approach to detect mutations of the CALR gene in peripheral blood samples can be used in clinical diagnostic laboratories that have a standard set of equipment for electrophoresis of nucleic acids and a PCR-RT. We also propose a confirmatory test based on the pyrosequencing of DNA using the system of genetic analysis "PyroMark Q24".

Key words: *chronic myeloproliferative neoplasms; allele-specific RT-PCR; somatic mutations CALR.*

For citation: *Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Olkhovskiy I.A., Abdullaev A.O., Sudarikov A.B., Dunaeva E.A., Mironov K.O., Shipulin G.A. ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION AND ELECTROPHORETIC DETECTION IN THE DETECTION ALGORITHM CLINICALLY SIGNIFICANT SOMATIC MUTATIONS IN THE GENE OF CALRETICULIN (CALR). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (8): 588-592 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-8-588-592>*

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 10.04.2018
Accepted 11.05.2018

Введение. Хронические Ph-негативные миелолифолиферативные новообразования (ХМН) характеризуются неконтролируемой избыточной продукцией клеток миелоидного ряда, развитием воспалительного процесса в костном мозге с последующей трансформацией в острый лейкоз и прогрессией миелофиброза [1]. Накопление в периферической крови всех трёх ростков миелоидного кроветворения определяет клиническую картину истинной полицитемии (ИП), преобладание мегакариоцитарного ростка характеризует эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), а первичное преобладание выраженных склеротических процессов приводит к первичному миелофиброзу (ПМФ).

В отличие от классического варианта хронического миелолейкоза (ХМЛ) при ХМН в трансформированных клетках отсутствуют Ph-хромосома и химерный транскрипт BCR-ABL. Уже более 10 лет назад были идентифицированы характерные для ХМН соматические мутации в генах янускиназы-2 (JAK2) и рецептора тромбопоэтина (MPL). Вместе с тем примерно в 40% случаев клинически выраженной картины ЭТ и ПМФ эти мутации не обнаруживаются. Только в конце 2013 г. две независимые научные группы [2,3] опубликовали данные о важной патогенетической роли при этих заболеваниях соматических мутаций в 9-ом экзоне гена кальретикулина (CALR), обнаруживаемые у 60% среди тех пациентов с ЭТ и ПМФ, которые не имеют мутаций в генах JAK2 и MPL; при этом мутации CALR не выявляются при ИП. С 2016 г. тест на выявление мутаций CALR был включён в рекомендации ВОЗ [4] и в российские клинические рекомендации [5] в качестве одного из основных критериев дифференциальной диагностики ХМН и подтверждения ЭТ и ПМФ.

CALR является Ca²⁺-связывающим белком, преимущественно локализованным в эндоплазматическом ретикулуме с универсальными функциями. Как шаперон, он участвует в фолдинге и контроле синтеза гликопротеинов, вовлечен в регуляцию Ca²⁺-зависимых сигнальных процессов, в том числе апоптоз клеток, их миграцию, адгезию и множество других клеточных функций [6].

Клинически значимые для ХМН мутации в гене CALR вызывают сдвиг рамки считывания и обрыв терминального C-участка синтезируемой пептидной цепочки. В результате у образующегося белка отсутствует аминокислотная последовательность «возврата-задержки» Lys-Asp-Glu-Leu, ответственная за удержание кальретикулина в эндоплазматическом ретикулуме. Показано, что в таком «укороченном» варианте кальретикулин способен выступать в качестве «нефизиологического» стимулятора рецепторов тромбопоэтина

[7], тем самым провоцируя гиперактивацию сигнального пути MPL-JAK2-STAT и вызывая избыточную пролиферацию мегакариобластов.

Наиболее часто в 9-ом экзоне CALR встречаются мутация I типа: делеция с.1092_1143del52bp – 53–65%, и II типа: инсерция с.1154_1155insTTGTGTC – 32%, в остальных 3–15% случаев определяются редкие типы мутаций [2, 3, 8]. В связи с тем, что делеции в отличие от инсерций сопровождаются утратой существенной части Ca²⁺-связывающей области белка, I тип мутаций характеризуется также и снижением мобилизации цитоплазматического Ca²⁺ в ответ на активационные стимулы [6].

Пациенты с мутациями в гене CALR – это преимущественно мужчины, отличаются ранним началом заболевания, имеют более высокие значения тромбоцитоза, но при этом меньший риск развития серьёзных тромботических и геморрагических осложнений [9, 10]. Ряд авторов предлагают объединить таких пациентов в отдельную клиническую группу с более благоприятным прогнозом и ответом на терапию интерфероном [11].

Большинство лабораторий для выявления мутаций в 9-ом экзоне CALR в пробах венозной крови используют классическую ПЦР с последующим фрагментным анализом или секвенированием по Сэнгеру [12]. Предложены также методы детекции, основанные на анализе кривых плавления ДНК высокого разрешения [13]. В практике клинико-диагностических лабораторий используется также метод пиросеквенирования [13]. Вместе с тем данные методы не лишены недостатков, они достаточно трудоёмкие и требуют использования дорогостоящего оборудования. Их существенным недостатком также является ограниченный предел аналитической чувствительности (10–20%). Единственный известный более чувствительный (0,08–0,6%) коммерческий набор Ipsogen® CALR RGQ PCR Kit для выполнения аллель-специфической ПЦР-РВ [14] валидирован только для одного прибора – Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (Qiagen cat. no. 9002032) и двух наборов тех же производителей для выделения ДНК. Кроме того, набор не имеет на сегодняшний день официального разрешения для клинического использования в качестве медицинского изделия. Ранее отдельными авторами настоящей работы был разработан метод аллель-специфической ПЦР для выявления мутаций в гене CALR [15] и продемонстрированы его диагностические возможности [16].

Цель работы – сравнение результатов выявления мутаций гена CALR методами аллель-специфической ПЦР-РВ с по-

следующим электрофорезом, фрагментным анализом и секвенированием.

Материал и методы. В настоящей работе тестировали образцы крови 1284 пациентов, поступивших для проведения молекулярно-генетических исследований при подозрении на ХМН, а также пациентов с установленным диагнозом, с целью мониторинга за трансформированным клоном клеток. Все поступившие образцы венозной крови пациентов тестировались в параллельном алгоритме на все основные драйверные мутации ХМН как описано ранее [17]. Взятие крови производили в вакутейнеры с К2-ЭДТА. Для выделения ДНК из лейкоцитов цельной крови использовали набор реагентов «Нуклео-Экстра» («Формула гена», Красноярск). Наличие мутаций I и II типа в гене CALR определяли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием зондов TaqMan на приборах IQ5 или CFX96 (Bio-Rad, США).

Алель-специфическая ПЦР-РВ с электрофетической детекцией продуктов амплификации. Подбор праймеров при разработке метода ПЦР-РВ был выполнен с помощью программного продукта Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, США). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала 1X ПЦР-буфер, 0,25 mM MgCl₂ (ООО «Формула гена», Красноярск), 0,25 mM dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы («Синтол», Москва), 200 нМ каждого праймера и зонда. Использовали следующие праймеры:

Прямой праймер на дикий тип – 5'-ТААСAAAGGTG-AGGCCTGGT-3'

Прямой праймер на мутацию I типа – 5'-AAACAGGAC-GAGGAGCAGAGGA-3'

Прямой праймер на мутацию II типа – 5'-GAGGAGGCA-GAGGACAATTG-3'

Обратный праймер (общий) – 5'-GCCTCTCTACAGCTCG-TCCCTT-3'

TaqMan-зонд – FAM-TGAGGATGAGGAGGATGAGG-BHQ1

В реакцию добавляли 20–100 нг геномной ДНК.

Продукты амплификации для определения более редких типов мутаций CALR после выполнения анализа в режиме реального времени разделяли в 3% агарозном геле в триацетатном буфере. Гель документировали после окрашивания бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали реагент O'GeneRuler® с маркерами мол. масс 25–700 длины фрагментов (Thermo Scientific). Для определения чувствительности и линейности метода использовали сконструированную плазмиду на основе вектора pAL2-TA. Линейность и чувствительность метода оценивали по пороговым циклам (Cq) графиков накопления флуоресцентного сигнала в серии 10-кратных разведений плазмиды.

Фрагментный анализ участка 9-го экзона гена CALR.

Для амплификации участка 9-го экзона гена CALR использовали пару праймеров: 5'-CTGAGGTGTGTGCTCTGCC3' и 5'-FAMCAGAGACATGATTTGGCGCGG 3'. Длина фрагмента участка 9-го экзона гена CALR, соответствующая дикому типу, составляла 301 п.н.

Секвенирование ДНК. Подбор праймеров при разработке метода был выполнен с помощью программного продукта PSQ Assay Desig (Qiagen, Германия). Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала dNTP (0,88 mM), 0,5 мкл реактива «Полимераза TaqF», 10 мкл реактива «2,5x ПЦР-буфера blue» и 280 нМ каждого праймера. Все реагенты были произведены ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии

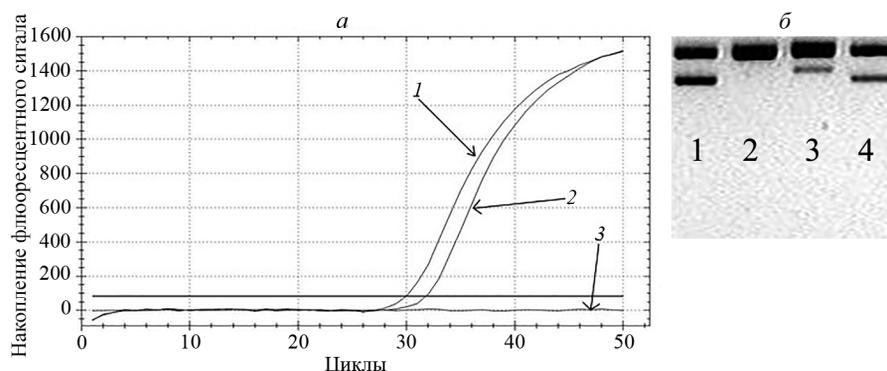


Рис. 1. Примеры результатов ПЦР-РВ и электрофореза в пробах с различными типами мутаций в гене CALR.

а - график накопления флуоресцентного сигнала в ходе ПЦР-РВ: 1-проба с мутацией CALR I типа; 2-проба с мутацией CALR II типа; 3-проба без мутаций CALR или с мутацией редко встречающегося типа; *б* - электрофореграмма: 1-проба с мутацией CALR I типа; 2-проба без мутаций CALR; 3-проба с мутацией CALR II типа; 4-проба с мутацией редко встречающегося типа.

Роспотребнадзора («АмплиСенс®», Россия). Использовали следующие праймеры:

Прямой праймер – 5'-Biotin-GCAGCAGAGAAACAATGAAGGACAAAAC-3'

Обратный праймер – 5'-AGGCAGGCCTCTCTACAGCTCGT-3'

В реакцию добавляли 20–100 нг геномной ДНК.

Амплификацию проводили на амплификаторе Maxyge (Axugen, США) по программе: 95°C – 15 мин; 95°C – 15 с, 60°C – 15 с, 72°C – 20 с (45 циклов).

Проведение секвенирования по Сэнгеру проводили с использованием реагентов фирмы Applied Biosystems (США) и генетического анализатора 3500xL (Applied Biosystems, США) с теми же праймерами. Все действия (пробоподготовка продуктов ПЦР, секвенирующая амплификация и капиллярный электрофорез) проведены согласно инструкции изготовителя.

Определение нуклеотидных последовательностей с использованием технологии пиросеквенирования проведено с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24 согласно рекомендациям производителя (Qiagen, Германия). Для пиросеквенирования использовали 7 мкл продукта амплификации, пробоподготовку проводили с использованием набора реактивов «Пироскрин» («АмплиСенс®», Россия) [13]. Реакционная смесь для пиросеквенирования (25 мкл) содержала следующие праймеры в концентрации 300 нМ:

праймер на мутацию I типа – 5'-CATCATCCTCC-TTGTCTCT-3'

праймер на мутацию II типа – 5'-TCTTTGTCCTCA-TCATCCTC-3'.

Секвенируемые участки имели следующие последовательности:

GC[CTCCTCCTCCTCTTTGCG
TTTCTTGTCTTCTTCTCCTCCTCCTTAAGCCTCTG
C]TCCTCGTCTGTTTGTCTTCAATT (для ана-

лиза мутации c.1092_1143del52bp) и C[GACAA]
TTGTCTCTGCTCCTCCTCCTCTT (для анализа мутации

c.1154_1155insTTGTCTC). Обработку результатов проводили в количественном формате с помощью программного обеспечения PyroMark Q24 (Qiagen, Германия).

Все образцы с мутациями, отличающимися от I и II типа, давали искажение сигнала при пиросеквенировании в консервативных и полиморфных областях, в связи с чем они были повторно секвенированы на приборе PyroMark Q24 в формате *de novo* (последовательное добавление по очереди нуклеотидов: Nx[AGTC]) и методом Сэнгера в качестве подтверждающего золотого стандарта.

Результаты. На рис. 1 представлены результаты определения мутантных вариантов гена CALR I и II типа в ПЦР-

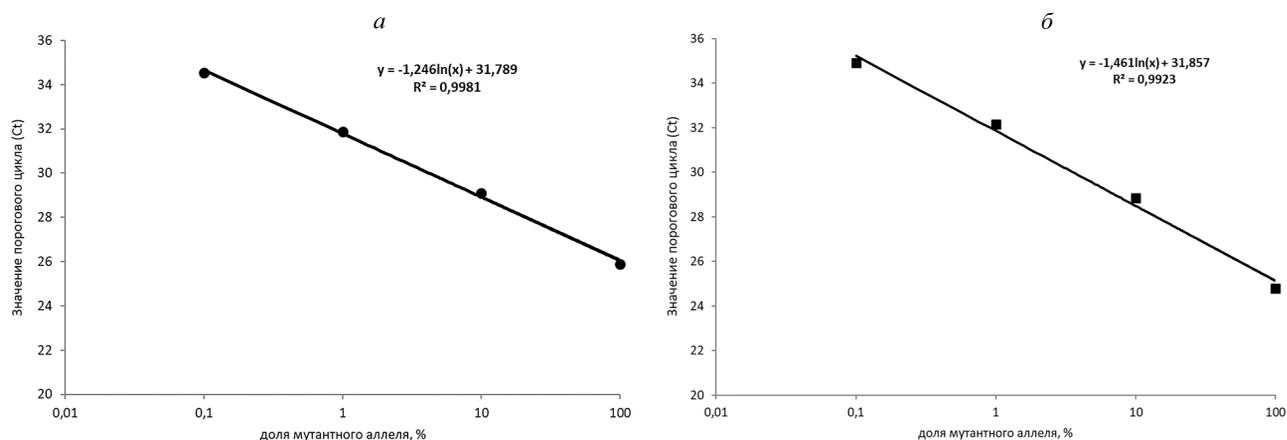


Рис. 2. Стандартная кривая, полученная после проведения ПЦР-РВ в пробах плазмид с разными концентрациями мутантного аллеля: а – мутация CALR I типа; б – мутация CALR II типа.

РВ и пример выявления нестандартной мутации CALR при электрофоретической детекции.

Результаты детекции стандартных разведений плазмидной ДНК с характерными для мутантных вариантов гена CALR I и II типа последовательностями представлены на рис. 2. Данные демонстрируют чёткую линейную зависимость величины порогового цикла от внесённой концентрации плазмиды. При этом максимальный 35-й цикл соответствует минимально детектируемой концентрации 0,1% плазмидной ДНК, разведённой в ДНК, содержащей неизменный ген CALR.

Стандартное отклонение величины пороговых циклов при проведении 20 последовательных тестов с использованием стандарта плазмид с концентрацией мутантного аллеля 10% составило 0,49 для мутантного аллеля CALR I и II типа. При дублированном тестировании проб пациента в разных аналитических сериях стандартное отклонение составляло не более 0,3. Из 20 проб здоровых доноров крови при тестировании использованным методом не было выявлено ни одного случая ложноположительного результата.

В табл. 1 представлены итоговые результаты тестирования проб венозной крови пациентов, направленных врачами-гематологами в лабораторию с подозрением на ХМН в период с 2012 по 2016 г. Среди обследованных пациентов у большей части (75%) диагноз онкогематологического заболевания в последующем не подтвердился. Использование параллельного алгоритма тестирования позволило выявить мутации в гене CALR у 48% пациентов с ЭТ и у 61% пациентов с МФ. Доля выявляемых мутаций CALR I и II типа составили 49 и

42%, нестандартные мутации составили 8% от всех выявленных мутаций 9-го экзона CALR. Нами не было обнаружено ни одного случая данной мутации у пациентов с ИП или при вторичных неклональных гематологических нарушениях.

В отобранных случайным образом 20 отрицательных пробах при секвенировании по Сэнгеру было определено наличие только интактного участка 9-го экзона CALR. Все пробы с положительными результатами выявления мутаций CALR в дальнейшем были верифицированы альтернативными методами детекции.

Результаты независимо проведённого для части образцов фрагментарного анализа (табл. 2) совпали с результатами ПЦР-РВ полностью в 13 пробах по II типу мутации и в 28 из 31 случая выявления мутации I типа. В трёх discordantных случаях в результате фрагментного анализа пробы были определены как содержащие нестандартные мутации:

Таблица 2

Сравнение результатов определения мутаций CALR методом ПЦР-РВ с последующим электрофорезом с результатами детекции методом фрагментного анализа

Типы мутаций CALR	ПЦР-РВ +электрофорез	Фрагментный анализ
CALR I тип с.1092_1143del	31	28
CALR II тип с.1154_1155insTTGTC	13	13
Редкие мутации CALR	6	9
Всего	50	50

Таблица 1

Результаты определения мутаций в гене CALR у обследованных пациентов методом ПЦР-РВ с последующей электрофоретической детекцией

Типы мутаций CALR	Всего	ИП	ЭТ	МФ	Неподтвержденный диагноз ХМН, вторичные эритроцитозы
Без мутаций CALR	1193	121*	81**	11**	959
CALR I тип с.1092_1143del	45	0	38	7	0
CALR II тип с.1154_1155insTTGTC	39	0	30	9	0
Редкие мутации CALR	8	0	6	2	0

Примечание. * – пробы, позитивные в тестах выявления мутации в гене JAK2; ** – пробы, позитивные в тестах выявления мутации в генах JAK2 или MPL.

Таблица 3

Сравнение результатов определения мутаций CALR методом ПЦР-РВ с последующим электрофорезом с результатами пиросеквенирования

Типы мутаций CALR	ПЦР-РВ +электрофорез	Пиросеквенирование
CALR I тип с.1092_1143del	39	37
CALR II тип с.1154_1155insTTGTC	36	35
Редкие мутации CALR	5	7 (1)*
Всего	80	79

Примечание. * – одна проба с нестандартной мутацией, определённой при электрофорезе и в результате фрагментного анализа (делеция 65 нуклеотидов) имела сомнительный результат при пиросеквенировании. Её не удалось идентифицировать при секвенировании в связи с недостаточной аллельной нагрузкой в анализируемом образце.

две пробы с делецией 50 нуклеотидов и одна с делецией 46 нуклеотидов. При этом все 6 нестандартных мутаций, выявленных в результате электрофоретической детекции, совпали с данными фрагментного анализа.

Использование метода пиросеквенирования при независимом исследовании 80 образцов (табл. 3) продемонстрировало высокий уровень совпадения результатов выявления мутаций CALR I и II типа. Две мутации, определённые в ПЦР-РВ как делеции I типа, при пиросеквенировании и последующем секвенировании по Сэнгеру оказались редко встречающимися мутациями гена CALR – с.1105_с.1142 del38bp и с.1094_с.1139 del46bp. Одна из мутаций CALR II типа при секвенировании по Сэнгеру и при пиросеквенировании была идентифицирована как редкий вариант: с.1154_с.1155 insGTGTC.

Обсуждение. Сравнение методов тестирования образцов венозной крови пациентов с ЭТ и МФ продемонстрировало полное совпадение факта выявления клинически значимых мутаций в 9-ом экзоне гена CALR, при этом в 95% случаев определяется совпадение также и по типу мутаций. Выявляемые дискордантные результаты относятся только к вопросам дифференцировки мутации II типа с редко встречающимися типами делеций в гене CALR, мутации I типа с редко встречающимися типами инсерций в гене CALR. Ни в одном из случаев расхождения результатов не было выявлено вариантов несовпадения между мутациями I и II типа. Поэтому результаты тестирования крови с использованием любого из представленных молекулярно-генетических методов будут иметь одинаковое клиническое значение. Большая доступность и сравнительная простота использования методов ПЦР-РВ и электрофореза позволяют рекомендовать разработанный метод к использованию в клинико-диагностических лабораториях. Отсутствие ложноположительных результатов при тестировании доноров и пациентов с ИП свидетельствует о достаточно высокой специфичности описанного метода ПЦР-РВ. Кроме того, более высокая чувствительность аллель-специфической ПЦР-РВ позволяет выявлять мутации при более низких значениях аллельной нагрузки, хотя данный метод пока не может быть рекомендован как количественный тест, поскольку для этого требуются дополнительные доказательства.

Вместе с тем в случае, если предел чувствительности теста менее 1% мутантного варианта ДНК, возникает опасность неправильной интерпретации результата клиницистами, поскольку минимальные пулы циркулирующих клональных клеток могут не оказывать влияния на проявление клинических симптомов или прогноза заболевания. В этом случае применение менее чувствительных методов, определяющих не менее 10% аллельной нагрузки, будет более предпочтительным для клинического использования. Более того, для выделения и сравнения клинической картины заболевания в группах пациентов с редкими типами мутаций методы секвенирования однозначно не имеют конкуренции в специфичности определения идентифицируемых мутаций.

Заключение. Таким образом, в настоящем исследовании продемонстрирована возможность использования для выявления мутаций в гене CALR метода аллель-специфической ПЦР-РВ с последующим электрофоретическим разделением продуктов реакции. Результаты предложенного алгоритма тестирования полностью совпадают по своей клинической значимости с результатами фрагментного анализа и пиросеквенирования. Разработанный метод может быть рекомендован для использования в алгоритме диагностики ХМН.

Благодарности. Авторы выражают признательность врачам-гематологам КГБУЗ “Красноярская краевая клиническая больница” Е.В. Васильеву, М.Г. Смелянской и врачам-гематологам КГБУЗ “Городская клиническая больница № 7” М.А. Михалёву и Т.И. Ольховик за участие в подборе проб крови пациентов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-4, 6-12 см. REFERENCES)

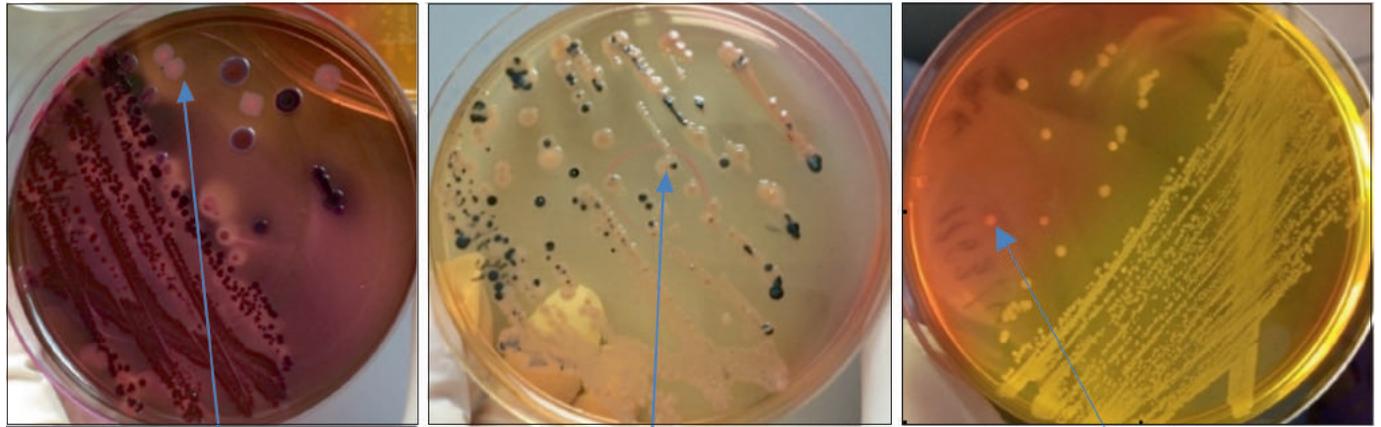
1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич В.С. Миелолипролиферативные новообразования. М.: Литтерра; 2016.
5. Меликян А.Л., Туркина А.Г., Ковригина А.М., Суборцева И.Н., Судариков А.Б., Соколова М.А. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелолипролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (ред. 2016 г.). *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(S1): 25-60.
13. Миронов К.О., Дунаева Е.А., Дрибноходова О.П., Шипулин Г.А. Опыт использования систем генетического анализа на основе технологии пиросеквенирования. *Справочник заведующего КДЛ*. 2016; 5: 33-42.
14. Доступно по: <https://www.qiagen.com/no/shop/new-products/real-time-pcr/ipsogen-calr-rq-pcr-kit-ce/#resources> Ссылка активна на 20.03.2018.
15. Горбенко А.С., Столяр М.А., Ольховский И.А. Разработка молекулярно-генетического теста выявления мутаций в гене кальретикулина (CALR). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(9):29.
16. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Васильев Е.В., Виноградова Е.Ю. и др. Определение мутации в гене кальретикулина у пациентов с подозрением на хронические миелолипролиферативные неоплазии. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59(3): 12-5.
17. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Субботина Т.Н., Столяр М.А. Современные возможности молекулярно-генетического анализа в диагностике хронических миелоидных опухолей. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. 2015;4(18):44-6.

REFERENCES

1. Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich V.S. *Myeloproliferative neoplasms [Mieloproliferativnyye novoobrazovaniya]*. Moscow: Litterra; 2016. (in Russian)
2. Klampf T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S., Nivarthi H., Rumi E., Milosevic J.D., et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(25): 2379-90.
3. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J., Nice F.L., Gundem G., Wedge D.C., et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(25): 2391-405.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20): 2391-405.
5. Melikyan A.L., Turkina A.G., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., Sudarikov A.B., Sokolova M.A. et al. Clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis) (edition 2016). *Gematologiya i transfuziologiya*. 2017; 62(S1): 25-60. (in Russian)
6. Shivarov V., Ivanova M., Tiu R.V. Mutated calreticulin retains structurally disordered C terminus that cannot bind Ca²⁺: some mechanistic and therapeutic implications. *Blood Cancer J.* 2014; 4(2): e185.
7. Stanley R.F., Steidl U. Molecular Mechanism of Mutant CALR-Mediated Transformation. *Cancer Discov.* 2016; 6(4): 344-6.
8. Imai M., Araki M., Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Int. J. Hematol.* 2017; 105(6): 743-7.
9. Rotunno G., Mannarelli C., Guglielmelli P., Pacilli A., Pancrazzi A., Pieri L. et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*. 2014; 123(10): 1552-5.
10. Rumi E., Pietra D., Ferretti V., Klampf T., Harutyunyan A.S., Milosevic J.D. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014; 123(10):1544-51.
11. Cassinat B., Verger E., Kiladjian J.J. Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371: 188-9.
12. Gardner J.A., Peterson J.D., Turner S.A., Soares B.L., Lancor C.R., Dos Santos L.L. et al. Detection of CALR Mutation in Clonal and Nonclonal Hematologic Diseases Using Fragment Analysis and Next-Generation Sequencing. *Am. J. Clin. Pathol.* 2016; 146(4): 448-55.
13. Mironov K.O., Dunayeva Ye.A., Dribnokhodova O.P., Shipulin G.A. Experience in using genetic analysis systems based on pyrosequencing technology. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2016; 5: 33-42. (in Russian)
14. Qiagen. Available at: <https://www.qiagen.com/no/shop/new-products/real-time-pcr/ipsogen-calr-rq-pcr-kit-ce/#resources> (accessed 20 March 2018).
15. Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Olkhovskiy I.A. Development of a molecular genetic test for the detection of mutations in the calreticulin gene (CALR). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(9): 29. (in Russian)
16. Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Vasiliev E.V., Vinogradova E.Yu. et al. Identification of mutation in calreticulin gene in patients with suspicion on chronic myeloproliferative diseases. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014; 3(59): 12-5. (in Russian)
17. Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Vasiliev E.V., Vinogradova E.Yu. et al. Modern possibilities of molecular-genetic analysis in diagnosis of chronic myeloid tumors. *Meditsinskiy alfavit*. 2015; 4(18): 44-6. (in Russian)

Поступила 19.04.18

Принята к печати 11.05.18



Колонии, подозрительные на сальмонеллы, на среде Левина-ГРМ.

Колонии, подозрительные на сальмонеллы, на SS-агаре.

Колонии, подозрительные на сальмонеллы, на БФЛС-ГРМ-агаре.

Рис. 1. Рост на среде Левина-ГРМ, SS-агаре, БФЛС-ГРМ-агаре.



Рис. 2. Посев на SS-агар после накопления образца в магниевой среде.



Рис. 3. Посев на SS-агар после накопления образца в селенитовом бульоне.



Рис. 4. РА на стекле с O-сывороткой.

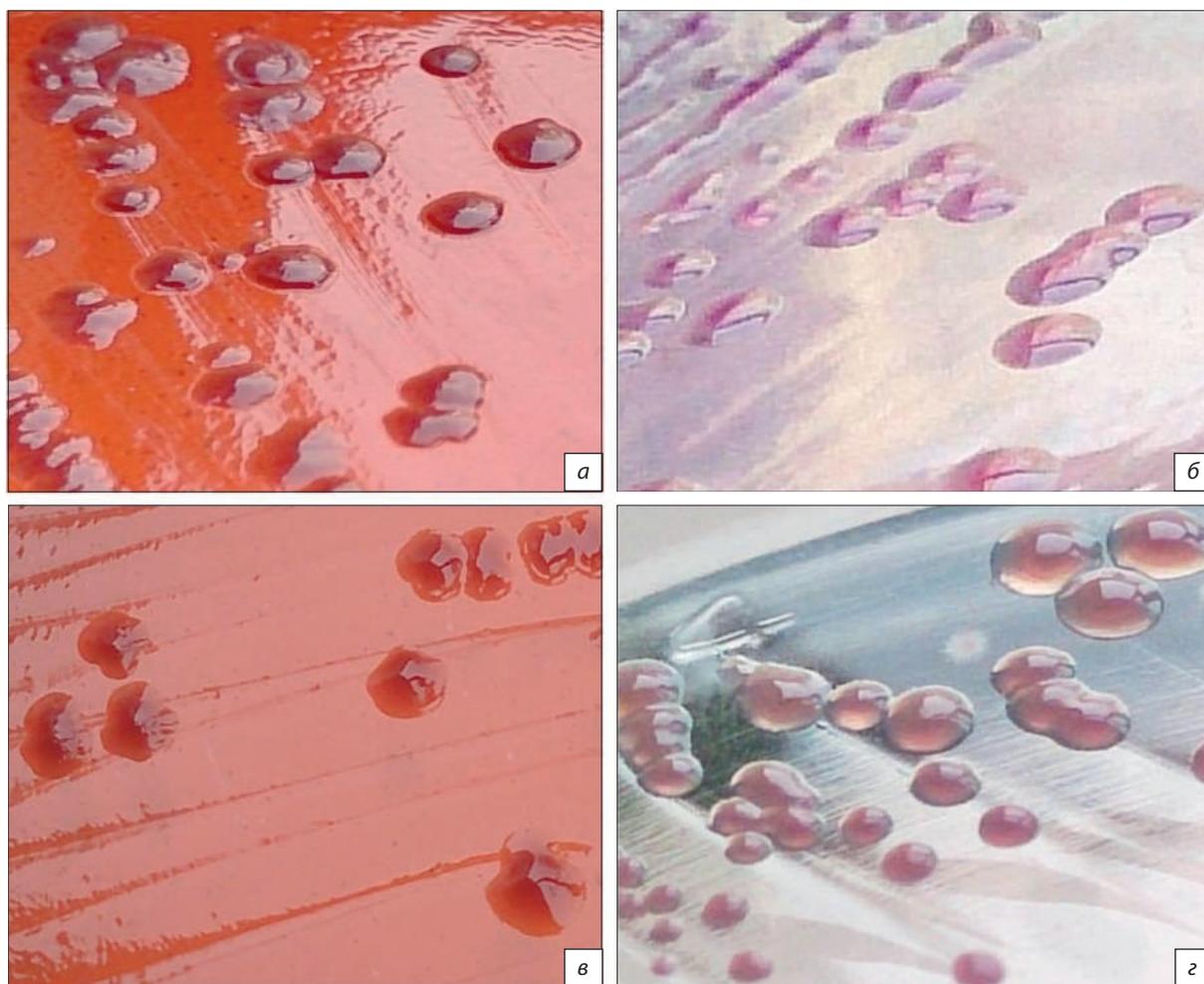


Рис. 1. Колонии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* выращенные на среде Серова и на основе селективного агара. *а* – *Y. pseudotuberculosis* на среде Серова; *б* – *Y. pseudotuberculosis* на основе селективного агара; *в* – *Y. enterocolitica* на среде Серова; *г* – *Y. enterocolitica* на основе селективного агара.