

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.

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 64
6 • 2019

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

ИЮНЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостاپовская 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

Сдано в набор 25.05.2019.

Подписано в печать 30.05.2019.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.akc.ru,

www-pressa-ru

Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2019. № 6. 321–385.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор **В.Н. ТИТОВ**

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИ-
НА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, А.Ю. МИРОНОВ
(зам. главного редактора), В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. ПИ-
МЕНОВА (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 (Красно-
ярск), В.С. ГУДУМАК (Кишинёв), Н.Г. ДАШКОВА (Москва),
В.А. ДЕЕВ (Киев), Т.И. ДОЛГИХ (Омск), С.А. ЕЛЬЧАНИНО-
ВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск), А. KALLNER (Шве-
ция, 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), Е.Н. ОВАНЕСОВ
(Москва), Ю.В. ПЕРВУШИН (Ставрополь), И.В. ПИКАЛОВ
(Новосибирск), Ю.П. РЕЗНИКОВ (Москва), Д.Б. САПРЫ-
ГИН (Москва), С.Н. СУПЛОТОВ (Тюмень), О.А. ТАРАСЕН-
КО (Москва), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (Москва), А.Б. УТЕ-
ШЕВ (Алматы), Л.А. ХОРОВСКАЯ (Санкт-Петербург),
С.В. ЦВИРЕНКО (Екатеринбург), А.Н. ШИБАНОВ (Моск-
ва), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (Санкт-Петербург), Г.А. ЯРОВАЯ
(Москва)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ Диагностика

Volume 64
6 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JUNE

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

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V.N. TITOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICH-
NA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, A.Yu. MIRO-
NOV (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 (*Sara-
tov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*),
N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MA-
VZYTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV
(*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN
(*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV
(*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyu-
men'*), 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-Peter-
burg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Карганов М.Ю.** Резистентность к инсулину – алиментарный дефицит субстратов энергии (глюкозы) в биологической реакции экзотрофии и афизиологичная компенсация жирными кислотами за счет биологической реакции эндотрофии. 324
- Бельская Л.В.** Возможности применения слюны для диагностики онкологических заболеваний. 333
- Ахмедова Д.И., Ахмедова Н.Р., Арипов А.Н., Маткаримова А.А.** Биохимические маркеры поражения миокарда у детей с кардиомиопатиями. 337
- Рак А.Я., Трофимов А.В., Петров А.В., Горбунов Н.П., Ищенко А.М.** Динамика сывороточных уровней общего и биологически активного антимюллерова гормона у человека в различные периоды жизни. 342

ЦИТОЛОГИЯ

- Захарова Н.М., Шабалова И.П., Али-заде Г.Х., Рябцева А.А., Ветчинникова О.Н., Акберова С.И.** Метод импрессионной цитологии в диагностике синдрома сухого глаза. 348

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Арзуманян В.Г., Ильина И.В., Васильева Г.В., Магаршак О.О., Миронов А.Ю.** Новое в клинической лабораторной диагностике дерматофитных грибов у детей с atopическим дерматитом. 351
- Чеканова Т.А., Неталиева С.Ж., Шпынов С.Н., Бабаева М.А., Костарной А.В.** Ретроспективная серологическая диагностика риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки на территории высокого риска инфицирования *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*. 354
- Косилова И.С., Домотенко Л.В., Фурсова Н.К., Дентовская С.В., Ершова М.Г., Шепелин А.П.** Испытания питательной среды отечественного производства «Агар Мюллера-Хинтон II – Оболенск». 360
- Егорова С.А., Кафтырева Л.А.** Методические особенности определения чувствительности штаммов *Salmonella* к антимикробным препаратам (обзор литературы). 368
- Кимирилова О.Г., Харченко Г.А.** Диагностика гиардиаза у детей с применением методов микроскопии, иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции. 376

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Покровская М.С., Борисова А.Л., Сивакова О.В., Метельская В.А., Мешков А.Н., Шаталова А.М., Драпкина О.М.** Управление качеством в биобанке. Мировые тенденции и опыт биобанка ФГБУ «НМИЦ профилактической медицины» Минздрава России. 380

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Karganov M.Yu.** Insulin resistance is an alimentary deficiency of energy substrates (glucose) in the biological reaction of exotrophy and aphysiology compensation by fatty acids via the biological reaction of endotrophy 324
- Bel'skaya L.V.** Possible applications of saliva for the diagnosis of cancer 333
- Akhmedova D.I., Akhmedova N.R., Aripov A.N., Matkarimova A.A.** Biochemical markers of myocardium damage in children with cardiomyopathy 337
- Rak A.Ya., Trofimov A.V., Petrov A.V., Gorbunov N.P., Ischenko A.M.** The dynamics of human total and activated anti-mullerian hormone serum levels in different life periods 342

CYTOLOGY

- Zakharova N.M., Shabalova I.P., Ali-Zade G. H., Rjabtseva A.A., Vetchinnikova O.N., Akberova S.I.** Impressionable cytology method in diagnostics of dry eye syndrome 348

MICROBIOLOGY

- Arzumanyan V. G., Il'ina I. V., Vasilieva G. V., Magarshak O. O., Mironov A. Yu.** New in clinical laboratory diagnostics of dermatophyte fungi in children with atopical dermatitis 351
- Chekanova T.A., Netaliev S.Zh., Shpynov S.N., Babaeva M.A., Kostarnoy A.V.** Retrospective serological diagnostics of spotted fever group Rickettsioses in high risk areas of *Rickettsia conorii* subsp. *caspia* infection 354
- Kosilova I.S., Domotenko L. V., Fursova N.K., Dentovskaya S.V., Ershova M.G., Shepelin A.P.** Trials of the domestically produced nutrient medium «Agar Muller-Hinton II – Obolensk» 360
- Egorova S.A., Kaftyreva L.A.** Methodical aspects of antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* (review of literature) 368
- Kimirilova O.G., Kharchenko G.A.** Diagnosis of giardiasis in children: results of a retrospective cohort study 376

LABORATORY SERVICE OF ORGANIZATION

- Pokrovskaya M.S., Borisova A.L., Sivakova O.V., Metelskaya V.A., Meshkov A.N., Shatalova A.M., Drapkina O.M.** Quality management in biobank. World tendencies and experience of biobank of FSI "NMRC for preventive medicine" of the Ministry of healthcare of Russia 380

БИОХИМИЯ

© ТИТОВ В.Н., КАРГАНОВ М.Ю., 2019

Титов В.Н.¹, Карганов М.Ю.²

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ИНСУЛИНУ – АЛИМЕНТАРНЫЙ ДЕФИЦИТ СУБСТРАТОВ ЭНЕРГИИ (ГЛЮКОЗЫ) В БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ЭКЗОТРОФИИ И АФИЗИОЛОГИЧНАЯ КОМПЕНСАЦИЯ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ ЗА СЧЕТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ ЭНДОТРОФИИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва, Россия;

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, Москва, Россия

Дефицит субстратов энергии в биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии формируют два фактора. Избыток плотоядной пищи, приводит к высокому содержанию в гепатоцитах пальмитиновой жирной кислоты (ЖК) и таких же одноименных форм триглицеридов (ТГ). Постгепариновая липопротеинлипаза + apoC-II медленно гидролизует пальмитиновые ТГ в составе одноименных липопротеинов в крови, освобождая малое количество жирных кислот (ЖК). При низком содержании в пище углеводов (глюкозы), в биологической реакции экзотрофии нет субстрата, из которого гепатоциты могли бы быстро синтезировать олеиновую НЭЖК *de novo*. Дефицит субстратов энергии активизирует биологическую функцию адаптации, биологическую реакцию компенсации. При компенсаторном действии *in vivo* адреналина, восполнение недостатка НЭЖК происходит за счет активации биологической реакции эндотрофии, липолиза в висцеральных жировых клетках сальника. При синдроме резистентности к инсулину (ИР) происходит афизиологичная реализация биологической функции питания и физиологичная реакция биологической функции адаптации. Повышение в кровотоке содержания НЭЖК физиологично блокирует поглощение клетками глюкозы. Биологическая (антропогенная) роль инсулина состоит в превращении плотоядных (рыбоядных) предков вида *Homo sapiens* из океана с пальмитиновым вариантом метаболизма ЖК, в травоядные виды на суше с более совершенным олеиновым вариантом наработки клетками ЖК и энергии. Синдром ИР можно нормализовать; для этого необходимо: а) желание пациента активировать когнитивную биологическую функцию, интеллект и б) понимание, что на ступенях филогенеза, при жизни на суше вид *Homo sapiens* сформировался как травоядный. «Мясоедом» человек никогда не был и биологически стать им не может. И если с позиций летальности в популяциях стран мира доминирует патология сердечно-сосудистой системы, по частоте же лидируют нарушения функции питания. Они являются патогенетической основой всех метаболических пандемий, это: 1. атеросклероз и атероматоз; 2. метаболическая, эссенциальная артериальная гипертензия; 3. метаболический синдром; 4. ожирение; 5. синдром резистентности к инсулину; 6. неалкогольная жировая болезнь печени и 7. эндогенная гиперурикемия. Основным нарушением метаболизма, которое сопровождает пациентов с синдромом ИР, является постоянный, потенциальный дефицит энергии при реализации всех биологических функций и биологических реакций. Резистентность к инсулину – патология, в первую очередь, ЖК и во вторую – глюкозы; это патология биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии.

Ключевые слова: биологическая функция питания; экзотрофия; эндотрофия; синдром резистентности к инсулину; жирные кислоты.

Для цитирования: Титов В.Н., Карганов М.Ю. Резистентность к инсулину – алиментарный дефицит субстратов энергии (глюкозы) в биологической реакции экзотрофии и афизиологичная компенсация жирными кислотами за счет биологической реакции эндотрофии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 324-332.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-324-332>

Titov V.N.¹, Karganov M.Yu.²

INSULIN RESISTANCE IS AN ALIMENTARY DEFICIENCY OF ENERGY SUBSTRATES (GLUCOSE) IN THE BIOLOGICAL REACTION OF EXOTROPHY AND APHYSIOLOGY COMPENSATION BY FATTY ACIDS VIA THE BIOLOGICAL REACTION OF ENDOTROPHY

¹National Medical Research Center for Cardiology, 121552, Moscow;

²FGBNU "Research Institute of General Pathology and Pathophysiology", 125315, Moscow

The deficiency of energy substrates in the biological function of trophology and biological reaction of exotrophy is formed by two factors. Excess of meat in the diet leads to high content of palmitic fatty acid (FA) in hepatocytes and formation of palmitic triglycerides (TG). Post heparin lipoprotein lipase slowly hydrolyzes palmitic TG in blood plasma lipoproteins and releases small amounts of FA. If dietary carbohydrate content is low, the biological function of exotrophy does not provide the substrate from which hepatocytes can rapidly produce oleic nonesterified FA *de novo*. Energy substrate deficiency activates the biological function of adaptation and the biological reaction of compensation. Under the effect of epinephrin NEFA deficiency is compensated via the biological reaction of endotrophy and lipolysis in omental visceral fat cells. In insulin resistance (IR) syndrome, the biological function of feeding is realized nonphysiologically while the biological reaction of adaptation is realized physiologically. An increase in NEFA blood content physiologically blocks glucose uptake in cells.

Для корреспонденции: Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. клин. биохимии липидного обмена; e-mail: vn_titov@mail.ru

Biological role of insulin consists in conversion of distant ocean-living carnivorous (fish-eating) ancestors of Homo sapiens with palmitic type of FA metabolism into herbivorous dry land-living species with oleic type metabolism of FA. The IR syndrome can be normalized. To this end a) the patient's will to activate the cognitive biological function (intellect) and b) comprehension of the fact that phylogenetically dry land-living Homo sapiens has developed as a herbivorous but not carnivorous species. Concerning death rate, cardiovascular pathologies are dominating in populations of many countries, while feeding function disorders prevail in frequency. These disorders form the pathophysiological basis for all metabolic pandemics: 1) atherosclerosis and atheromatosis, 2) essential arterial hypertension, 3) metabolic syndrome, 4) obesity, 5) insulin resistance syndrome, 6) nonalcoholic fatty liver disease, and 7) endogenous hyperuricemia. Persistent potential deficiency of energy for realization of all biological reactions and functions is the major metabolic disorders in diabetes mellitus. Insulin resistance is a pathology associated primarily with FA and secondarily with glucose.

Key words: biological function of feeding; endotrophy; insulin resistance syndrome; fatty acids.

For correspondence: Titov V. N., doctor of medical sciences, professor, chief researcher of the laboratory of clinical biochemistry of lipid Exchange; e-mail: vn_titov@mail.ru

For citation: Titov V.N., Karganov M.Yu. Insulin resistance is an alimentary deficiency of energy substrates (glucose) in the biological reaction of exotrophy and aphysiology compensation by fatty acids via the biological reaction of endotrophy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64(6) 324-332 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-324-332>

Acknowledgment. This study had no sponsorship.

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

Received 23.04.2019
Accepted 29.04.2019

Синдром инсулинорезистентности (ИР) - нарушение биохимических реакций метаболизма *in vivo*, блокада действия инсулина и постоянно повышенное содержание глюкозы в плазме крови. Со временем, к этим нарушениям метаболизма присоединяется афизиологичное повышение концентрации инсулина, который секретируют β -клетки островков поджелудочной железы. Синдром ИР определяют как нарушение биологического ответа на стимуляцию гормоном реакций метаболизма во всех зависимых от инсулина клетках [1]. Клетками этими являются: 1. поперечнополосатые, скелетные миоциты; 2. синцитий кардиомиоцитов; 3. перипортальные гепатоциты; 4. инсулинзависимые подкожные адипоциты (ИПА) и 5. специализированные, оседлые макрофаги печени – клетки Купфера. Клетки же висцеральной жировой ткани (ВЖК) сальника в филогенезе сформировались на миллионы лет ранее, чем β -клетки начали синтез инсулина; действие инсулина филогенетически не затрагивает процессы метаболизма в ВЖК сальника.

Согласно филогенетической теории общей патологии [2], синдром ИР является нарушением биологической функции трофологии, функции питания. Эту функцию последовательно реализуют две разные биологические реакции: а) биологическая реакция экзотрофии (внешнего питания); продолжается она 4–6 часов после приема пищи (постприандиальный период) и б) биологическая реакция экзотрофии (внутреннего питания); продолжительность ее является существенно большей. Усиление секреции инсулина происходит физиологично только в биологической реакции экзотрофии, после еды в течение всего постприандиального периода гиперлипопротеинемии. Биологическая реакция эндотрофии продолжается все время, пока нет приема пищи: во время сна по ночам, при биологической реакции гибернации (зимняя спячка) и длительное время при голодании. Остальное время β -клетки, в основном, накапливают инсулин, поддерживая содержание гормона в крови на физиологичном уровне.

На ступенях филогенеза биологическая реакция эндотрофии сформировалась на миллионы лет ранее биологической реакции экзотрофии в том виде, в котором

она в настоящее время функционирует у травоядных (*Herbivores*) позвоночных, в том числе и у вида Человек разумный. Напомним, что все предки вида *Homo sapiens*, пока они жили в течение миллионов лет в водах океана, были плотоядными (*Carnivores*), точнее рыбоядными. И в превращении на суше плотоядных животных в травоядные основная биологическая роль принадлежит более позднему на ступенях филогенеза гуморальному медиатору, гормону инсулину.

Синдром ИР – афизиологичное состояние *in vivo*, которое инициирует высокое содержание в плазме крови жирных кислот (ЖК) в форме полярных, незатерифицированных ЖК (НЭЖК). В плазме крови их связывает и переносит к клеткам высокоспецифичный, липидпереносящий белок альбумин. Если же содержание НЭЖК превышает возможности альбумина специфично (неспецифично) их связывать и переносить, полярные НЭЖК спонтанно, физико-химически, формируют гомогенные мицеллярные, свободно циркулирующие структуры; действие их на клетки эндотелия всегда является афизиологичным. И пока в плазме крови повышено содержание НЭЖК, столь же длительно будет сохранен и синдром ИР. Диагностика синдрома ИР остается не столь простой, поскольку не согласован единый, общепринятый тест синдрома ИР. Диагностика синдрома ИР основана на определении субстратов нарушенного метаболизма, глюкозы.

Стандартным методом диагностики синдрома ИР – это гиперинсулинемический, эугликемический *clamp test* (тест «зажатой скобы»). Сложный в исполнении тест эугликемической скобы в клинике постепенно заменили более простым методом HOMA-IR тест, *Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*; HOMA-IR; *insulin resistance*. Несмотря на то, что при жизни в океане все предки человека были плотоядными (рыбоядными), физиологичные возможности потреблять мясную пищу у вида *Homo sapiens*, отработанные на поздних ступенях филогенеза, являются ограниченным. И представление о виде Человек разумный, как всеядным является не более чем недоразумением; подобных индивидуумов природа не сотворила. Всеядным в филогенезе мог бы быть вид позвоночного, который отрывал бы от туши

куски сырого мяса, глотал их целиком, не пережевывая, переваривал бы за несколько часов, а после этого длительно поедая сено, пережевывая и переваривая растительную пищу в течение многих часов. Переваривание в кишечнике вареного мяса у травоядного вида *Homo sapiens* биохимически происходит существенно «труднее» и более медленно, чем сырого мяса у хищников. К тому же ни глиняный горшок, ни сковорода, тем более микроволновая печь, к общей биологии прямого отношения не имеют.

По анатомии жевательного аппарата, особенностям строения скелета, по длине тонкого кишечника, биохимическим реакциям пищеварения, по органолептическим параметрам кала, по наличию потовых желез вид *Homo sapiens* является травоядным, но с реальным пломядным (рыбоядным) прошлым. От прошлого *Homo sapiens* досталось вскармливание новорожденных молоком матери. В женском молоке, как и у всех млекопитающих, доминирует пальмитиновая НЭЖК в форме пальмитиновых позиционных форм ТГ [3], именуемых конечными липидами.

Если в плазме крови пациента тест холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП) превысил верхнюю границу физиологического интервала, это определяет (указывает) начало избыточного потребления пациентом плотоядной (мясной) пищи. Повышение теста ХС-ЛПНП указывает на нарушение поглощения всеми клетками экзогенных полиеновых жирных кислот (ПНЖК), которые ЛПНП переносят в неполярной форме ПНЖК этерифицированных со спиртом ХС. Чем выше в плазме крови ХС-ЛПНП, тем большее количество ПНЖК не могут поглотить клетки путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза, чем выше в клетках дефицит ПНЖК – основа патогенеза атеросклероза. В интервале времени на фоне повышенного уровня ТГ, увеличение ХС-ЛПНП указывает на начало афизиологического потребления пациентом мясной пищи, которое превышает физиологические возможности особи. И если содержание в плазме крови ТГ (точнее спирта глицерина) находится в интервале 0,5–1,0 ммоль/л, пациент физиологично обоснованно избегает поедания мясной пищи. Если же содержание ТГ в плазме крови в пределах 1,0–1,5 ммоль/л, потребление мясной пищи является еще физиологичным [4]. Биологически всегда оптимально заменить поедание мяса на более физиологичное поедание рыбы и морепродуктов. Вегетарианство, выраженное ограничение животных белков, в том числе и рыбы, следует оценивать как не физиологичное и не желательное. У плотоядных видов, у хищников в естественных условиях переваривание мясной пищи продолжается всего несколько часов; кал хищников имеет черный цвет и острый, раздражающий запах. Цвет кала человека при физиологичном травоядно-рыбном питании можно сравнить с цветом хурмы: от оранжевого до оранжево-сероватого с коричневым оттенком.

Длительное наличие синдрома ИР, гипергликемия и высокий уровень НЭЖК в плазме крови приводит к афизиологичному, компенсаторному увеличению синтеза инсулина. Эта «порочная последовательность» высокий уровень НЭЖК → гипергликемия → гиперинсулинемия продолжается до тех пор, пока β -клетки поджелудочной железы не смогут удовлетворить афизиологичные потребности *in vivo* в инсулине. При несоответствии между афизиологичной, не реализуемой функцией инсулина и усилением синтеза гормона β -клетками

островков, наступает истощение клеток с развитием дефицита инсулина. При этом функциональный синдром ИР постепенно превращается в зависимый от патологии структуры β -клеток, сахарный диабет первого типа с гендерными особенностями [5].

Перенос ЖК к клеткам в форме ТГ и НЭЖК в биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии. В цитоплазме всех клеток содержание НЭЖК всегда соответствует следовым количествам. Градиент концентрации их на границе межклеточная среда: цитоплазма клеток всегда высока; он во много раз выше, чем для глюкозы. Возможность определять содержание глюкозы в плазме и в цельной крови указывает, что концентрация глюкозы в цитоплазме эритроцитов близка к концентрации ее в плазме крови. В гидрофобных доменах плазматической мембраны (рафтах, плотках) локализована CD36-транслоказа ЖК; она постоянно готова осуществить быстрый транспорт НЭЖК через мембрану [6].

Вместе с тем, CD-транслоказа ЖК – транспортер пассивный; регулирует активность его, градиент НЭЖК по обе стороны плазматической мембраны. Поглощение клетками ЖК – процесс субстратзависимый: основными гуморальными медиаторами, инициаторами изменения содержания НЭЖК в плазме крови являются: а) ранний на ступенях филогенеза адреналин и поздний в филогенезе инсулин. Поглощение клетками ЖК в форме НЭЖК усиливает: а) гуморальный медиатор адреналин, медиатор каскада регуляции с уровня нейросекреторных ядер гипоталамуса и базофилов эпителиальных клеток аденогипофиза [7] и б) эфферентная симпатическая импульсация с ядер продолговатого мозга.

Из гуморальных медиаторов *in vivo* только поздний в филогенезе инсулин ингибирует липолиз и блокирует освобождение ЖК в форме НЭЖК из инсулинзависимых подкожных адипоцитов (ИПА). Согласно филогенетической теории общей патологии, поздний в филогенезе гуморальный медиатор логично надстраивается над более ранним, логично с ним взаимодействует, но повлиять на действие более раннего в филогенезе медиатора (гормона) более поздний регулятор не может. Поэтому инсулин при реализации биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания) ингибирует липолиз, освобождение ЖК в форме НЭЖК только из поздних на ступенях филогенеза, инсулинзависимых ИПА, но не из ранних в филогенезе висцеральных жировых клеток (ВЖК) сальника. Блокировать липолиз в ВЖК сальника и освобождение в кровотоке НЭЖК способна только никотиновая кислота [8].

Инсулин активирует поглощение глюкозы зависимыми от инсулина клетками; при этом действие инсулина физиологично реализовано в 2 этапа. Действие позднего в филогенезе инсулина осуществлено, главным образом, в биологической реакции экзотрофии, в то время, когда β -клетки усиливают его секрецию. В биологической реакции экзотрофии инсулин блокирует липолиз только в инсулинзависимых ИПА и физиологично понижает содержание НЭЖК в плазме крови и межклеточной среде. Инсулин, блокируя поглощение всеми клетками эндогенно депонированных ЖК, одновременно увеличивает поглощение клетками глюкозы [9]. Поскольку в биологической реакции экзотрофии всегда формируется алиментарная, экзогенная гипергликемия, пассивное поглощение клетками глюкозы возрастает, формируя нормогликемию в крови.

Одновременно инсулин связывается с рецепторами на плазматической мембране инсулинзависимых клеток. После передачи сигнала гормона от рецепторов к функциональным органеллам в цитоплазме, клетки выставляют на мембрану дополнительное число депонированных инсулинзависимых глюкозных транспортеров - GLUT-4. Инсулин активирует поглощение всеми зависимыми клетками экзогенной глюкозы в первую очередь с целью: использовать ее как субстрат для эндогенного синтеза олеиновой МЖК. Это происходит в последовательности биохимических превращений: глюкоза → лактат → пируват → (пируватдегидрогеназный комплекс) ацетил-КоА → C16:0 пальмитиновая НЖК → (пальмитоил-КоА-элонгаза) C18:0 стеариновая НЖК → (стеарил-КоА-десатураза) ω-9 C18:1 цис- олеиновая мононенасыщенная ЖК (МЖК) [10].

Основанием для экспрессии инсулином превращения C16:0 пальмитиновой НЖК в C18:1 олеиновую МЖК явились особенности физико-химических параметров, которые присущи последней. В проведенных нами экспериментах, озон окисляет олеиновую МЖК с константой скорости реакции в пять раз более высокой, чем пальмитиновую НЖК [11, 12]. К тому же внутренняя мембрана митохондрий практически непроницаема для пальмитиновой, выражено тугоплавкой НЖК. Столь же медленно ферментные системы матрикса аэробно окисляют пальмитиновую НЖК и в матриксе митохондрий, в физико-химических реакциях «дыхательной цепи» [13]. Регуляторное действие инсулина сформировалось при становлении биологической функции локомоции – движения за счет сочетанного, реципрокного сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов. Инсулин обеспечивает субстратами для наработки энергии (ЖК в форме НЭЖК) все клетки, которые задействованы в реализации биологической функции локомоции.

Функциональные взаимоотношения инсулин ↔ НЭЖК ↔ альбумин в переносе к клеткам жирных кислот. Напомним, что поперечнополосатые, скелетные миоциты и кардиомиоциты, реализуя длительную, эффективную биологическую функцию локомоции, сами ЖК в форме ТГ в «каплях липидов» в цитоплазме не запасают. Биологическая функция локомоции – движение особей за счет реципрокного сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов. Для формирования депо субстратов (ЖК в форме ТГ), обеспечения миоцитов субстратами для наработки энергии, инсулин экспрессировал формирование пула ИПА; в числе клеток пул ИПА не ограничен [14]. И если в реализации биологической функции экзотрофии все ИПА активно поглощают ЖК в форме неполярных ТГ, то в реализации биологической функции локомоции все ИПА освобождают в межклеточную среду только НЭЖК. В отличие от ИПА, число ВЖК в сальнике и забрюшинной клетчатке является ограниченным; ВЖК после возраста 11-13 лет уже не пролиферируют [15]. Поэтому при перегрузке ЖК в форме одной большой капли ТГ, ВЖК формируют состояние стресса эндоплазматического ретикулула. Это является основой патогенеза такой метаболической пандемии как метаболический синдром.

Согласно биогеохимической теории В.И. Вернадского и филогенетической теории общей патологии, простейшие археи, анаэробные, гетеротрофы миллионы лет жили в глубинах океана, используя для наработки энергии уксусную кислоту, ацетат, активированный ацетил-КоА, в первую очередь, минерального происхо-

ждения. Жили археи в полной темноте и без доступа O₂. Естественно, что на протяжении миллионов лет археи глюкозу не синтезировали. Синтез глюкозы начался через многие миллионы лет, когда богатый органическими веществами «первичный бульон» достиг прогреваемых солнечными лучами поверхностных слоев океана. В новых условиях иные простейшие автотрофы, аэробные бактерии сформировали физико-химические реакции фотосинтеза и из CO₂ и H₂O начали, используя энергию солнца, синтезировать глюкозу, одновременно освобождая атомарный кислород. С самых ранних ступеней филогенеза, этиологические факторы способствуют тому, что все клетки из межклеточной среды всегда предпочитают поглощать НЭЖК, а не глюкозу. И только когда содержание НЭЖК понизится, клетки начинают пассивно, по градиенту концентрации поглощать глюкозу. В этом же этиологическом «ключе» гормональное действие оказывает и инсулин; прежде чем стимулировать поглощение клетками глюкозы, инсулин понижает в плазме крови содержание НЭЖК, блокируя освобождение их только из зависимых от инсулина ИПА.

В физиологических условиях концентрация НЭЖК в плазме крови (натошак) составляет 0,5–0,8 ммоль/л. В то же время, в биологической функции адаптации, в биологических реакциях стресса и компенсации, содержание НЭЖК возрастает до 1,5 ммоль/л, возможно и выше [16]. Трудности определения концентрации НЭЖК в плазме крови состоят в том, что параллельно повышению концентрации НЭЖК, содержание альбумина практически не увеличивается [17]. Определено это тем, что на ранних ступенях филогенеза альбумин задействован в реализации еще незамкнутой системы кровообращения; альбумин формирует базальное онкотическое давление во внутрисосудистом пуле межклеточной среды [18]. За артериолами мышечного типа, за обменными капиллярами в венах онкотическое давление призвано осуществить возврат межклеточной среды из вне- во внутрисосудистый пул; происходит это в дистальном отделе артериального русла.

Гидродинамическое давление в дистальном отделе артериального русла, в артериолах мышечного типа, в обменных капиллярах инициирует переход (биологическая реакция трансцитоза) межклеточной среды из внутрисосудистого русла во внесосудистый пул. Онкотическое же давление альбумина в венах инициирует переход межклеточной среды в обратном направлении, из вне- во внутрисосудистый пул, в вены. И если, при выраженном повышении в плазме крови содержания НЭЖК, адекватного повышения альбумина не происходит, в плазме крови возрастает содержание свободных, не связанных с альбумином НЭЖК. Они, будучи полярными, формируют гомогенные мицеллы, присутствие которых в плазме крови определить не столь легко. Поэтому трудно сказать что-либо определенное относительно общего содержания полярных НЭЖК в плазме крови в ассоциации с альбумином и в составе свободных НЭЖК во фракции гомогенных мицелл.

Гомогенные мицеллярные структуры в гидрофильной среде кровотока ассоциируются с мембраной эндотелия и в нее встраиваются. Это действие формирует длительно существующие в плазматической мембране гидрофильные, нерегулируемые клетками поры. Через них в плоскую клетку эндотелия, по градиенту концентрации, входит избыточное количество ионов Na⁺. С каждым ионом Na в цитоплазму входит 7 молекул H₂O

в форме гидратной оболочки; клетки эндотелия из плоских, становятся более высокими. Уменьшение при этом просвета артериол мышечного типа в дистальном отделе артериального русла: а) увеличивает периферическое сопротивление кровотоку и б) нарушает реализацию биологической реакции метаболизм $\leftrightarrow$ микроциркуляция и в) повышает гидродинамическое давление в дистальной части артериального русла. Мы полагаем, что эти физико-химические нарушения являются вариантом формирования такой метаболической пандемии как метаболическая, эссенциальная артериальная гипертония.

Инсулинзависимый перенос ЖК у травоядных позвоночных в биологической реакции экзотрофии. На поздних ступенях филогенеза при становлении биологической функции локомоции произошло формирование регуляторной системы инсулина [19]. Миллионы лет *in vivo* до синтеза гуморального медиатора, гормона инсулина, активность его, отчасти, исполнял инсулиноподобный фактор роста; способностями инсулина в регуляции метаболизма субстратов он не обладал. Биологическое предназначение инсулина в биологической реакции локомоции, мы полагаем, – обеспечение субстратами для наработки энергии (макроэргический АТФ) всех клеток *in vivo*, которые задействованы в реализации этой функции. Биологическая функция локомоции – движение за счет сочетанного, реципрокного сокращения поперечнополосатой, скелетной мускулатуры; только она способна обеспечить высокие кинетические параметры организма. Биологическая функция локомоции во многом изменила параметры и иных биологических функций *in vivo* [20].

Осмысливая направленность эволюционного процесса на ступенях филогенеза и роль биологических функций и биологических реакций, отдельных субстратов, мы приблизились к пониманию того, что направленность эволюции физико-химических и биохимических процессов *in vivo* предопределена специфическими параметрами отдельных биологических субстратов, в частности, ЖК. Мы при титровании озоном индивидуальных ЖК на автоматическом анализаторе двойных связей показали, что озон *in vitro* окисляет ω -3 C18:1 цис- олеиновую МЖК с константой скорости реакции, которая в 5 раз выше параметров окисления озоном C16:0 пальмитиновой НЖК. Одновременно внутренняя мембрана митохондрий *in vivo* свободно пропускает в матрикс олеиновую МЖК и она практически не проницаема для пальмитиновой НЖК [21]. В этих условиях не может быть, чтобы на ступенях филогенеза в специализированных клетках не было осуществлено превращение эндогенно синтезированной из глюкозы пальмитиновой НЖК в столь энергетически ёмкую олеиновую МЖК.

Превращение в гепатоцитах пальмитиновой НЖК в олеиновую НЖК регуляторно осуществил поздний в филогенезе инсулин при становлении биологической функции локомоции. Инсулин – гуморальный медиатор, гормон, который на поздних ступенях филогенеза, при жизни позвоночных млекопитающих на суше превратил плотоядных (рыбоядных) виды позвоночных предков *Homo sapiens* в виды травоядные. Произошло это путем экспрессии инсулином двух новых, сопряженных ферментов (пальмитоил-КоА-элонгаза и стеарил-КоА-десатураза) и превращения ЖК в гепатоцитах по пути: C16:0 пальмитиновая НЖК $\rightarrow$ C18:0 стеариновая НЖК $\rightarrow$ ω -3 C18:1 цис- олеиновая МЖК. Инсулин, в

первую очередь, регулирует метаболизм ЖК и только во вторую – метаболизм глюкозы; глюкоза «интересует» инсулин как основной субстрат для синтеза травоядными позвоночными олеиновой МЖК.

На поздних ступенях филогенеза инсулин активировал превращение всей эндогенной, синтезированной из глюкозы, пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК во всех инсулинзависимых клетках. Далее инсулин активировал олеиновые МЖК в олеиновые формы ТГ [22]; ими являются пальмитоил-олеил-пальмитат глицерол (ПОП), пальмитоил-олеил-олеат (ПОО), олеил-олеил-пальмитат (ООП) и олеил-олеил-олеат (ООО); вместе это ПОП-ПОО-ООП-ООО. Из этого следует, что физиологическое количество пальмитиновой НЖК мясной пищи гепатоциты физиологично этерифицируют в олеиновые ТГ. Если экзогенной пальмитиновой НЖК с пищей поступает много, гепатоциты этерифицируют ее, как ранее на ступенях филогенеза, не в олеиновые, а в иные по физико-химическим параметрам пальмитиновые ТГ. Пальмитиновыми формами ТГ являются: олеил-пальмитоил-олеат глицерол (ОПО); олеил-пальмитоил-пальмитат (ОПП); пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО); пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП); вместе это ОПО-ОПП-ППО-ППП. Определено это тем, что ни одна внеклеточная липаза *in vivo* не может гидролизовать эфирную связь со вторичной спиртовой группой в молекуле спирта глицерина в позиции *sn*-2.

Травоядный вид *Homo sapiens* секретирует в кровоток, главным образом, олеиновые ТГ в составе одноименных ЛПОНП. Фермент, для которого олеиновые ТГ являются оптимальным субстратом, это постгепариновая липопротеинлипаза (ЛПЛ) и кофермент апоС-II [23]. В силу сродства субстрата (олеиновых ТГ) и действия постгепариновой ЛПЛ, олеиновые ЛПОНП быстро формируют апоЕ/В-100 лиганд. Далее все инсулинзависимые клетки поглощают олеиновые ЛПОНП путем апоЕ/В-100 эндоцитоза; образования в кровотоке олеиновых ЛПНП просто не происходит.

На ступенях филогенеза последовательно произошло формирование трех вариантов переноса ЖК в форме ТГ в составе ЛП:

а) у плотоядных (рыбоядных) позвоночных в океане (1);

б) у травоядных позвоночных на суше до становления функции инсулина (2) и

в) у травоядных видов на суше при действии инсулина (3). Схематично превращение ЛП и ферменты внеклеточного липолиза соответствует представленной схеме:

1. ХМ $\rightarrow$ ЛПОНП $\rightarrow$ печеночная триглицеролгидролаза (ПТГ) + апоС-III $\rightarrow$ ЛПНП $\rightarrow$ апоВ-100 эндоцитоз

2. ЛПОНП $\rightarrow$ ПТГ + апоС-III $\rightarrow$ ЛПНП $\rightarrow$ апоВ-100 эндоцитоз

3. ЛПОНП $\rightarrow$ постгепариновая липопротеинлипаза (ЛПЛ) + апоС-II $\rightarrow$ апоЕ/В-100 эндоцитоз.

На ступенях филогенеза обеспечение клеток позвоночных *in vivo* субстратами для наработки энергии при действии инсулина проходило в направлении: 1 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 3. Это путь – от оптимального к более совершенному при соблюдении единой технологии формирования в филогенезе функциональных систем. При формировании же гиперлипотеинемии (ГЛП) и синдрома ИР у пациентов «мясоедов» в онтогенезе, ухудшение обеспечения клеток субстратами для наработки энергии проходит в обратном направлении, по пути 3 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 1. Это в полной

мере соответствует постулату общей биологии, который многими годами ранее сформулировал Э. Геккель: каждая особь в онтогенезе своем повторяет основные этапы филогенеза. Основной причиной формирования ГЛП при синдроме ИР является злоупотребление травоядными пациентами плотоядной, мясной пищей, нарушение биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания) [24, 25].

Диагностическое значение повышения в плазме крови содержания триглицеридов и ХС-ЛПНП. Травоядный вид *Homo sapiens* при жизни на суше сформировал самый короткий, эффективный вариант переноса к клеткам ЖК в форме олеиновых ТГ в составе только олеиновых ЛПОНП. Исходя из плотоядного прошлого позвоночных при жизни в океане, олеиновые позиционные формы ТГ и олеиновые ЛПОНП переносят в межклеточной среде и физиологичное количество пальмитиновой НЖК; ее синтезирует каждая из клеток и этерифицирует в олеиновые ТГ [26]. В позиционных формах олеиновых ТГ физиологично, одновременно этерифицирована и пальмитиновая НЖК: ООО-ООП-ООО-ПОП, отношение олеат/пальмитат составляет $\approx 8:3$. Можно полагать, что физиологичным является содержание в пище пальмитиновой НЖК, которое не превышает 30% от количества олеиновой МЖК. И если в плазме крови пациента повышено содержание только ТГ, это соответствует концентрации в плазме крови олеиновых и пальмитиновых ТГ в составе олеиновых ЛПОНП [27].

При нарушении биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии (внешнего питания), у пациентов «мясоедов» в гепатоцитах начинает возрастать содержание экзогенной пальмитиновой НЖК. Напомним, что инсулин филогенетически активирует превращение в олеиновую МЖК всего количества экзогенной пальмитиновой НЖК мясной пищи. В этих условиях гепатоциты этерифицируют пальмитиновую НЖК в состав пальмитиновых форм ТГ как ОПО-ОПП-ППО-ППП. И если оптимальный субстрат постгепариновой ЛПЛ + апоС-II это - олеиновые ТГ [28], все пальмитиновые ЛПОНП при нарушении ферментативного гидролиза ТГ не формируют домен-лиганд. По этой причине они в крови превращаются в пальмитиновые ЛПНП, повышая при этом ХС-ЛПНП [29]. Накопление в крови пациентов «мясоедов» пальмитиновых ЛПНП - основная причина повышения в крови ХС-ЛПНП; за этим следует формирование ГЛП типа II б.

Если же афизиологично высокое потребление пальмитиновой НЖК с мясной пищей будет длительным, активация биологической функции адаптации приводит к экспрессии субстратом синтеза более ранней в филогенезе, оптимальной для пальмитиновых ТГ - печеночной (ТГГ) + апоС-III. Если в плазме крови пациента повышено содержание апоС-III, это, мы полагаем, рационально оценивать как тест выраженного, продолжительного нарушения биологической функции питания, биологической реакции экзотрофии. Если же поступление пальмитиновой НЖК у пациента «мясоеда» станет столь высоким, что энтероциты тонкого кишечника станут длительно включать ее в состав хиломикронов и переносить к печени, в плазме крови возрастет содержание апоВ-48 [30]. Если в плазме крови постоянно повышено содержание апоС-III и апоВ-48, пациенты, при отсутствии врожденных нарушений метаболизма, явно злоупотребляют мясной пищей [31]. И тому, что

пациенты рассказывают о своем питании, доверия может не быть. Последним «макси-тестом» верификации пациента - «мясоеда» является формирование ГЛП типа V. Мы полагаем, что клиницисту нет необходимости выслушивать фантазии пациента «мясоеда» о его богочистивом питании. Достаточно в динамике объективно проследить повышение в плазме крови последовательно: ТГ $\rightarrow$ ХС-ЛПНП $\rightarrow$ апоС-III $\rightarrow$ апоВ-48 $\rightarrow$ ГЛП типа II б и ГЛП типа V при электрофорезе ЛП [32].

Патогенез афизиологичного синдрома резистентности к инсулину. Согласно филогенетической теории общей патологии в биологической функции трофологии последовательно реализованы две биологические, разные реакции: а) биологическая реакция экзотрофии и биологическая реакция эндотрофии. При реализации биологической реакции экзотрофии после еды, в постпрандиальном периоде, все клетки *in vivo* потребляют для наработки энергии только экзогенные субстраты, которые поступают с пищей. Инсулин при этом блокирует освобождение эндогенных ЖК из ИПА. В то же время, поздний на ступенях филогенеза инсулин не может блокировать липолиз и освобождение НЭЖК из ранних в филогенезе ВЖК сальника.

Синдром ИР - нарушение биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии. Патологической основой синдрома ИР является низкий уровень субстратов (ЖК и глюкозы), которые клетки могут использовать для наработки энергии (макроэргического АТФ) в биологической реакции экзотрофии. Дефицит субстратов энергии в биологической реакции экзотрофии формируют два фактора. Первый: избыточное содержание плотоядной (мясной) пищи, приводит к высокому содержанию в гепатоцитах пальмитиновой НЖК, одноименных ТГ и секреции пальмитиновых ЛПОНП. При этом физиологичная постгепариновая ЛПЛ + кофактор апоС-II гидролизуют пальмитиновые ТГ в ЛПОНП медленно, освобождая мало пальмитиновых НЭЖК; для наработки клетками оптимального количества энергии этих НЭЖК явно недостаточно. К тому же митохондрии всех клеток медленно поглощают и окисляют пальмитиновую НЖК, формируя при этом малоэффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК и низкий уровень наработки макроэргического АТФ [33].

Второй фактор: при низком содержании в пище углеводов (глюкозы) - в биологической реакции экзотрофии нет достаточного количества экзогенного субстрата, из которого гепатоциты могли бы быстро синтезировать олеиновую МЖК [34]. Этиологическим фактором синдрома ИР является во много раз меньшее поглощение клетками как экзогенных ЖК, так и экзогенной глюкозы в реализации биологической реакции экзотрофии. Дефицит субстратов для наработки энергии в биологической реакции экзотрофии физиологично активирует функции адаптации, реакцию компенсации.

При усилении секреции гуморального медиатора, гормона адреналина, восполнение недостающих субстратов - НЭЖК происходит за счет активации иной - биологической реакции эндотрофии, усиления липолиза олеиновых ТГ в составе ВЖК сальника. Блокировать же липолиз в более ранние, сформированные на ступенях филогенеза ВЖК, более поздний в филогенезе инсулин, не может. По сути, синдром ИР формирует: а) афизиологичная реализация биологической функции трофологии и б) физиологичная реакция биологической

функции адаптации, биологической реакции компенсации. Компенсация недостатка субстратов для наработки энергии во время биологической реакции экзотрофии происходит афизиологично за счет иной биологической реакции – за счет реакции эндотрофии. Как это не покажется странным, но дефицит субстратов для наработки энергии (НЭЖК и глюкозы) в биологической реакции экзотрофии, после еды, *in vivo* приходится компенсировать за счет биологической реакции эндотрофии. Это и есть основа патогенеза биологического синдрома ИР.

Результатом биологической реакции компенсации становится неконтролируемое увеличение в плазме крови содержания НЭЖК; они-то конкурентно, используя внутриклеточные механизмы обратной связи – индукции субстратом, метаболически, конкурентно замедляют (блокируют) поглощение клетками глюкозы [35]. Независимо от того, по какой причине и сколь продолжительно происходит повышение в плазме крови содержания НЭЖК, они всегда замедляют поглощение клетками глюкозы или его останавливают. И сколь долго в плазме крови и межклеточной среде будет повышено содержание НЭЖК, столь долго клетки не начнут физиологично поглощать глюкозу и будет продолжен синдром ИР, гипергликемия и гиперинулинемия.

Формирование синдрома ИР является феноменом вообще-то физиологичной компенсации в условиях, когда в биологической реакции экзотрофии (после еды) формируется функциональный дефицит субстратов (НЭЖК и глюкозы) для наработки клетками энергии. Причиной, при которой *in vivo* происходит повышение в межклеточной среде (плазме крови) содержания НЭЖК наиболее часто являются:

а) переизбыток травоядным в филогенезе человеком плотоядной (мясной) пищи, сливочного масла (на самом деле – животного, молочного пальмитинового жира) и

б) недостаточное содержание в пище глюкозы при полном понимании, что в филогенезе вид *Homo sapiens* сформировался как травоядный. Синдром ИР формируется при нарушении биологической функции трофологии, питания. Столь же выраженное формирование синдрома ИР происходит и при активации *in vivo* и биологической функции эндозоологии, биологической реакции воспаления.

Биологическое предназначение инсулина – превращение плотоядных (рыбоядных) позвоночных океана в травоядные виды на суше. Основным нарушением метаболизма, которое сопровождает пациентов с сахарным диабетом, является постоянный, потенциальный дефицит энергии для реализации всех биологических функций и биологических реакций. Живые системы не имеют возможности запастись энергией; *in vivo* не происходит депонирование макроэргического АТФ; запасают клетки только субстраты для наработки энергии, ЖК и глюкозу. И если у клеток возникает острая потребность в энергии, в гидролизе макроэргического АТФ, наработать энергию возможно только в этот момент, *ex tempore*. В этих условиях биологической реакции адаптации, биологических реакций метаболического стресса и реакции компенсации, физико-химические параметры запасаемого субстрата являются наиболее важными [36].

Биологическое предназначение инсулина состоит в замене на ступенях филогенеза, при становлении биологической функции локомоции, раннего, пальмитинового метаболизма ЖК на более высокоэффективный вариант олеинового метаболизма. Именно для повышения

кинетических параметров организма [20], в филогенезе инсулин экспрессировал синтез двух сопряженных ферментов синтеза олеиновой МЖК, которые приведены выше. Два фермента обеспечили превращение *in vivo* всех углеводов пищи, всей освобожденной из полимеров глюкозы, в олеиновую МЖК. Именно ее митохондрии всех клеток окисляют с наиболее высокой константой скорости реакции, наиболее эффективно наработывая максимальные количества АТФ [12].

И если диагноз сахарного диабета является структурно обусловленным и имеет «оттенок фатальности», синдром ИР является нарушением только функциональным и его можно нормализовать при условии твердого решения пациента укрепить здоровье, поступиться привычными слабостями – вкусно и много поесть. Без активного участия самого пациента, все попытки нормализации синдрома ИР окажутся безуспешными. Нормализовать такие метаболические пандемии как синдром ИР, метаболический синдром и ожирение надо начинать «с головы», с воздействия на когнитивную биологическую функцию. И если при синдроме ИР дефицит субстратов для наработки клетками энергии формируется только во время биологической реакции экзотрофии, то при диабете потенциальный дефицит в организме энергии является постоянным ощущением пациента, всех его реакций метаболизма. В условиях синдрома ИР и особенно сахарного диабета все клетки явно не получают, лишены возможности использовать оптимальное количество субстратов для наработки энергии, образования макроэргического АТФ. При этом из рамок обсуждения мы исключили все наследственные формы заболеваний, не профилактику, а лечение которых правильно рассматривать отдельно [37]. Не включили мы в обсуждение и аспекты метаболизма ЖК, которые пока не являются в полной мере ясными. Это метаболизм среднепечечных ЖК и формирование из них кетоновых тел, как субстрат для наработки энергии нейронами и астроцитами головного мозга [38].

Биологическая (антропогенная) роль инсулина состоит в превращении плотоядных (рыбоядных) далеких предков вида *Homo sapiens* из океана с пальмитиновым вариантом метаболизма ЖК, в млекопитающих на суше с более совершенным олеиновым вариантом метаболизма ЖК, наработки клетками энергии. Происходит это при избирательном окислении в митохондриях не пальмитиновой НЖК, а только олеиновой МЖК. У большинства пациентов синдром ИР является функциональным нарушением и может (должен быть) нормализован. Однако для этого необходимо: а) большое желание пациента реализовать *in vivo* когнитивную биологическую функцию, интеллект и б) четкое понимание, что на ступенях филогенеза, при жизни на суше вид *Homo sapiens* является травоядным. «Мясоедом» человек не был и биологически быть им не может.

И если с позиций летальности в популяциях всех развитых стран мира доминирует патология сердечно-сосудистой системы, в отношении же частоты в популяции, несомненно, лидирует патология биологической функции трофологии, питания в форме афизиологичного влияния питания как фактора внешней среды. Да и патология сердечно-сосудистой системы по большей части является тоже патологией биологической функции питания, биологической реакции экзотрофии проявлением метаболических пандемий, болезней адаптации. Нарушение биологической функции питания, биологи-

ческой реакции экзотрофии является патогенетической основой всех семи, распространенных в популяциях развитых стран метаболических пандемий. Это: 1. атеросклероз и атероматоз; 2. метаболическая, эссенциальная артериальная гипертензия; 3. метаболический синдром; 4. ожирение; 5. синдром резистентности к инсулину; 6. неалкогольная жировая болезнь печени и 7. эндогенная гиперурикемия [39].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-6, 9-10, 13-14, 16-19, 21-36, 38-39 с м. REFERENCES)

- Шестакова М.В., Скляник И.А., Дедов И.И. Возможна ли длительная ремиссия или излечение сахарного диабета 2-го типа В XXI веке? *Терапевтический архив*. 2017; 10: 4-11.
- Титов В.Н., Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А. Жирные кислоты, триглицериды, гипертриглицеридемия, гипергликемия и инсулин. М.: ИНФРА-М; 2016.
- Астафьева Л.И., Кадашев Б.А., Калинин П.Л., Кутин М.А., Ключкова И.С. Клинические синдромы сдавленного и хирургически пересеченного стебля гипопиза. *Проблемы эндокринологии*. 2018; 64(1): 4-13.
- Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.: ИНФРА-М; 2017.
- Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишенин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(11): 517 – 9.
- Сажина Н.Н., Титов В.Н., Евтеева Н.М., Ариповский А.В. Изменение суммарной ненасыщенности жирных кислот липидов плазмы крови больных артериальной гипертензией в глюкозотолерантном тесте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(2): 74 – 80.
- Титов В.Н. Метаболический синдром – переиздание физиологичной пищи. Висцеральные жировые клетки, незатерифицированные и свободные жирные кислоты. М.: ИНФРА-М; 2017.
- Шноль С.Э. Физико-химические факторы биологической эволюции. М.: Наука; 1979.
- Смирнов Г.П., Малышев П.П., Рожкова Т.А., Зубарева М.Ю., Шувалова Ю.А., Ребриков Д.В., Титов В.Н. Влияние распространенного варианта RS 2230806 гена АБСА 1 на уровни липидов плазмы у пациентов с дислипидемией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(7): 410-3.
- Astafyeva LI, Kadashev B.A., Kalinin P.L., Kutin M.A., Klochkova I.S. Clinical syndromes of the compressed and surgically crossed stalk of the pituitary gland. *Problemy endokrinologii*. 2018; 64(1): 4-13. (in Russian)
- Titov V.N. Clinical biochemistry. Lecture course. [*Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lektsiy*]. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
- Nolan C.J., Madiraju M.S., Delghingaro-Augusto V., Peyot M.L., Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*. 2006; 55 Suppl 2: S16-23.
- Athyros V.G., Doumas M., Imprialos K.P., Stavropoulos K., Georgianou E. Diabetes and lipid metabolism. *Hormones (Athens)*. 2018; 17(1): 61-7.
- Lisitsyn D.M., Razumovsky S.D., Tishenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of ozone oxidation of individual fatty acids. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2004; 138(11): 517 – 59. (in Russian)
- Sazhina N.N., Titov V.N., Evtseva N.M., Aripovskiy A.V. Change in total unsaturation of fatty acids of blood plasma lipids in patients with arterial hypertension in a glucose-tolerant test. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(2): 74 – 80. (in Russian)
- Putti R., Migliaccio V., Sica R., Lionetti L. Skeletal muscle mitochondrial bioenergetics and morphology in high fat diet induced obesity and insulin resistance: focus on dietary fat source. *Front. Physiol*. 2016; 6: 426.
- Lee B.C., Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014; 1842(3): 446-62.
- Titov V.N. Metabolic syndrome - overeating physiological food. Visceral fat cells, non-esterified and free fatty acids. [Metabolicheskiy sindrom – pereedanie fiziologichnoy pishchi. Vistseral'nye zhirovye kletki, neeterifitsirovannye i svobodnye zhirnye kisloty]. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
- Eibisch M., Popkova Y. Süß R. Schiller J. Dannenberger D. Evaluation of a commercial enzymatic test kit regarding the quantitative analysis of different free fatty acids. *Anal. Bioanal. Chem*. 2014; 406(28): 7401-5.
- Best C.A., Laposata M. Proios V.G., Szczepiorkowski Z.M. Method to assess fatty acid ethyl ester binding to albumin. *Alcohol*. 2006; 41(3): 240-6.
- Kassar O., Schwarz-Linek U., Blindauer C.A., Stewart A.J. Plasma free fatty acid levels influence Zn(2+) -dependent histidine-rich glycoprotein-heparin interactions via an allosteric switch on serum albumin. *J. Thromb. Haemost*. 2015; 13(1):101-10.
- Zmysłowska A., Wyka K. Szadkowska A., Mianowska B., Pietrzak I., Młynarski W. Free fatty acids level may effect a residual insulin secretion in type 1 diabetes. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab*. 2011; 17(1): 26-9.
- Shnol' S.E. Physico-chemical factors of biological evolution. [Fiziko-khimicheskiye faktory biologicheskoy evolutsii]. Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)
- Hoeks J., de Wilde J., Hulshof M.F., Berg S.A., Schaart G., Dijk KW. High fat diet-induced changes in mouse muscle mitochondrial phospholipids do not impair mitochondrial respiration despite insulin resistance. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27274.
- Al-Sulaiti H., Diboun I., Banu S., Al-Emadi M., Amani P., Harvey T.M. Triglyceride profiling in adipose tissues from obese insulin sensitive, insulin resistant and type 2 diabetes mellitus individuals. *J. Transl. Med*. 2018; 16(1): 175.
- Young S.G., Zechner R. Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes. Dev*. 2013; 27(5): 459-84.
- Martins A.R., Nachbar R.T., Gorjao R., Vinolo M.A., Festuccia W.T., Lambertucci R.H., Cury-Boaventura M.F. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids. Health. Dis*. 2012; 11: 30.
- Samuel V.T., Shulman G.I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J. Clin. Invest*. 2016; 126(1): 12-22.
- Rachek L.I. Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 2014; 121: 267-92.

27. Wan G.X., Xia W.B., Ji L.H., Qin H.L., Zhang Y.G. Triglyceride to high density lipoprotein cholesterol ratio may serve as a useful predictor of major adverse coronary event in female revascularized ST-elevation myocardial infarction. *Clin. Chim. Acta.* 2018; 485: 166-72.
28. Ishiyama N., Sakamaki K., Shimomura Y., Kotani K., Tsuzaki K., Sakane N., Miyashita K. Lipoprotein lipase does not increase significantly in the postprandial plasma. *Clin. Chim. Acta.* 2017; 464: 204-10.
29. Nakajima K., Tokita Y., Tanaka A. Hypothesis: Postprandial remnant lipoproteins are the causal factors that induce the insulin resistance associated with obesity. *Clin. Chim. Acta.* 2018; 485: 126-32.
30. Nakajima K., Nakano T., Tokita Y., Nagamine T., Inazu A., Kobayashi J. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin. Chim. Acta.* 2011; 412(15-16): 1306-18.
31. Subramanian S., Chait A. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821(5): 819-25.
32. Duez H., Lamarche B., Uffelman K.D., Valero R., Cohn J.S., Lewis G.F. Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26(6): 1357-63.
33. Aljuaid M.O., Almitairi A.M., Assiri M.A., Almalki D.M., Alswat K. Diabetes-related distress assessment among type 2 diabetes patients. *J. Diabetes. Res.* 2018; 2018: 7328128.
34. Low S., Khoo K.C.J., Irwan B., Sum C.F., Subramaniam T., Lim S.C., Wong T.K.M. The role of triglyceride glucose index in development of Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 2018; 143: 43-9.
35. Roduet R., Nolan C., Alarcon C., Moore P., Barbeau A., Delghingaro-Augusto V., Przybykowski E. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes.* 2004; 53(4): 1007-19.
36. Fairchild T.J., Klakk H., Heidemann M., Grøntved A., Wedderkopp N. Insulin sensitivity is reduced in children with high body-fat regardless of BMI. *Int. J. Obes. (Lond).* 2018; 42(5): 985-94.
37. Smirnov G.P., Malyshev P.P., Rozhkova T.A., Zubareva M.Yu., Shuvalova Yu.A., Rebrikov D.V., Titov V.N. Effect of a common variant of RS 2230806 of the ABCA 1 gene on plasma lipid levels in patients with dyslipidemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2018; 63(7): 410-3. (in Russian)
38. Mehanna E.T., Barakat B.M., El-Sayed M.H., Tawfik M.K. An optimized dose of raspberry ketones controls hyperlipidemia and insulin resistance in male obese rats: Effect on adipose tissue expression of adipocytokines and Aquaporin 7. *Eur. J. Pharmacol.* 2018; 832: 81-9.
39. Florentino T.V., Sesti F., Succurro E., Pedace E., Andreozzi F., Sciacqua A., Hribal M.L. Higher serum levels of uric acid are associated with a reduced insulin clearance in non-diabetic individuals. *Acta. Diabetol.* 2018; 55(8): 835-42.

Поступила 23.04.19

Принята к печати 29.04.19

© БЕЛЬСКАЯ Л.В., 2019

Бельская Л.В.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СЛЮНЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск, Россия

Применение слюны в клинической лабораторной диагностике является перспективным, а также неинвазивным, простым и недорогим методом для выявления ряда заболеваний. Интеграция комплекса методов, включая исследование генома, эпигенома, транскриптома, протеома, метаболома и микробиома, позволяет обнаружить и количественно определить ряд биомаркеров в слюне. Исследование слюны относится к неинвазивным методам и проводится для оценки возрастного и физиологического статуса, выявления соматических заболеваний, патологии слюнных желёз и тканей полости рта, генетических маркёров, мониторинга лекарственных средств и др. В настоящем обзоре рассмотрены последние данные по применению слюны для диагностики онкологических заболеваний.

Ключевые слова: слюна; клиническая лабораторная диагностика; геном; протеом; метаболом; транскриптом; микробиом.

Для цитирования: Бельская Л.В. Возможности применения слюны для диагностики онкологических заболеваний. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6):333-336

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-333-336>

Bel'skaya L.V.

POSSIBLE APPLICATIONS OF SALIVA FOR THE DIAGNOSIS OF CANCER

Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation

Use of saliva in the clinical laboratory diagnosis is promising, and non-invasive, simple and inexpensive method for the detection of diseases. Integration of complex techniques, including genomic research, epigenome, transcriptome, proteome, metabolome and microbiome, can detect and quantify the number of biomarkers in saliva. Research saliva relates to non-invasive techniques and conducted to evaluate the age and physiological status, detection of somatic diseases, diseases of the salivary glands and oral tissues, genetic markers, drug monitoring, and others. In this review, recent data on the use of saliva to diagnose cancers examined.

Key words: saliva; clinical laboratory diagnostics; genome; proteome; metabolome; transcriptome; microbiome.

For citation: Bel'skaya L.V. Possible applications of saliva for the diagnosis of cancer. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 333-336 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-333-336>

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

Information about author:

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 20.03.2019
Accepted 20.04.2019

В последнее время возросло внимание исследователей к изучению свойств слюны человека как материала с уникальными свойствами и диагностическими возможностями. Исследование слюны относится к неинвазивным методам и проводится для оценки возрастного и физиологического статуса, выявления соматических заболеваний, патологии слюнных желёз и тканей полости рта, генетических маркёров, мониторинга лекарственных средств и др. [1-4].

Слюна содержит множество биологических молекул, в том числе ДНК, матричную РНК (мРНК), микроРНК, белок, метаболиты и микробиоту. Изменение их концентрации в слюне может быть использовано для выявления системных заболеваний и заболеваний полости рта на ранних стадиях, а также для оценки прогноза течения заболеваний и контроля ответа на лечение [5]. В 2008 го-

ду предложен термин «саливаомика», который объединяет знания о различных компонентах в слюне, включая геном, эпигеном, транскриптом, протеом, метаболом и микробиом [6, 7].

Наиболее перспективным направлением является применение слюны для ранней диагностики онкологических заболеваний. Для этих целей могут быть использованы все пять составляющих саливаомики (см. рисунок).

Целью работы являлось обобщение существующего опыта применения слюны для лабораторной диагностики онкологических заболеваний.

Геном и эпигеном. Слюнной геном состоит одновременно из ДНК человека и микроорганизмов полости рта (70 и 30 % соответственно). Качество слюнной ДНК хорошее, что позволяет для 72-96% образцов провести генотипирование, 84% могут быть амплифицированы, 67% могут быть секвенированы [8]. При этом образцы слюны могут сохраняться длительное время без существенной деградации [9]. Генетический и эпигенетический ана-

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук; e-mail: ludab2005@mail.ru



Базовые направления диагностики по слюне.

лиз слюны позволяет обнаружить аномальные профили транскрипции генов, которые отражают патологические генетические процессы [10]. К эпигенетической составляющей генома можно отнести метилирование ДНК – это модификация молекулы ДНК без изменения самой нуклеотидной последовательности. Метилирование ДНК изменяется с возрастом, а также под воздействием факторов окружающей среды [11]. Аномальное метилирование генов (например, гиперметилирование) часто встречается при онкологических заболеваниях [10].

Транскриптом (мРНК и микроРНК). Исследования транскриптома сосредоточены в основном на матричной РНК и микроРНК, которые секретируются из клеток и попадают в ротовую полость из различных источников, в том числе слюнных желез и десневой жидкости [12]. Матричная РНК содержит информацию о первичной структуре (аминокислотной последовательности) белков, синтезируется на основе ДНК в ходе транскрипции, после чего, в свою очередь, используется в ходе трансляции как матрица для синтеза белков. Тем самым мРНК играет важную роль в «проявлении» (экспрессии) генов. МикроРНК – группа малых некодирующих РНК (от 19 до 25 нуклеотидов), которые кодируются генами, но не переводятся в белки. МикроРНК централизованно принимает участие в различных биологических процессах, в том числе дифференцировке и пролиферации клеток. Транскрипция специфических мРНК и микроРНК изменяется при многих заболеваниях. Недавние исследования обнаружили более 3000 видов мРНК в слюне здоровых субъектов [13]. Особо важно, что 180 из них являются общими для здоровых субъектов, они составляют обычное ядро слюнного транскриптома.

Анализ транскриптома слюны человека впервые проведен Вонгом с использованием технологии микрочипов, что позволяет обеспечить высокую пропускную способность, а также простую стабилизацию слюнной РНК для прямого анализа без дальнейшей обработки [14]. Показана применимость слюнных мРНК для обнаружения рака поджелудочной железы, рака полости рта, рака легких, рака молочной железы, рака яичников и других системных заболеваний [15–17]. Многие исследования показывают отклонения в экспрессии микроРНК в опухолевых тканях по сравнению со здо-

ровыми. МикроРНК являются более стабильными, чем мРНК, а степень изменения микроРНК между раковыми и нормальными клетками достаточно велика [18].

Протеом. Слюна является ультрафильтратом плазмы крови и содержит белки, которые синтезируются в слюнных железах или попадают в нее из крови. На сегодняшний день исследователи выявили 2340 белков в протеоме слюны, из которых 20–30% также обнаружены в крови [19], что является обнадеживающим показателем клинической полезности слюны. В отличие от плазмы крови, протеом которой на 99% от общего содержания белка формируется за счет 22 основных белков, тогда как в слюне 20 основных белков составляют лишь 40% от общего содержания белка [20]. Таким образом, обнаруживать биомолекулы с высокой чувствительностью и специфичностью в слюне практически проще, чем в крови. Слюна также может быть использована для обнаружения веществ, поступающих из крови, например, стероидных гормонов [21].

При изучении белкового состава слюны показано, что 1166 белков секретируются большими слюнными железами, из которых 914 из околоушной и 917 из подчелюстной и подъязычной слюнных желез, 57% этих белков являются одинаковыми для всех желез. Секретция малых слюнных желез человека включает 56 белков. В отличие от относительно стабильного состояния в сыворотке крови, белки, содержащиеся в слюне, более восприимчивы к биохимическим процессам и деградации [22]. Однако стабилизация протеома слюны ингибиторами протеазы позволяет увеличить стабильность белков до 2-х недель при хранении при 4°C [23]. В настоящее время основной технологией для идентификации белков является масс-спектрометрия благодаря высокой чувствительности и точности измерения массы пептидов.

Протеом слюны становится приемлемой средой для обнаружения различных заболеваний. В основном это связано с достижениями в области методов для разделения и идентификации белков. Например, выявлено пять биомаркеров плоскоклеточного рака полости рта (M2BP, MRP14, CD59, каталаза и профилин) [24], а также показана применимость CD44 для скрининга плоскоклеточного рака головы и шеи [25].

Метаболом. Метаболом включает группу эндогенных и экзогенных метаболитов, в том числе липиды, аминокислоты, пептиды, нуклеиновые кислоты, органические кислоты, витамины, тиолы и углеводы. Он является ценным инструментом для обнаружения биомаркеров, мониторинга физиологического состояния и выбора тактики лечения [26].

При исследовании дискриминационных метаболитов у пациентов с раком ротовой полости, поджелудочной и молочной железы выявлены более 50 прогнозирующих метаболитов каждого отдельного заболевания [27]. Среди них наиболее значимыми являются аланин и лейцин, что свидетельствует об изменении метаболических путей гликогенных аминокислот и кетоновых тел [28]. Комбинация из трех слюнных метаболитов (фенилаланин, валин и молочная кислота) может отличить пациентов с плоскоклеточным раком полости рта от здоровых людей с высокой чувствительностью и специфичностью (86,5% и 82,4%, соответственно) [29]. Набор из пяти биомаркеров слюны (интерлейкин-8, холин, пипеколиновая кислота, L-фенилаланин и S-карбоксиметил-L-цистеин) продемонстрировали превосходную точность для выявления ранних стадий рака головы и шеи [30].

Микробиом. Ротовая полость представляет собой разнообразную среду обитания бактерий и других микроорганизмов. Ряд данных свидетельствует о том, что дисбиоз может привести к болезням полости рта, таких как пародонтит и кариес [31], а также рак и другие системные заболевания [32, 33]. В настоящее время известно более 10000 видов микроорганизмов полости рта [34]. Использование бактериальных микрочипов и других новых методов может продвинуть исследование слюнного микробиома и определить связь между бактериями и микроорганизмами при отдельных системных заболеваниях, а также заболеваниях полости рта. Так, в слюне у пациентов с плоскоклеточным раком полости рта и здоровых испытуемых обнаружена комбинация из трех микроорганизмов (*Carpocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* и *Streptococcus mitis*), которые могут быть использованы в качестве диагностических биомаркеров с 80 % чувствительностью и 82% специфичностью [35]. Аналогично две бактерии (*Neisseria elongate* и *Streptococcus mitis*) позволяют отличить пациентов с раком поджелудочной железы от здоровых с 96,4% чувствительностью и 82,1 % специфичностью [36].

Применение слюны для ранней диагностики рака. Раннее обнаружение является ключевым фактором, определяющим благоприятный прогноз лечения практически для всех типов рака [37]. Слюна используется для диагностики плоскоклеточного рака полости рта, для этого определяют белки, мРНК и ДНК [38, 39]. Экспрессия микроРНК связана с раком легкого, молочной и предстательной желез. Первым биомаркером, обнаруженным в слюне, был HER2/Neu для рака молочной железы [40]. Для выявления рака яичников мРНК биомаркерами в слюне являются AGPAT1, B2M, BASP2, IER3 и IL1B [16]. Слюнные мРНК (CCNI, EGFR, FGF19, FRS2 и GREB1) могут быть использованы для неинвазивной диагностики рака легких [15]. Показана статистически значимая избыточная экспрессия белковых маркеров HP, AZGP1 и калпротектина у больных раком легкого [41]. Отмечены более высокие уровни белков с молекулярной массой 6556.81 и 7081.17 Да в слюне группы пациентов с раком желудка по сравнению со здоровыми людьми. Белок p53 представляет собой опухолевый супрессор, продуцируемый в ответ на различные типы повреждений ДНК в клетках. Инактивация белка p53 в процессе мутации является одной из ведущих причин антител развития рака. Антитела к p53 могут быть обнаружены в сыворотке крови и слюне больных с диагнозом плоскоклеточный рак полости рта [2, 13]. Опухолевый маркер CA15-3 был обнаружен в слюне женщин с диагнозом рак молочной железы [42]. Он используется для контроля распространения и метастазирования опухоли. CA 125 представляет собой ассоциированный с опухолью антиген, который обнаружен в сыворотке крови и слюне пациентов с раком полости рта, молочной железы и яичников [43]. Концентрации в слюне фактора роста фибробластов (FGF2 и FGFR1) значительно повышены у пациентов с раком слюнной железы, что позволяет рассматривать их как потенциальный биомаркер в ранней диагностике опухолей слюнных желез [44]. Простат-специфический антиген (ПСА) является установленным маркером аденокарциномы предстательной железы. Слюнный уровень ПСА коррелирует с сывороточным уровнем у пациентов с раком предстательной железы [45]. Также было установлено, что уровень кортизола и лактатдегидрогеназы в слюне может быть значительно увеличен в плазме и слюне па-

циентов с плоскоклеточным раком полости рта [46]. Повышенные уровни нитратов и нитритов в слюне были обнаружены у пациентов с раком ротовой полости [47]. Активность аденозиндезаминазы (ADA) значительно повышается при плоскоклеточном раке языка [48]. Описано применение слюны в онкогематологии. Показано, что высокий уровень нейтрофилов в слюне может указывать на успех пересадки костного мозга [49].

Таким образом, существует достаточно большое количество маркеров опухолевого процесса, которые могут быть определены в слюне человека. Природа биомаркеров может быть различна, включая генетические, эпигенетические и транскриптомные маркеры, а также вещества белковой природы, метаболиты опухолевого процесса и микробиологические показатели. Часть описанных маркеров уже получила клиническое подтверждение эффективности для диагностики онкологических заболеваний на ранней стадии, часть требует проведения дальнейших исследований. Однако, даже в случае если применимость для ранней диагностики не будет доказана, возможно их применение для проверки эффективности проводимой терапии, мониторинга течения заболевания, идентификации резидуальных опухолей, а также прогнозирования клинического течения и выбора эффективной терапевтической практики [50].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.2-49 см. REFERENCES)

1. Кочурова Е.В. Диагностические возможности слюны. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 1: 13–6.
50. Кушлинский Н.Е., Любимова Н.В. Опухолевые маркеры. Общая характеристика, клинического значение и рекомендации по использованию. *Поликлиника*. 2016; 8: 62-77.

REFERENCES

1. Kochurova Ye.V. Diagnostic capabilities of saliva. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 1: 13–6. (in Russian)
2. Kaur J., Jacobs R., Huang Y., Salvo N., Politis C. Salivary biomarkers for oral cancer and pre-cancer screening: a review. *Clinical Oral Investigations*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2337-x>
3. Nair S., Tang K.D., Kenny L., Punyadeera C. Salivary exosomes as potential biomarkers in cancer. *Oral Oncology*. 2018; 84: 31–40.
4. Porto-Mascarenhas E.C., Assad D.X., Chardin H., Gozal D., De Luca Canto G., Acevedo A.C., Guerra E.N.S. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017; 110: 62–73.
5. Spielmann N., Wong D.T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*. 2011; 17: 345-54.
6. Zhang Y., Sun J., Lin C., Abemayor E., Wang M.B., Wong D. The Emerging Landscape of Salivary Diagnostics. *OHDM*. 2014; 13 (2): 200-10.
7. Wong D.T. Salivaomics. *Journal of the American Dental Association*. 2012; 143: 19S-24S.
8. Looi M.L., Zakaria H., Osman J., Jamal R. Quantity and quality assessment of DNA extracted from saliva and blood. *Clinical Laboratory*. 2012; 58: 307-12.
9. Bonne N.J., Wong D.T. Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches. *Genome Medicine*. 2012; 4: 82.
10. Carvalho A.L., Henrique R., Jeronimo C., Nayak C.S., Reddy A.N., et al. Detection of promoter hypermethylation in salivary rinses as a biomarker for head and neck squamous cell carcinoma surveillance. *Clinical Cancer Research*. 2011; 17: 4782-9.
11. Bryan A.D., Magnan R.E., Hooper A.E., Harlaar N., Hutchison

- K.E. Physical activity and differential methylation of breast cancer genes assayed from saliva: a preliminary investigation. *Annals of Behavioral Medicine*. 2013; 45: 89-98.
12. Momen-Heravi F., Trachtenberg A.J., Kuo W.P., Cheng Y.S. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J Dent Res*. 2014; 93 (7): 86S-93S.
13. Brinkmann O., Wong D.T. Salivary transcriptome biomarkers in oral squamous cell cancer detection. *Adv Clin Chem*. 2011; 55: 21-34.
14. Lee Y.H., Zhou H., Reiss J.K., Yan X., Zhang L., et al. Direct saliva transcriptome analysis. *Clinical Chemistry*. 2011; 57: 1295-1302.
15. Zhang L., Xiao H., Zhou H., Santiago S., Lee J.M., Garon E.B., Yang J., Brinkmann O., Yan X., Akin D., Chia D., Elashoff D., Park N.H., Wong D.T.W. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012; 69 (19): 3341-50.
16. Lee Y.H., Kim J. H., Zhou H., Kim B.W., Wong D.T. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of ovarian cancer: for serous papillary adenocarcinoma. *Journal of Molecular Medicine*. 2012; 90 (4): 427-34.
17. Li F., Yoshizawa J.M., Kim K.M., Kanjanapangka J., Grogan T.R., Wang X., Elashoff D.E., Ishikawa S., Chia D., Liao W., Akin D., Yan X., Lee M.S., Choi R., Kim S.M., Kang S.Y., Bae J.M., Sohn T.S., Lee J.H., Choi M.G., Min B.H., Lee J.H., Kim J.J., Kim Y., Kim S., Wong D.T.W. Discovery and Validation of Salivary Extracellular RNA Biomarkers for Noninvasive Detection of Gastric Cancer. *Clin Chem*. 2018; 64(10): 1513-21.
18. Matse J.H., Yoshizawa J., Wang X., Elashoff D., Bolscher J.G.M., Veerman E.C.I., Bloemena E., Wong D.T.W. Discovery and Prevalidation of Salivary Extracellular microRNA Biomarkers Panel for the Noninvasive Detection of Benign and Malignant Parotid Gland Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2013; 19(11): 3032-8.
19. Jagtap P., McGowan T., Bandhakavi S., Tu Z.J., Seymour S., Griffin T.J., Rudney J.D. Deep metaproteomic analysis of human salivary supernatant. *Proteomics*. 2012; 12(7): 992-1001.
20. Loo J.A., Yan W., Ramachandran P., et al. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res*. 2010; 89: 1016-23.
21. Goswami Y., Mishra R., Agrawal A.P., Agrawal L.A. Salivary Biomarkers-A Review of Powerful Diagnostic tool. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 2015; 14 (3): 80-7.
22. Schulz B.L., Cooper-White J., Punyadeera C.K. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2013; 33: 246-59.
23. Xiao H., Wong D.T. Method development for proteome stabilization in human saliva. *Analytica Chimica Acta*. 2012; 722: 63-9.
24. Alejandro I. Lorenzo-Pouso, Mario Pérez-Sayáns, Susana B. Bravo, Pia López-Jornet, María García-Vence, Manuela Alonso-Sampedro, Javier Carballo, Abel García-García. Protein-Based Salivary Profiles as Novel Biomarkers for Oral Diseases. *Dis Markers*. 2018; 6141845. doi: 10.1155/2018/6141845
25. Franzmann E.J., Reategui E.P., Pereira L.H., Pedrosa F., Joseph D., Allen G.O., Hamilton K., Reis I., Duncan R., Goodwin W.J., Hu J.J., Lokeshwar V.B. Salivary protein and solCD44 levels as a potential screening tool for early detection of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012; 34 (5): 687-895.
26. Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X. Recent and potential developments of bio fluid analyses in Metabolomics. *Journal of Proteomics*. 2012; 75: 1079-88.
27. Ishikawa S., Sugimoto M., Kitabatake K., Sugano A., Nakamura M., Kaneko M., Ota S., Hiwatari K., Enomoto A., Soga T., Tomita M., Iino M. Identification of salivary metabolomic biomarkers for oral cancer screening. *Scientific Reports*. 2016; 6:31520.
28. Grimaldi M., Palisi A., Rossi G., Stillitano I., Faiella F., Montoro P., Rodriguez M., Palladino R., D'Ursi A.M., Romano R. Saliva of patients affected by salivary gland tumour: An NMR metabolomics analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018; 160: 436-42.
29. Wei J., Xie G., Zhou Z., Shi P., Qiu Y., et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *International Journal of Cancer*. 2011; 129: 2207-17.
30. Guerra E.N.S., Acevedo A.C., Leite A.F., Gozal D., Chardin H., De Luca Canto G. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology*. 2015; 51(9): 805-18.
31. Burne R.A., Zeng L., Ahn S.J., Palmer S.R., Liu Y., et al. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Advances in Dental Research*. 2012; 24: 77-80.
32. Schwabe R.F., Jobin C. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2013; 13: 800-12.
33. Acharya A., Chan Y., Kheur S., Jin L.J., Watt R.M., Mattheos N. Salivary microbiome in non-oral disease: A summary of evidence and commentary. *Archives of Oral Biology*. 2017; 83: 169-73.
34. Yoshizawa J.M., Schafer C.A., Schafer J.J., Farrell J.J., Paster B.J., et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26: 781-791.
35. Hu X., Zhang Q., Hua H., Chen F. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Oncol*. 2016; 56: e6-e8.
36. Farrell J.J., Zhang L., Zhou H., Chia D., Elashoff D., et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*. 2012; 61: 582-8.
37. Malathi N., Mythili S. and Vasanthi H.R. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry*. 2014, Article ID 158786, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/158786>
38. Tang H., Wu Z., Zhang J., Su B. Salivary lncRNA as a potential marker for oral squamous cell carcinoma diagnosis. *Molecular Medicine Reports*. 2013; 7 (3): 761-6.
39. Yoshizawa J. M., Wong D.T.W. Salivary microRNAs and oral cancer detection. *Methods in Molecular Biology*. 2013; 936: 313-24.
40. De Abreu Pereira D., Areias V.R., Franco M.F., Benitez M.C.M., do Nascimento C.M., de Azevedo C.M., Alves G. Measurement of HER2 in Saliva of Women in Risk of Breast Cancer. *Pathol. Oncol. Res*. 2013; 19: 509-13.
41. Xiao H., Zhang L., Zhou H., Lee J.M., Garon E.B., Wong D.T. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using twodimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11(2): 111-21.
42. Agha-Hosseini F., Mirzaei-Dizgah I., Rahimi A. Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009; 14: 521-4.
43. Balan J.J., Rao R.S., Premalatha B.R., Patil S. Analysis of tumor markers CA 125 in saliva of normal and oral squamous cell carcinoma patients: a comparative study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2012; 13 (5): 671-5.
44. Huang Y.Q., Li Y.D., Li G.K., Jin Z., Ma J. The evaluation of basic fibroblast growth factor and fibroblastic growth factor receptor 1 levels in saliva and serum of patients with salivary gland tumor. *DNA and Cell Biology*. 2012; 31 (4): 520-3.
45. Shiiki N., Tokuyama S., Sato C. et al. Association between saliva PSA and serum PSA in conditions with prostate adenocarcinoma. *Biomarkers*. 2011; 16 (6): 498-503.
46. Bernabe D.G., Tamae A.C., Miyahara G.I., Sundfeld M.L., Oliveira S.P., Biasoli E. R. Increased plasma and salivary cortisol levels in patients with oral cancer and their association with clinical stage. *Journal of Clinical Pathology*. 2012; 65 (10): 934-9.
47. Shetty S. R., Chadha R., Babu S., Kumari S., Bhat S., and Achalli S. Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinic pathological study. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2012; 8 (2): 123-5.
48. Rai B., Kaur J., Jacobs R., Anand S.C. Adenosine deaminase in saliva as a diagnostic marker of squamous cell carcinoma of tongue. *Clinical Oral Investigations*. 2011; 15 (3): 347-9.
49. Saxena V., Yadav N.S., Juneja V., Singh A., Tiwari V., Santha B. Saliva: a miraculous biofluid for early detection of disease. *J. Oral Health Comm. Dent*. 2013; 7(1): 64-8.
50. Kushlinskiy N.Ye., Lyubimova N.V. Tumor markers. General characteristics, clinical significance and recommendations for use. *Poliklinika*. 2016; 8: 62-77. (in Russian)

Поступила 23.03.19

Принята к печати 23.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ахмедова Д.И.^{1,2}, Ахмедова Н.Р.^{1,2}, Арипов А.Н.¹, Маткаримова А.А.³

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПОРАЖЕНИЯ МИОКАРДА У ДЕТЕЙ С КАРДИОМИОПАТИЯМИ

¹Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр педиатрии, 100179, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Ташкентский педиатрический медицинский институт, 100140, Ташкент, Республика Узбекистан;

³Республиканский детский многопрофильный медицинский центр, Нукус, Республики Каракалпакстан

В статье представлены результаты исследований 104 больных с кардиомиопатиями, госпитализированных в кардиоревматологические отделения Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра педиатрии в г. Ташкенте и Республиканского детского многопрофильного медицинского центра Республики Каракалпакстан. Анализ результатов исследования показал, что у детей с кардиомиопатиями отмечается повышение уровня тканевых (ЛДГ, КФК) и кардиоспецифического (КФК-МВ) ферментов независимо от региона проживания и формы заболевания, которое свидетельствует о дисфункции миокарда. В связи с чем, данные ферменты можно рассматривать высокоспецифическими биохимическими маркерами поражения миокарда, а возрастание их активности – критериями для диагностики кардиомиопатии у детей. Из биохимических показателей достоверным прогностическим критерием развития и исхода кардиомиопатий является прогрессирующее повышение уровня эндотелина по мере увеличения давности заболевания.

Ключевые слова: дети; кардиомиопатии; тропонин; эндотелин; тканевые ферменты; кардиоспецифические ферменты.

Для цитирования: Ахмедова Д.И., Ахмедова Н.Р., Арипов А.Н., Маткаримова А.А. Биохимические маркеры поражения миокарда у детей с кардиомиопатиями. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 337-341.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-337-341>

Akhmedova D.I.^{1,2}, Akhmedova N.R.^{1,2}, Aripov A.N.¹, Matkarimova A.A.³

BIOCHEMICAL MARKERS OF MYOCARDIUM DAMAGE IN CHILDREN WITH CARDIOMYOPATHY

¹Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Pediatrics, 100179, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

²Tashkent Pediatric Medical Institute, 100140, Tashkent, Republic of Uzbekistan;

³Republican Children's Multidisciplinary Medical Center, Nukus, Republic of Karakalpakstan

The article presents the results of studies of 104 patients with cardiomyopathy hospitalized in the cardiorheumatological departments of the Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center of Pediatrics in Tashkent and the Republican Children's Multidisciplinary Medical Center of the Republic of Karakalpakstan. An analysis of the results of the study showed that in children with cardiomyopathy there is an increase in the level of tissue (LDH, CPK) and cardiospecific (CPK-MB) enzymes, regardless of the region of residence and the form of the disease, which indicate myocardial dysfunction. Therefore, these enzymes can be regarded as highly specific biochemical markers of myocardial damage, and an increase in their activity can be used as criteria for the diagnosis of heart disease. Of the biochemical parameters, a reliable prognostic criterion for the development and outcome of cardiomyopathy is a progressive increase in the level of endothelin with increasing duration of the disease.

Key words: children; cardiomyopathy; troponin; endothelin; tissue enzymes; cardiospecific enzymes.

For citation: Akhmedova D.I., Akhmedova N.R., Aripov A.N., Matkarimova A.A. Biochemical markers of myocardium damage in children with cardiomyopathy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 337-341 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-337-341>

For correspondence: Akhmedova Nilufar Rasulovna, Ph.D., Doctoral Candidate of the Department of Hospital Pediatrics with the basics of unconventional treatment number 2 of the Tashkent Pediatric Medical Institute; e-mail: anilufar74@mail.ru

Acknowledgment. The research was performed within the applied grant ADSS.15.1.3. Development of the diagnosis and prognosis criteria in children with cardiovascular diseases dependent on the health determinants.

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

Received 25.04.2019
Accepted 29.04.2019

Актуальность. Болезни сердечно-сосудистой системы имеют особую значимость, связанную не только и даже не столько с их широким распространением, сколько с той ролью, которую эти заболевания играют в инвалидизации детей и в формировании заболеваемости взрослых [1, 2]. Среди сердечно-сосудистых заболе-

ваний у детей особое место занимают кардиомиопатии (КМП), рост которых отмечается в последнее время, что связано с широким внедрением высокоинформативных инструментальных методов исследования сердца [3, 4].

Необходимость дальнейшего изучения проблемы кардиомиопатий у детей связана также с тем, что в последние годы наметилась тенденция к их гипердиагностике в связи с недостаточно активным поиском других известных причин поражения миокарда и недостаточности кровообращения [5–7]. Высокая инвалидизация и смертность детей, страдающих кардиомиопатиями,

Для корреспонденции: Ахмедова Нилуфар Расуловна, канд. мед. наук, докторант каф. госпитальной педиатрии с основами нетрадиционного лечения №2 Ташкентского педиатрического медицинского института; e-mail: anilufar74@mail.ru

отсутствие четких клинико-функциональных маркеров диагностики, течения процесса, а также эффективных методов лечения определяют актуальность проблемы.

Одним из ранних признаков развития кардиомиопатий является нарушение сократительной функции миокарда и хроническая сердечная недостаточность. В последние годы внимание исследователей привлечено к изучению роли целого ряда пептидов при сердечно-сосудистых заболеваниях: эндотелинов, нейропептида Y и цитокинов, хромогранина A, тропонинов и др. [8, 9]. Впервые о роли эндотелиальных клеток, как регулятора сосудистого тонуса, написали ученые в 1980 году. Исследователи охарактеризовали эндотелиоциты, как «сердечно-сосудистый эндокринный орган, способствующий взаимосвязи крови и тканей в критический момент». Также выявлено, что эндотелин-1 является маркером и предиктором тяжести течения и исхода сердечно-сосудистых заболеваний [10]. В сердечной мышце регуляция сократительной функции осуществляется специальным белковым тропомиозиновым комплексом. В патологических условиях механизм функционирования тропонин-тропомиозинового компонента в значительной мере определяется степенью гипоксического повреждения сердца [11, 12]. В настоящее время определение компонентов тропонинового комплекса кардиомиоцитов уже достаточно широко используется в кардиологической практике, в основном для диагностики инфаркта миокарда. Тропомины освобождаются из поврежденных миокардиальных клеток и через лимфатическую систему попадают в общий кровоток [12–14].

В связи с этим, мы нашли актуальным и целесообразным выявление значения ферментов и кардиомаркеров в поражении сердечной мышцы при кардиомиопатиях у детей.

Цель исследования: определить биохимические маркеры поражения миокарда у детей с кардиомиопатиями в зависимости от формы заболевания и места проживания детей.

Материал и методы. Нами обследовано 104 больных, госпитализированных в кардиоревматологическое отделения Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра педиатрии в г. Ташкенте и Республиканского детского многопрофильного медицинского центра Республики Каракалпакстан. Средний возраст обследованных составил $8,9 \pm 0,6$ лет и варьировал от 1 до 17 лет.

Комплексное обследование больных включало: сбор анамнестических данных – семейный анамнез, акушерский анамнез матери, наследственная предрасположенность, анамнез жизни ребенка, перенесенные заболева-

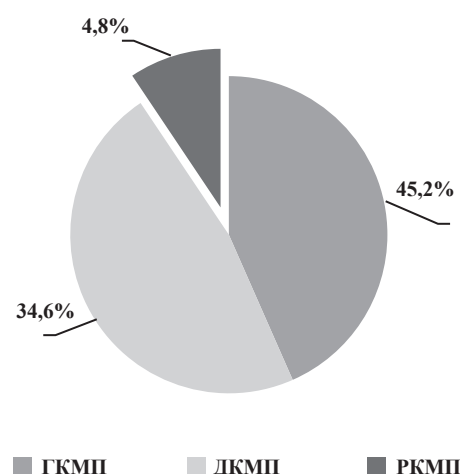


Рис. 1. Распределение детей в зависимости от вида кардиомиопатии.

ния; срок и характер начала заболевания, оценка общего состояния и физического развития.

Диагноз ставился на основании жалоб, объективного осмотра, лабораторных и инструментальных методов исследования (клинические и биохимические анализы крови, рентгенография грудной клетки, ЭКГ и Эхо-КГ). Анализ анамнестических, клинико-лабораторных и инструментальных данных показал, что всех больных независимо от нозологии объединило наличие на момент исследования хроническая сердечная недостаточность. Средняя длительность заболевания составила $19,2 \pm 3,1$ месяцев.

Распределение детей в зависимости от вида кардиомиопатий представлено на рис.1. Как видно из рисунка, большую часть обследованных больных составили дети с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) (45,2%) и гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП) (34,6%), в меньшем проценте случаев были диагностирована рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) (4,8%).

Биохимические методы включали определение общего белка и белковых фракций, С-реактивного белка, электролитов крови (калий, натрий, кальций); активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинфосфокиназы (КФК), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), а также кардиоспецифического фермента – креатинфосфокиназы-МВ (КФК-МВ) и кардиомаркеров (тропонин I и эндотелин-1). Ферменты определяли на биохимическом автомат анализаторе.

Таблица 1

Показатели уровня тканевых и кардиоспецифического ферментов у детей с кардиомиопатиями

Показатели	г. Ташкент	Республика Каракалпакстан	p
АЛТ, Ед/л (норма 5–40 Ед/л)	$26 \pm 2,7$	$29 \pm 3,7$	$p > 0,05$
АСТ, Ед/л (норма 5–40 Ед/л)	$35 \pm 3,1$	$38 \pm 3,4$	$p > 0,05$
ЛДГ, Ед/л (норма 200–400 Ед/л)	$491,7 \pm 29,3^{***}$	$501,8 \pm 30,8^{***}$	$p < 0,05$
КФК, Ед/л (норма 30–170 Ед/л)	$205,2 \pm 23,2^{***}$	$227,41 \pm 23,2^{***}$	$p < 0,001$
КФК-МВ, Ед/л (норма до 10 Ед/л)	$22,73 \pm 2,7^{**}$	$28,4 \pm 2,9^{***}$	$p < 0,001$

Примечание: ** – $p < 0,02$ и *** – $p < 0,001$ – достоверность относительно показателей нормы; p – достоверность разницы показателей между сравниваемыми группами.

Таблица 2

Показатели кардиомаркеров у детей с кардиомиопатиями

Показатели	г. Ташкент	Республика Каракалпакстан	p
Тропонин-I, нг/мл (норма 0–0,5 нг/мл)	0,2±0,01	0,3±0,02	p>0,05
Эндотелин-1, ммоль/л (0,1–1,0 ммоль/л)	0,67±0,1	0,87±0,13	p>0,05

Примечание. p – достоверность разницы показателей между сравниваемыми группами.

ре «Cobas 6000 R» с использованием реагентов фирмы «Human» (Германия). Показатели кардиомаркеров были определены иммунофлюоресцентным анализом на автомате «IMAXIZ» и полуавтомате «Multiskan» с использованием реактивов фирмы «Nema» (Россия).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы «Statistica 6.0». Достоверность различий сравниваемых параметров рассчитывалась с помощью критерия Стьюдента.

Результаты. Нами проведены лабораторные исследования, включающие изучение активности тканевых ферментов и кардиомаркеров у детей с кардиомиопатиями.

Анализ полученных результатов показателей тканевых и кардиоспецифических ферментов указывает, что срединные показатели ЛДГ, КФК и КФК-МВ были достоверно повышены по сравнению с нормой. Следует отметить, что у детей, проживающих в Республике Каракалпакстан, эти изменения были более выраженными и достоверно высокими, по сравнению с показателями детей г.Ташкента. Значения остальных ферментов (АСТ и АЛТ) были в пределах нормы (табл. 1).

Повышение концентрации тропонина у детей свидетельствует о том, что терминальная стадия хронической сердечной недостаточности (ХСН) сопровождается гибелью кардиомиоцитов и выходом кардиоспецифических белков в кровь. Уровень тропонина у наших обследованных детей соответствовал допустимым значениям неза-

висимо от региона проживания, что свидетельствует о не чувствительности и неспецифичности этого биохимического маркера при данном заболевании, и является наиболее характерным для некроза миокарда (табл. 2).

Определение концентрации в плазме крови эндотелина-1 помогает установить диагноз сердечной недостаточности на ранних стадиях заболевания. Уровень этого показателя в среднем оставался в пределах нормы как у детей, проживающих в г.Ташкенте, так и в Республике Каракалпакстан. Но вместе с тем, по результатам наших исследований выявлены высокие показатели эндотелина-1 с выраженной ХСН по мере прогрессирования заболевания (рис. 2).

Как видно из рис.2, у больных с давностью заболевания 5 лет уровень эндотелина-1 в среднем составил $1,3 \pm 0,08$ ммоль/л, у больных с давностью заболевания 9 лет, данный средний показатель составил $1,7 \pm 0,1$ ммоль/л, а у больного с давностью заболевания 15 лет – $1,98 \pm 0,2$ ммоль/л, что превышает в 2 раза показателей нормы. Корреляционный анализ между давностью КМП, степени тяжести ХСН и уровнем эндотелина-1 выявил сильную прямую корреляционную связь ($r=+0,97$). В связи с этим, уровень эндотелина-1 можно расценивать прогностическим критерием течения и исхода КМП.

В дальнейшем для оценки состояния миокарда у детей с КМП нами был проведен анализ тканевых и кардиоспецифических ферментов в зависимости от формы заболевания, который указывал на наличие таких же аналогичных изменений этих показателей, как и в зависимости от места проживания детей. Однако следует отметить, что у детей с ДКМП показатели тканевых ферментов ЛДГ, КФК, КФК-МВ были достоверно выше по сравнению с показателями группы сравнения (табл. 3).

При обеих формах КМП уровень ферментов АЛТ и АСТ отличались незначительно и соответствовали средним значениям нормы.

Показатели тропонина у детей также были на уровне нормативных показателей независимо от формы заболевания, а уровень эндотелина-1 был достоверно выше у детей с ГКМП и соответствовал верхней грани-

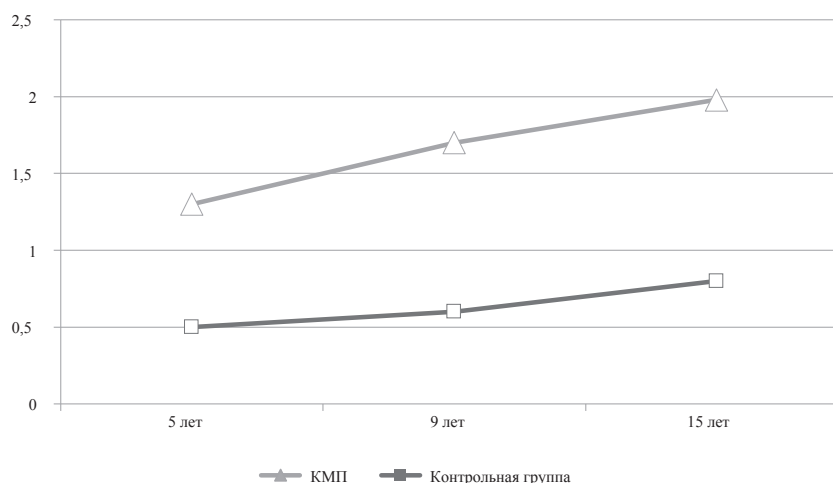


Рис. 2. Показатели эндотелина-1 в зависимости от давности заболевания.

Таблица 3

Показатели тканевых и кардиоспецифического ферментов в зависимости от формы кардиомиопатии

Показатели	ДКМП	ГКМП	<i>p</i>
АЛТ, Ед/л (норма 5–40 Ед/л)	25,8±2,2	20,5±1,9	<i>p</i> <0,05
АСТ, Ед/л (норма 5–40 Ед/л)	33,4±4,1	36,7±3,1	<i>p</i> >0,05
ЛДГ, Ед/л (норма 200–400 Ед/л)	493,6±27,7***	396,3±26,6***	<i>p</i> <0,001
КФК, Ед/л (норма 30–170 Ед/л)	198,6±9,9***	183,5±11,4***	<i>p</i> <0,001
КФК-МВ, Ед/л (норма до 10 Ед/л)	19,2±2,1***	15,6±1,3***	<i>p</i> <0,001

Примечание. *** – достоверность относительно показателей нормы (*p*<0,001); *p* – достоверность разницы показателей между сравниваемыми группами.

Таблица 4

Показатели кардиомаркеров в зависимости от формы кардиомиопатии

Показатели	ДКМП	ГКМП	<i>p</i>
Тропонин -I, нг/мл (норма 0–0,5 нг/мл)	0,2±0,019	0,4±0,038	<i>p</i> >0,05
Эндоотелин-1, ммоль/л (0,1–1,0 ммоль/л)	0,76±0,1	1,0±0,2	<i>p</i> >0,05

Примечание. *p* – достоверность разницы показателей между сравниваемыми группами.

це нормы, по сравнению с показателем детей с ДКМП (табл. 4).

Обсуждение. Диагностика и дифференциация такого грозного заболевания у детей, как кардиомиопатии, представляет актуальность в снижении детской инвалидности и смертности. В связи с этим, нами была определена цель выявления специфических биохимических маркеров поражения сердечной мышцы при данной патологии. Мы остановили свой выбор на тканевых ферментах, кардиоспецифическом ферменте и кардиомаркерах. В ходе исследования выявленное повышение уровня кардиоспецифических ферментов (КФК, МВ-фракции КФК) в сыворотке крови отражает степень повреждения миокардиальных клеток. Следует отметить также, что данные биомаркеры отражают наличие некроза кардиомиоцитов, но не позволяют уточнить причину его развития [13–15]. Полученные нами результаты определения уровня ферментов выявили высокую достоверность повышения из тканевых ферментов ЛДГ и КФК, а также кардиоспецифического изофермента МВ-фракции креатинфосфокиназы, наиболее выраженное повышение уровня ферментов было характерно для детей, проживающих в Республике Каракалпакстан, т. е. в экологически неблагоприятном регионе. На основании этих результатов можно заключить, что вышеуказанные ферменты можно расценивать высокоспецифическими биохимическими маркерами поражения сердечной мышцы, а возрастание их активности – критериями развития кардиомиопатий у детей.

Определение компонентов тропонинового комплекса кардиомиоцитов является наиболее чувствительным и специфичным биохимическим маркером некроза мио-

карда, и поэтому уже достаточно широко используется в кардиологической практике в основном для диагностики инфаркта миокарда. [11, 16, 17]. В 2000 г. ведущие кардиологические сообщества Европы и США выработали так называемый «консенсусный» документ в дефиниции инфаркта миокарда, в котором тропонин утвержден как главный диагностический критерий инфаркта миокарда. В последние несколько лет определение тропонинов стали применять и в педиатрии, в основном в неонатологии [18]. В перечисленных работах обследование новорожденных проводилось на 1-й неделе жизни, в исследование включались дети с патологией ЦНС, недоношенные и маловесные новорожденные. Критерием исключения являлись врожденные пороки сердца (ВПС), нарушения сердечного ритма, генетические аномалии. При этом повышение тропонинов отмечалось у детей в тяжелом состоянии (внутрижелудочковые кровоизлияния, длительная искусственная вентиляция легких и др.). По данным литературы [19–21], как маркер и предиктор тяжести и исхода сердечно-сосудистых заболеваний рассматривается эндоотелин. Эндоотелин относится к числу биологически активных бициклических полипептидов широкого спектра действия, различают три изоформы эндоотелина: эндоотелина-1, эндоотелин-2 и эндоотелин-3 [22–25]. На сегодняшний день эндоотелин-1 является одним из наиболее значимых регуляторов функционального состояния эндотелия сосудов [22]. На основании этих данных мы нашли целесообразным определить степень значимости тропонина и эндоотелина-1 в качестве маркера развития КМП у детей. Результаты наших исследований выявили, что при кардиомиопатиях уровень тропонина достоверно не отличается от показателей нормы, тогда как уровень эндоотелина-1 достоверно увеличивается по мере прогрессирования заболевания, что свидетельствует о значимости данного показателя в развитии и прогнозировании исхода КМП у детей.

Заключение. У детей с КМП независимо от формы заболевания отмечается повышение уровня тканевых (ЛДГ, КФК) и кардиоспецифического (КФК-МВ) ферментов, что свидетельствует о поражении миокарда. Наиболее выраженное повышение уровня данных ферментов характерно для детей, проживающих в Республике Каракалпакстан. Достоверным прогностическим критерием развития и исхода КМП является также прогрессирующее повышение уровня эндоотелина-1 по мере увеличения давности заболевания.

На основании этого можно заключить, что ЛДГ, КФК, КФК-МВ и кардиомаркер эндоотелин-1 можно расценивать высокоспецифическими биохимическими маркерами поражения миокарда, а возрастание их активности – критериями развития кардиомиопатий у детей.

Финансирование. Исследование проводилось в рамках прикладного гранта АДСС.15.1.3. Разработка критериев диагностики и прогноза у детей с заболеваниями сердечно-сосудистой системы в зависимости от детерминант здоровья.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-7, 12, 13, 15-18, 21-25 см. REFERENCES)

1. Кожевникова О.В. Факторы риска и маркеры ранней диагностики сердечно-сосудистых болезней у детей: Автореф. ... дисс. докт. мед. наук. М.; 2017.
2. Березнева Н.А., Сорокина Т.Е., Аверьянова Н.С., Громыко О.Е., Арсеньева Е.Н., Кустова О.В., Вашакмадзе Н.Д., Басаргина Е.Н.,

- Пинелис В.Г. Артериальное давление и полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы у детей с гипертрофической кардиомиопатией. *Российский педиатрический журнал*. 2012; 6; 10-3.
3. Линяева В.В., Леонтьева И.В., Павлов В.И., Иванова Ю.М., Воздвиженская Е.С. Биохимические и электрофизиологические маркеры электрической нестабильности миокарда у детей с гипертрофической кардиомиопатией. *Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского*. 2015; 94 (2): 60-2.
4. Черных Н.Ю., Грознова О.С., Тарасова А.А., Шигабеев И.М. Биохимические маркеры ишемии, сердечной недостаточности и деформация миокарда у детей с гипертрофической кардиомиопатией. *Педиатрия (Приложение к журналу Consilium Medicum)*. 2018; 4: 80-4.
8. Амелюшкина В.А., Коткина Т.И., Титов В.Н. Биохимические маркеры пораженного миокарда. *Клиническая медицина*. 2000; 5: 9-13.
9. Бершова Т.В., Баканов М.И., Басаргина Е.Н., Гасанов А.Г., Иванов А.П., Монаenkova С.В. Динамика биохимических маркеров ремодулирования миокарда у детей с дилатационной кардиомиопатией на фоне комплексной терапии. *Российский медицинский журнал*. 2014; 5: 25-9.
10. Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Эндотелины в норме и патологии. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; 10: 210-4.
11. Короткова А.А., Титов В.Н., Стараведов И.И. Прогностическая роль кардиального тропонина I у больных с острым синдромом без подъема ST. *Кардиология*. 2002; 4: 19-22.
14. Гиляревский С.Р. Миокардит: современные подходы к диагностике и лечению. М.: Медиа Сфера, 2008; 324 с.
19. Шурыгин М.Г. Значение повышения продукции эндотелина при инфаркте миокарда. *Фундаментальные исследования*. 2015; 1: 1281-7.
20. Шурыгин М.Г. Экспрессия эндотелина при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации фибробластического и вазоэндотелиального факторов роста. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2013; 1(89): 125-9.
7. Hsia T.Y., Ringewald J.M., Stroud R.E., Forbus G.A., Bradley S.M., Chung W.K., Spiale FG. Determinants of extracellular matrix remodelling are differentially expressed in paediatric and adult dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail*. 2011; 13(3): 271-7.
8. Amelyushkina V.A., Kotkina T.I., Titov V.N. Biochemical markers of the affected myocardium. *Klinicheskaya meditsina*. 2000; 5: 9-13. (in Russian)
9. Bershova T.V., Bakanov M.I., Basargina E.N., Gasanov A.G., Ivanov A.P., Monayenkova S.V. Dynamics of biochemical markers of myocardial remodeling in children with dilated cardiomyopathy against the background of complex therapy. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2014; 5: 25-9. (in Russian)
10. Dremina N.N., Shurygin M.G., Shurygina I.A. Endothelin in health and disease. *Mezhdunarodniy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy*. 2016; 10: 210-4. (in Russian)
11. Korotkova A.A., Titov V.N., Staravedov I.I. The prognostic role of cardiac troponin I in patients with acute ST-free syndrome. *Kardiologiya*. 2002; 4: 19-22. (in Russian)
12. JCS Joint Working Group. Guidelines for diagnosis and treatment of myocarditis (JCS 2009): digest version. *Circ. J*. 2011; 75(3): 734-43.
13. Eisenberg M.A., Green-Hopkins I., Alexander M.E., Chiang V.W. Cardiac troponin T as a screening test for myocarditis in children. *Pediatr. Emerg. Care*. 2012; 28(11): 1173-8.
14. Gilyarevsky S.R. Myocarditis: modern approaches to diagnosis and treatment. Moscow: Media-Sphera; 2008. (in Russian)
15. Izumi T., Nishii M. Diagnostic and prognostic biomarkers in acute myocarditis. *Interleukin-10. Herz*. 2012; 37(6): 627-31
16. Shammass N.W., Padaria R.F., Coyne E.P. Pericarditis, myocarditis, and other cardiomyopathies. *Prim.Care*. 2013; 40(1): 213-36.
17. Baba Y., Kubo T., Yamanaka S., Hirota T., Tanioka K., Yamasaki N. et al. Clinical Significance of High-Sensitivity Cardiac Troponin T in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Int. Heart. J*. 2015; 56(3): 309-13.
18. AHA/ACCF/HRS Recommendations for the Standardization and Interpretation of the Electrocardiogram Part IV: The ST Segment, T and U Waves, and the QT Interval A Scientific Statement From the American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee, Council on Clinical Cardiology; the American College of Cardiology Foundation; and the Heart Rhythm Society Endorsed by the International Society for Computerized Electrocardiology. Pentti M. Rautaharju, MD, PhD; Borys Surawicz, MD, FAHA, FACC; Leonard S. Gettes, MD, FAHA, FACC. *J.Am.Coll.Cardiol.* published online Feb 19, 2009.
19. Shurygin M.G. The value of increasing endothelin production in myocardial infarction. *Fundamentalnye issledovaniya*. 2015; 1: 1281-7. (in Russian)
20. Shurygin M.G. Endothelin expression in experimental myocardial infarction under conditions of altered concentration of fibroblastic and vasoendothelial growth factors. *Bulleten VSNTsSO RAMN*. 2013; 1(89): 125-9. (in Russian)
21. Davenport A.P. Endothelin. *Pharmacol. Rev*. 2016; 68(2): 357-418.
22. Tanowitz H.B. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect. Immun*. 2005; 73: 2496-2503.
23. Liefeldt L. Effects of transgenic endothelin-2 over expression on diabetic cardiomyopathy in rats. *Eur. J. Clin. Invest*. 2010; 40(3): 203-10.
24. Ling L., Maguire J.J., Davenport A.P. Endothelin-2, the forgotten isoform: emerging role in the cardiovascular system, ovarian development, immunology and cancer. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 168(2): 283-95.
25. Hiyama T.Y. Endothelin-3 expression in the subfornical organ enhances the sensitivity of Na(x), the brain sodium-level sensor, to suppress salt intake. *Cell Metab*. 2013; 17: 507-19.

Поступила 25.04.19

Принята к печати 29.04.19

ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ ОБЩЕГО И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА У ЧЕЛОВЕКА В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ЖИЗНИ

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России,
197110, Санкт-Петербург, Россия

В работе исследованы изменения сыровоточного уровня общего антимюллера гормона (АМГ) и его активированной формы у детей разного пола и женщин с различным репродуктивным статусом. Известно, что этот цитокин суперсемейства TGF β в эмбриогенезе млекопитающих обеспечивает формирование репродуктивной системы по мужскому типу, а после рождения регулирует фолликулогенез, сперматогенез и баланс половых гормонов. Биологически активная форма гормона (аАМГ) образуется в результате ограниченного протеолиза молекулы АМГ; достоверно не известно, в каких тканях и под действием какого фермента он происходит. Сыровоточный уровень аАМГ представляется более информативным клиническим показателем, чем содержание общего АМГ (оАМГ), однако на мировом рынке отсутствуют иммуноферментные диагностические системы, позволяющие осуществлять прямую количественную детекцию аАМГ. В данной работе количественная детекция оАМГ и аАМГ в сыворотке крови была проведена с использованием специально разработанных иммуноферментных тест-систем. Показано, что у девочек сыровоточный уровень оАМГ, как и отношение концентраций аАМГ/оАМГ, практически не изменяется с возрастом, тогда как у мальчиков с возрастом наблюдается не только ранее описанное в литературе достоверное снижение сыровоточного уровня оАМГ (коэффициент корреляции Пирсона $R = -0.86$, $p < 0.001$), но и соотношения уровня аАМГ/оАМГ ($R = -0.531$, $p < 0.001$). Также было установлено, что у беременных женщин количество оАМГ и доля аАМГ в сыворотке крови достоверно выше ($p < 0.01$ и $p < 0.001$, соответственно), чем у женщин контрольной группы. Полученные результаты хорошо согласуются с известными данными о содержании оАМГ и аАМГ в сыворотке крови людей разного пола и возраста и свидетельствуют об изменении соотношения сыровоточных уровней аАМГ/оАМГ при беременности, что может быть важно как для углубления понимания биологии АМГ, так и интерпретации результатов, полученных с помощью диагностических тестов на основе АМГ.

Ключевые слова: антимюллеров гормон; АМГ; беременность; ИФА, постнатальный период; протеолиз; сыворотка.

Для цитирования: Рак А.Я., Трофимов А.В., Петров А.В., Горбунов Н.П., Ищенко А.М. Динамика сыровоточных уровней общего и биологически активного антимюллера гормона у человека в различные периоды жизни. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 342-347. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-342-347>

Rak A.Ya., Trofimov A.V., Petrov A.V., Gorbunov N.P., Ischenko A.M.

THE DYNAMICS OF HUMAN TOTAL AND ACTIVATED ANTI-MULLERIAN HORMONE SERUM LEVELS IN DIFFERENT LIFE PERIODS

State Research Institute for Highly Pure Biopreparations, 197110, St. Petersburg, Russia

Here, changes in the serum level of total anti-mullerian hormone (AMH) and its activated form in children of both sexes and women with different reproductive status are investigated. This TGF β superfamily cytokine is known to provide the formation of the male-type reproductive system in mammalian embryogenesis, and regulate folliculogenesis, spermatogenesis and the balance of sex hormones after birth. The biologically active form of the hormone (aAMH) is formed as a result of limited proteolysis of the AMH molecule; it is not reliably known in which tissues and under the action of which enzyme it occurs. The serum level of aAMH seems to be a more informative clinical indicator than the content of total AMH (tAMH), but there are no ELISA systems at the world market that provide direct quantitative detection of aAMH. In this work, quantitative detection of total hormone (tAMH) and its biologically active form (aAMH) in serum was performed using specially developed enzyme immunoassay systems. We showed that in girls, the total serum AMH level, as well as the concentration ratio aAMH / tAMH, practically does not change with age, whereas in boys, there is not only a significant decrease in the total serum AMH level previously described in the literature (Pearson correlation coefficient $R = -0.86$, $p < 0.001$), but also in the ratios of the aAMH / tAMH level ($R = -0.531$, $p < 0.001$). It was also found that in pregnant women, the amount of total AMH and the proportion of aAMH in serum was significantly higher ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) than in the control group women. The obtained results are in good agreement with the available data on the total and activated AMH content in the blood serum of people of different sex and age and indicate a change in the ratio of aAMH / tAMH serum levels in pregnancy. These data may be important both for deepening the understanding of AMH biology and for interpreting the results obtained using AMH detection based diagnostics.

Key words: anti-mullerian hormone, AMH, ELISA, MIS, postnatal life, pregnancy, proteolysis, serum.

For correspondence: Rak Aleksandra Yakovlevna, junior researcher of the protein biochemistry laboratory;
e-mail: a.ya.rak@hpb.spb.ru

For citation: Rak A.Ya., Trofimov A.V., Petrov A.V., Gorbunov N.P., Ischenko A.M. The dynamics of human total and activated anti-mullerian hormone serum levels in different life periods. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 342-347 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-342-347>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.04.2019
Accepted 26.04.2019

Введение. Антимюллеров гормон (АМГ) - гликопротеин с молекулярной массой около 140 кДа, принадлежащий суперсемейству цитокинов трансформирующего фактора роста- β (TGF- β). В отличие от других членов этого суперсемейства, экспрессия которых наблюдается в организме повсеместно, АМГ экспрессируется крайне тканеспецифично – в клетках Сертоли семенников и клетках гранулёзы яичников [1]. АМГ является одним из ключевых факторов, определяющих пол и регулирующих функционирование репродуктивной системы у млекопитающих [2]. Гормон обеспечивает регрессию мюллеровых протоков в мужских эмбрионах, а в постнатальном периоде жизни млекопитающих регулирует фолликулогенез [3], созревание половых клеток и функционирование половых желез [4]. Связывание АМГ с MISRII служит сигналом к запуску сигнального пути с участием АМГ и реализации сигнального каскада с участием белков семейства Smad, что в конечном счете приводит к изменению экспрессии генов-эффекторов [5]. Также существуют данные, свидетельствующие о возможности MISRII-зависимой активации сигнального пути с участием β -катенина [6] и NF- κ B [7], однако этот аспект действия АМГ на клетки-мишени пока исследован достаточно слабо.

Экспрессия АМГ у человека происходит как в эмбриогенезе, так и в постнатальном периоде жизни [8]. У мужчин АМГ начинает определяться в крови в эмбриогенезе в начале регрессии мюллеровых протоков. После их инволюции секреция АМГ не прекращается, а остается стабильно сильной (50-70 нг/мл) в течение всего оставшегося фетального периода [9]. Такой уровень секреции сохраняется в неонатальном периоде, младенчестве и детстве. Известно, что у мужчин концентрация АМГ в сыворотке крови снижается более чем на порядок в пубертатном периоде и сохраняется на таком уровне на протяжении всей взрослой жизни [9]. Важно, что до начала пубертатного периода АМГ секретируется через базальную мембрану клеток Сертоли в интерстициальное пространство семенников, а затем оттуда попадает в кровяное русло. В течение пубертатного периода, когда формируется гематотестикулярный барьер, АМГ постепенно начинает секретироваться в просвет семенных канальцев, что в итоге приводит к возрастанию его концентрации в семенной плазме (150 пМ) по сравнению с таковой в плазме крови (около 10 пМ) [9]. Обнаружена позитивная корреляция между уровнем АМГ в семенной жидкости и числом и подвижностью сперматозоидов [9].

В женском организме АМГ начинает секретироваться гранулезными клетками фолликулов яичников в конце эмбрионального развития (на 36-38-й нед беременности), однако до начала пубертатного периода его концентрация в сыворотке остается чрезвычайно низкой [10]. В пубертатном периоде начинается рост преантральных и малых антральных фолликулов, и секреция АМГ их гранулезными клетками становится интенсивнее – уровень гормона в крови достигает 2-5 нг/мл. Известно, что в начале беременности уровень общего АМГ (оАМГ) в сыворотке крови меняется недостоверно, а после родов – снижается по сравнению с содержанием до беременности [9].

Ключевую роль в регуляции продукции АМГ играют генетические и гормональные факторы. В промоторе гена гормона содержатся консервативные сайты связывания с транскрипционными факторами – продукта-

ми генов *Sry*, *Sf1* (стероидогенного фактора 1), *Sox9* и *Gata-4* [11, 12]. Белки SOX9 и SF1 являются важными регуляторами развития репродуктивной системы в эмбриогенезе, а кроме того – активаторами транскрипции гена АМГ [13]. Другим регулятором уровня экспрессии АМГ являются гормоны, главным образом тестостерон [14]. В ходе пубертатного периода изменение концентраций АМГ и тестостерона в сыворотке крови мужчин происходит в противоположных направлениях: концентрация тестостерона нарастает, а АМГ – снижается [5]. Помимо тестостерона, продукцию АМГ также регулирует и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) [14]. В женском организме продукция антимюллерова гормона находится под контролем не только тестостерона и ФСГ, но и эстрогенов [15, 16].

Известно, что для проявления биологической активности димерная молекула АМГ (прогормона) должна претерпеть протеолиз по специфическому сайту, что приводит к образованию активированной формы гормона (аАМГ)- нековалентно ассоциированного комплекса N- и C-концевого фрагментов АМГ [8]. Показано, что величина константы ассоциации C-концевого фрагмента АМГ с внеклеточной частью рецептора АМГ II типа (MISRII), составляет $(4 \pm 0,32) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, в то время как непротеолизированная форма АМГ практически не связывается с MISRII [17]. Вопрос о том, в каких тканях и под действием какого фермента происходит специфический протеолиз молекулы АМГ *in vivo*, остается открытым. Некоторые авторы предполагают, что АМГ активируется посредством расщепления исключительно в процессе биосинтеза и секреции, но не в сыворотке крови. При этом фрагментация гормона происходит в гонадах, и в циркуляцию поступает как нерасщепленный прогормон, так и нековалентно ассоциированный комплекс N- и C-концевого фрагментов АМГ [9]. По мнению других исследователей, специфический протеолиз АМГ может происходить как в кровяном русле под действием плазмина, так и в гонадах под действием таких ферментов, как фурин и PC5, принадлежащих к семейству пропротеин-конвертаз [18, 19]. Наконец, существует гипотеза о том, что расщепление гормона по специфическому сайту является аутокаталитическим и сопряжено с его поступлением в ткани и взаимодействием с рецепторами АМГ I и II типа - MISRI и MISRII, соответственно [20].

Достоверно неизвестно и то, каким образом изменяется сывороточный уровень биологически активной формы АМГ женщин при изменении репродуктивного статуса. Между тем этот показатель может иметь более важное прогностическое значение, чем содержание оАМГ в сыворотке крови, поскольку именно биологически активная форма гормона ответственна за реализацию его действия [2, 8]. Исследованию динамики сывороточного уровня биологически активного АМГ во многом препятствует отсутствие отечественных диагностических наборов.

В литературе имеются сведения о разработанной ранее тест-системе для количественной детекции аАМГ [10]. В ее основе – использование деоксихолата на этапе связывания сывороточного АМГ с иммобилизованными антителами. Этот реагент способствует диссоциации комплекса N- и C-концевых фрагментов АМГ (активированной формы), что обеспечивает возможность дальнейшей детекции только прогормона. Таким образом, после определения сывороточных уровней прогормона и оАМГ, определения

Таблица 1

Сведения о возрасте и половой принадлежности детей, сыворотки крови которых были исследованы

Возраст, годы	Пол	
	Мужской, <i>n</i>	Женский, <i>n</i>
0-2	11	13
3-6	9	13
7-10	8	13
11-15	11	12
16-18	7	10

Примечание. *n* – число обследованных.

сывороточного уровня активированной формы гормона производится расчетным путем [10]. В отличие от ранее проведенных исследований, в настоящей работе количественная детекция аАМГ осуществлялась не расчетным способом, а напрямую с помощью антител, специфичных к эпитопу молекулы АМГ в составе сайта специфического протеолиза, который экспонирован лишь у активированной формы гормона. Эта особенность не только повышает точность анализа, но и снимает необходимость использования для количественной детекции аАМГ каких-либо вспомогательных реагентов и тест-систем. В дальнейшем тест-система 1 может стать основой для разработки диагностикумов для определения фертильного статуса у женщин и детекции АМГ-секретирующих новообразований как у женщин, так и у мужчин.

Материал и методы. Исследование проведено с использованием 107 образцов периферической крови соматически здоровых детей возрастом от 1 мес до 18 лет, предоставленных центральной клинко-диагностической лабораторией ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей» (г. Санкт-Петербург) после получения информированного согласия от законных представителей пациентов. Данные о возрасте и половой принадлежности детей, сыворотки крови которых были исследованы, представлены в табл. 1.

Кроме того, в работе были использованы 15 образцов венозной крови беременных женщин (20-25 нед) и 15 образцов венозной крови соматически здоровых женщин контрольной группы (ФГБНУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, г. Санкт-Петербург»), взятие

осуществляли также после получения информированного согласия от пациенток. Образцы крови были отобраны в вакутейнеры с коагулянтом, после чего методом центрифугирования при 3000g в течение 10 мин из них были выделены сыворотки, которые были использованы в экспериментах.

Для приготовления стандартных проб в работе использованы препараты рекомбинантного прогормона и аАМГ, характеризующиеся чистотой около 97%. Они были получены ранее из культуральной жидкости клеток-продуцентов линии СНО («American Type Tissue Collection», США), трансфицированных геном АМГ человека (штамм продуцента СНО-MIS#26) [21], методом тандемной иммуоаффинной и обращенно-фазовой хроматографии по разработанной методике [17]. Кроме того, в экспериментах были использованы следующие, полученные ранее моноклональные антитела мыши:

М1 [22], специфичные к N-концевому эпитопу SA-GATA, оказывающемуся доступным после специфического протеолиза молекулы АМГ, и не взаимодействующие с нерасщепленным гормоном;

6Е11 [23], распознающие эпитоп в составе N-концевого фрагмента АМГ, способные к детекции как прогормона, так и аАМГ;

М2-Пх [17] – пероксидазный конъюгат антител, распознающих N-концевой фрагмент обеих форм АМГ. Он был использован в качестве детектирующих антител для определения уровней обеих форм гормона.

Количественную детекцию оАМГ и аАМГ проводили методом твердофазного гетерогенного сэндвич-иммуоферментного анализа (ИФА), на первом этапе которого в лунках планшета проводили сорбцию антител 6Е11 или М1, соответственно (1,5 мкг/мл в 20 мМ боратном буфере, pH 8.0). Далее осуществляли внесение тестируемых сывороток и серии разведений стандартных препаратов АМГ (прогормона и активированной формы, соответственно). Детекцию связанного с иммобилизованными антителами АМГ в обоих случаях проводили с помощью пероксидазного конъюгата М2-Пх (0,25 мкг/мл). Регистрацию иммуоферментной реакции проводили стандартным методом с использованием тетраметилбензидина и ридера для микропланшетов BioRad Reader Model 680 («BioRad», США) при 450 нм. Таким образом, в работе были использованы две иммуофер-

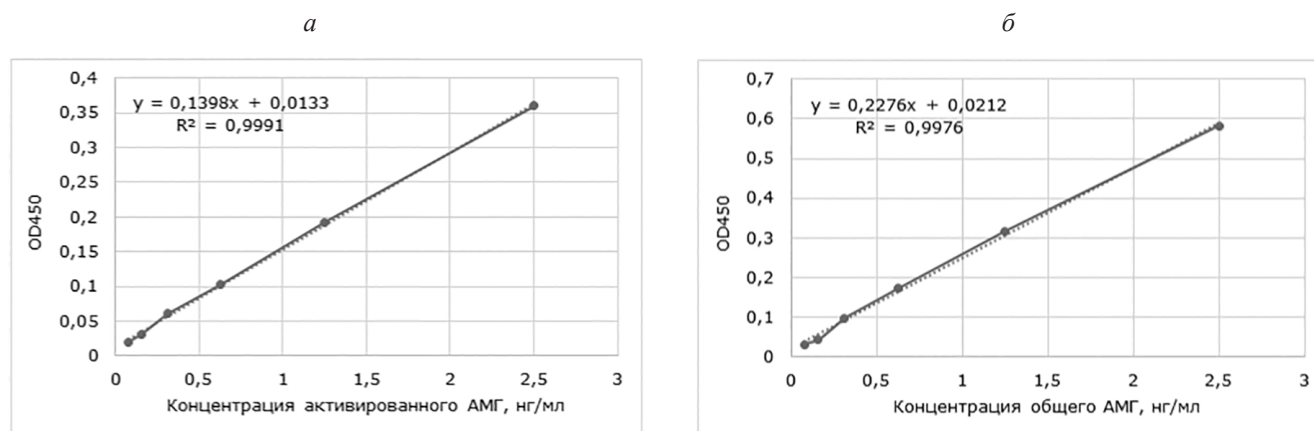


Рис. 1. Калибровочные кривые, построенные для проведения анализа с помощью тест-системы 1 (а) и 2 (б).

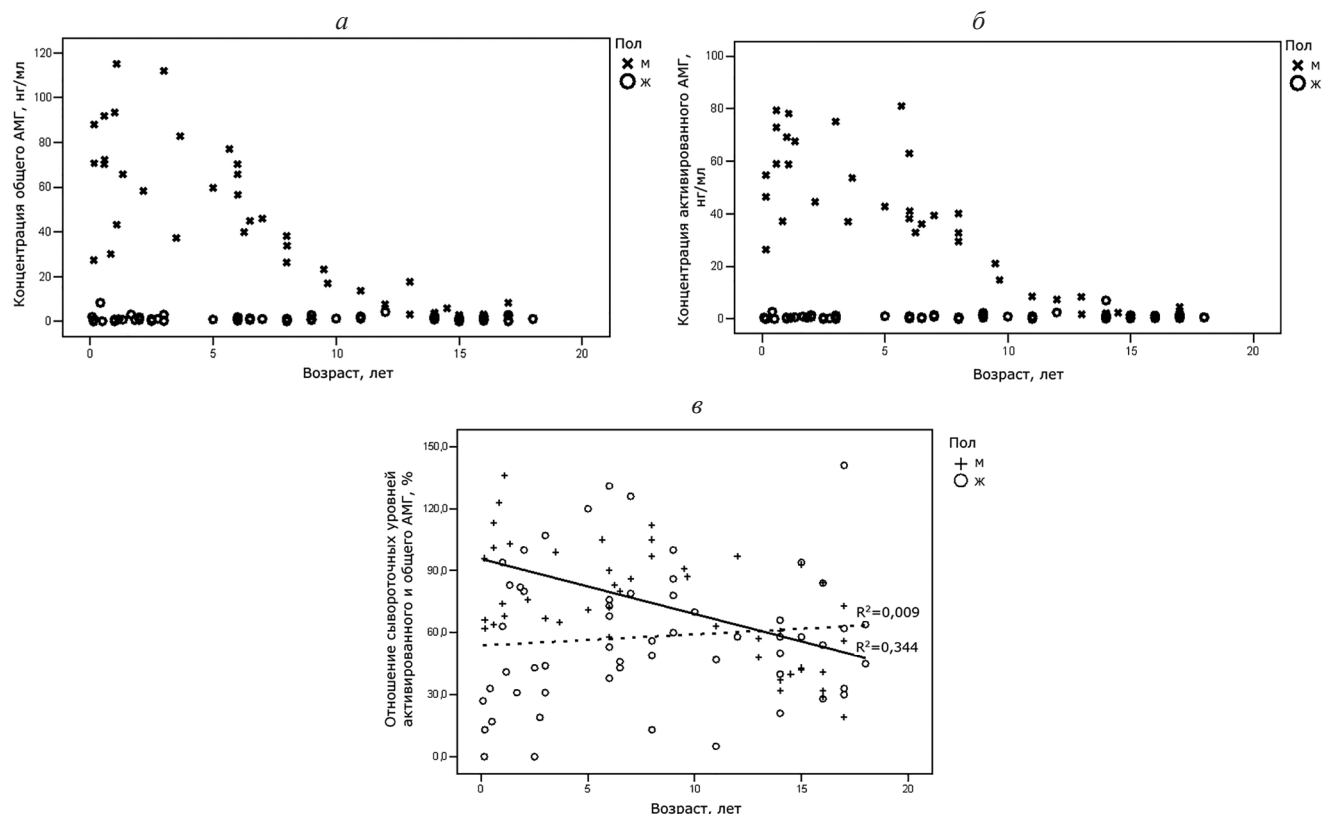


Рис. 2. Уровни двух форм АМГ, определенные с помощью тест-систем 2 (а), и 1 (б) и соотношение сывороточных уровней аАМГ и оАМГ у детей различного пола и возраста (в). На панели в показаны линии тренда для образцов сывороток мальчиков (сплошная линия) и девочек (пунктирная линия).

ментные тест-системы, одна из которых – (М1) – сыворотка крови – (М2-Пх) (1) – позволяла определить сывороточный уровень аАМГ, а другая – (6Е11) – сыворотка крови – (М2-Пх) (2) – уровень оАМГ. Калибровочные кривые, построенные по соответствующим стандартным препаратам для двух тест-систем, представлены на рис. 1.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 10, рассчитывая t-критерий Стьюдента для оценки значимости различий между сравниваемыми показателями и определяя значе-

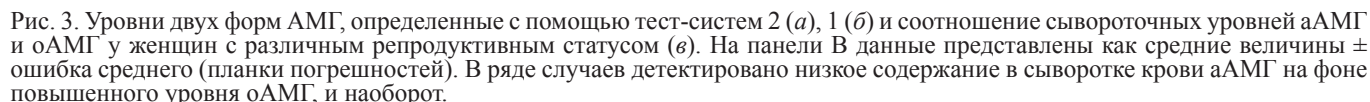
ние коэффициента корреляции Пирсона R для проверки существования линейной зависимости между величинами. Результаты признавали статистически значимыми при $p < 0,05$. Минимальные размеры выборок были определены на основе статистической мощности 95% и уровня значимости 0,05; для первой части исследования требуемый размер каждой выборки составил 47, для второй – 15. Нормальность распределения в каждом случае определяли, применяя критерий Шапиро-Уилка; во всех исследуемых выборках распределение не отличалось от нормального.

Таблица 2

Сывороточные уровни аАМГ и оАМГ, определенные с помощью двух иммуноферментных тест-систем, а также отношение сывороточных уровней аАМГ/оАМГ у детей разного пола и возраста

Возраст, годы	Уровень оАМГ, нг/мл		Уровень аАМГ, нг/мл		Отношение концентраций аАМГ/оАМГ, %	
	М	Ж	М	Ж	М	Ж
0-2	69,87±2,74 [63,72-76,02]	1,58±0,22 [1,46-1,80]	59,08±1,69 [42,04-70,12]	0,68±0,07 [0,60-0,76]	91,4±2,6 [85,6-97,2]	51,1±3,4 [41,8-56,1]
3-6	68,86±2,08 [62,22-75,55]	0,94±0,08 [0,82-1,06]	52,92±1,65 [49,12-60,24]	0,54±0,04 [0,46-0,60]	78,1±1,6 [65,3-80,9]	61,7±3,9 [55,5-68,0]
7-10	33,69±1,05 [26,27-41,11]	1,28±0,08 [1,08-1,48]	30,87±0,88 [24,68-37,06]	0,89±0,06 [0,72-1,08]	92,6±1,1 [84,9-100,2]	67,2±3,0 [61,3-73,1]
11-15	5,78±0,53 [5,25-6,13]	1,58±0,11 [1,37-1,79]	3,27±0,32 [2,82-3,72]	0,85±0,07 [0,67-1,05]	55,7±2,2 [46,8-66,4]	71,6±7,6 [60,1-79,5]
16-18	3,38±0,22 [3,00-4,02]	1,46±0,11 [1,18-1,75]	1,67±0,14 [1,40-1,84]	0,73±0,04 [0,62-0,83]	47,7±2,1 [41,4-52,3]	82,2±7,7 [73,3-93,1]

Примечание. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка среднего. В квадратных скобках приведен 95% доверительный интервал.



Обсуждение. Представленные результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными о

Обнаруженное увеличение содержания оАМГ в сыворотке крови (рис. 3, *а*) и доли аАМГ при беременности (рис. 3, *в*) может быть связано с необходимостью временного предотвращения созревания фолликулов, торможение дифференцировки которых является одной из важнейших биологических функций АМГ в постнатальном периоде жизни млекопитающих [3]. Отметим,

что наблюдаемое в ряде случаев повышение содержания активированной формы гормона в сыворотке крови до 100% также может быть связано с АМГ-индуцируемым формированием репродуктивной системы плода по мужскому типу [2], что предстоит выяснить в ходе дальнейших исследований.

Заключение. Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют об изменении сывороточного уровня оАМГ и уровня активированного гормона у человека в зависимости от пола, возраста и репродуктивного статуса. С использованием специально разработанных тест-систем была исследована динамика сывороточных уровней прогормона и аАМГ у детей; показано, что концентрация обеих форм гормона, как и доля аАМГ у мальчиков с возрастом уменьшается, в то время как у девочек остается практически неизменной. Впервые было показано, что при беременности происходит не только существенное увеличение сывороточного уровня оАМГ, но и доли аАМГ. Это явление может быть использовано в качестве прогностического признака и ассоциировано с развитием репродуктивной системы плода.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-20, 23-24
см. REFERENCES)

2. Гукасова Н.В., Северин С.Е. Белок MIS: структура, регуляция экспрессии и молекулярный механизм действия. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2005; 4: 3-9.
21. Петров А.В., Карасев М.М., Кудлинг Т.В., Пигарева Н.В., Сергеева В.Е. и др. Синтетическая ДНК, кодирующая антимюллеров гормон человека, содержащий ее экспрессионный вектор pTVK4pu/MISOPT и штамм клеток яичников китайского хомячка CHO-MIS - продуцент рекомбинантного антимюллерового гормона человека. Патент РФ №2616273; 2017.
22. Рак А.Я., Трофимов А.В., Колобов А.А., Ищенко А.М. Моноклональные антитела к С-концевому фрагменту рекомбинантного антимюллерова гормона человека: инструмент для очистки, детекции и исследования. *Цитокины и воспаление*. 2018; 17(1-4): 72-9.

REFERENCES

1. Lee M. M., Donahoe P. K. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrin. Rev.* 1993; 14(2): 152-64.
2. Gukasova N.V., Severin S.E. MIS protein: structure, expression regulation, and molecular mechanism of action. *Voprosy Biologicheskoy, Meditsinskoy i Farmatsevticheskoy Khimii*. 2005; 4: 3-9. (in Russian)
3. Durlinger A.L., Visser J.A., Themmen A.P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reprod.* 2002; 124: 601-9.
4. Sriraman V., Niu E., Matias J.R., Donahoe P.K., MacLaughlin D.T., Hardy M.P. et al. Mullerian inhibiting substance inhibits testosterone synthesis in adult rats. *J. Androl.* 2001; 22: 750-8.
5. Teixeira J., Maheswaran S., Donahoe P. K. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrin. Rev.* 2001; 22(5): 657-74.
6. Allard S., Adin P., Guedard L., di Clemente N., Josso N., Orgebin-Crist M. C. et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development*. 2000; 127: 3349-60.
7. Segev D. L., Hoshiya Y., Hoshiya M., Tran T. T., Carey J. L., Stephen A. E. et al. Mullerian-inhibiting substance regulates NF-

- κB signaling in the prostate *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 2002; 99: 239-44.
8. McLennan, I. S., Pankhurst M. W. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions. *J. Endocrinol.* 2015; 226(3): R45-R57.
9. Pankhurst M.W., Leathart B.L., Batchelor N.J., McLennan I.S. The anti-Müllerian hormone precursor (proAMH) is not converted to the receptor-competent form (AMH_{NC}) in the circulating blood of mice. *Endocrinology*. 2016; 157(4): 1622-9.
10. Pankhurst M.W., Chong Y.H., McLennan I.S. Relative levels of the proprotein and cleavage-activated form of circulating human anti-Müllerian hormone are sexually dimorphic and variable during the life cycle. *Physiol. Rep.* 2016; 4(9): 1-10.
11. Lane A.H., Donahoe P.K. New insights into Mullerian inhibiting substance and its mechanism of action. *J. Endocrinol.* 1998; 158(1): 1-6.
12. Nef S., Parada L.F. Hormones in male sexual development. *Genes Dev.* 2000; 14(24): 3075-86.
13. De Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P. et al. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18(11): 6653-65.
14. Al-Attar L., Al-Attar L., Noël K., Dutertre M., Belville C., Forest M.G. et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(6): 1335-43.
15. Pinola P., Morin-Papunen L.C., Bloigu A., Puukka K., Ruokonen A., Jarvelin M.-R. et al. Anti-Müllerian hormone: correlation with testosterone and oligo- or amenorrhoea in female adolescence in a population-based cohort study. *Hum. Reprod.* 2014; 29(10): 2317-25.
16. Xu J., Xu F., Letaw J.H., Park B.S., Searles R.P., Ferguson B.M. Anti-Müllerian hormone is produced heterogeneously in primate preantral follicles and is a potential biomarker for follicle growth and oocyte maturation *in vitro*. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016; 33(12): 1665-75.
17. Rak A. Ya., Trofimov A.V., Protasov E.A., Rodin S.V., Zhahov A.V., Zabrodskaya Ya. A. et al. Spontaneous proteolytic processing of human recombinant anti-mullerian hormone: structural and functional differences of the molecular forms. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019; 55(1): 13-20.
18. Nachtigal M. W., Ingraham H. A. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/ subtilisin-like endoprotease. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 1996; 93(15): 7711-6.
19. Ragin R. C., Donahoe P. K., Kenneally M. K., Ahmad M. F., MacLaughlin D. T. Human Müllerian inhibiting substance: enhanced purification imparts biochemical stability and restores antiproliferative effects. *Protein Express. Purif.* 1992; 3(3): 236-45.
20. Di Clemente N., Jamin S. P., Lugovskoy A., Carmillo P., Ehrenfels C., Picard J. Y. et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF-β. *Mol. Endocrinol.* 2010; 24(11): 2193-2206.
21. Petrov A.V., Karasev M.M., Kudling T.V., Pigareva N.V., Sergeeva V.E., Trofimov A.V. et al. Synthetic DNA encoding human anti-mullerian hormone, expression vector pTVK4pu / MISOPT and the Chinese hamster ovary cell strain CHO-MIS - a producer of human recombinant anti-mullerian hormone. Patent RF N 2616273; 2017. (in Russian)
22. Rak A.Ya., Trofimov A.V., Kolobov A.A., Ischenko A.M. Monoclonal antibodies against the C-terminal fragment of human recombinant anti-mullerian hormone: a tool for purification, detection and study. *Tsitokiny i vospalenie*. 2018; 17(1-4): 72-9. (in Russian)
23. Hudson P.L., Douglas I., Donahoe P.K., Cate R.L., Epstein J., Pepinsky R.B. et al. An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1990; 70(1): 16-22.
24. Pankhurst M. W., McLennan I. S. A specific immunoassay for proAMH, the uncleaved proprotein precursor of anti-Müllerian hormone. *Mol. Cell Endocrinol.* 2016; 419: 165-71.

Поступила 23.04.19

Принята к печати 26.04.19

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Захарова Н.М.¹, Шабалова И.П.², Али-заде Г.Х.³, Рябцева А.А.³, Ветчинникова О.Н.³, Акберова С.И.⁴

МЕТОД ИМПРЕССИОННОЙ ЦИТОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМА СУХОГО ГЛАЗА

¹ГБУЗ МО «Серпуховская городская больница им. Семашко Н.А.», 142200, Московская обл., Россия;

²ФГБОУ ДПО Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия;

³ГБУЗ МО МОНИКИ им М.Ф. Владимирского, 129110, Москва, Россия;

⁴Медицинский центр ООО «Медквадрат», 115409, Москва, Россия

Цель исследования - анализ клеточного состава отпечатков конъюнктивы глазного яблока и оценка информативности цитоморфологического метода исследования в диагностике синдрома сухого глаза (ССГ).

Цитологическое исследование методом импрессионной цитологии выполнено у 72 пациентов: 60 пациентов с ССГ и 12 – без заболевания глаз (контрольная группа). Основным компонентом цитограмм у пациентов с ССГ являются: (а) чешуйки плоского эпителия (гиперкератотциты); (б) группы и скопления уплощенных эпителиальных клеток; (в) небольшое количество (до пяти в препарате) бокаловидных клеток. Способ импрессионной цитологии повышает точность диагностики ССГ.

Ключевые слова: синдром сухого глаза; импрессионная цитология.

Для цитирования: Захарова Н.М., Шабалова И.П., Али-заде Г.Х., Рябцева А.А., Ветчинникова О.Н., Акберова С.И.

Метод импрессионной цитологии в диагностике синдрома сухого глаза. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 348-350. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-348-350>

Zakharova N.M.¹, Shabalova I.P.², Ali-Zade G. H.³, Rjabtseva A.A.³, Vetchinnikova O.N.³, Akberova S.I.⁴

IMPRESSIONABLE CYTOLOGY METHOD IN DIAGNOSTICS OF DRY EYE SYNDROME

¹Serpukhov Town Hospital by N.A. Semashko. 142200, Moscow Region, Russian;

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. 125284, Moscow, Russian;

³M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical and Research Institute, 129110, Moscow, Russian;

⁴Medical Center «Medkvadrat», 115409, Moscow, Russian

Analysis of the cellular composition of the eyeball conjunctival prints and evaluation of the informative of the cytological method of research in the diagnosis of dry eye syndrome (DES). Cytological examination using impression cytology was performed in 72 patients: 60 patients with DES and 12 without eye disease (control group). The main component of cytological sample in patients with DES are (a) squamous epithelium (hyperkeratocytes); (b) groups and clusters of flattened epithelial cells; (c) a small amount (up to five in the preparation) of goblet cells. Impression cytology method improves the accuracy of diagnosis of DES.

Key words: dry eye syndrome, impressionable cytology method.

For citation: Zakharova N.M., Shabalova I.P., Ali-Zade G. H., Rjabtseva A.A., Vetchinnikova O.N., Akberova S.I. *Impressionable cytology method in diagnostics of dry eye syndrome. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 348-350 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-348-350>*

For correspondence: Zakharova N.M., Head of Clinical Laboratory; e-mail: nmzaharova@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.04.2019
Accepted 21.05.2019

Синдром сухого глаза (ССГ) является одной из важных проблем офтальмологии. Высокая распространенность этого заболевания, стойкий дискомфорт, снижающий работоспособность и качество жизни, недостаточная эффективность терапии и расходы на медицинскую реабилитацию определяют социальную значимость этой патологии во всех странах мира [1–3].

Диагностика ССГ строится, во-первых, на оценке

жалоб и неспецифических симптомов, встречающихся и при других заболеваниях глаз, во-вторых, на субъективном учёте специфических признаков, что затрудняет выявление данной патологии, проведение адекватной терапии и осуществление объективного контроля её результатов [4–6]. Таким образом, дальнейшее совершенствование лечебно-диагностических мероприятий у больных ССГ является актуальной задачей офтальмологии.

Традиционно в медицинской практике значительное внимание уделяется морфологическим методам диагностики. Дифференциальная морфологическая диагности-

Для корреспонденции: Захарова Наталья Михайловна, канд. мед. наук; e-mail: nmzaharova@yandex.ru

ка учитывает признаки нормы, пограничных состояний и собственно патологические признаки в зависимости от степени их выраженности. Морфологическая диагностика складывается из обобщения конкретных макро- и микроскопических картин, выступающих в качестве признаков патологического процесса, что в итоге способствует пониманию патогенеза болезни в каждом конкретном случае.

Одним из классических морфологических методов является цитологическое исследование. К преимуществам цитологического метода можно отнести простоту приготовления препарата для исследования, малую травматичность для больного, возможность получения диагностически значимого материала из труднодоступных и нежелательных для открытой биопсии мест, возможность срочного интраоперационного (в том числе неоднократного) исследования малого объема материала. Это важно не только на этапе диагностики заболевания, но в ряде случаев и для динамического наблюдения за процессом лечения той или иной патологии. Основные характеристики цитологического метода исследования позволяют применять его в офтальмологии, в том числе в диагностике и мониторинге заболеваний передней поверхности глаза [7].

Цель настоящего исследования: провести анализ клеточного состава отпечатков конъюнктивы глазного яблока и оценить возможности цитоморфологического метода исследования в диагностике ССГ.

Материал и методы. В исследовании включены 60 пациентов, (55 женщин, 5 мужчин) в возрасте от 25 до 80 лет с клиническим диагнозом ССГ. Контрольную группу составили 12 человек без заболеваний глаза. Всем пациентам проведено комплексное обследование: оценка субъективного улучшения состояния по опроснику «Индекс поражения поверхности глаза» (Ocular Surface Disease Index, OSDI), пробы с окрашиванием флюоресцеином и лиссаминовым зеленым, определение времени разрыва слезной пленки (ВРСП) и тест Ширмера для выявления положительной динамики объективных показателей [8].

Материал для цитологического исследования получали малоинвазивным, не требующим предварительной анестезии импрессионным методом. Суть метода заключается в исследовании отпечатков с эпителия, полученных с помощью миллипорового фильтра. Для оценки состояния эпителия бульбарной и тарзальной конъюнктивы глазного яблока, в том числе и бокаловидных клеток, нами был применен модифицированный метод импрессионной цитологии [9].

При этом исследовании между отведенным нижним веком и глазным яблоком помещалась полоска миллипорового фильтра стандартных размеров: 5х5 мм. Затем проводилось соприкосновение нижнего века с поверхностью глазного яблока с небольшим давлением. При следующем отведении нижнего века извлекалась полоска фильтра с «отпечатанными» на обеих ее поверхностях эпителиальными клетками как бульбарной, так и тарзальной конъюнктивы. Затем обе поверхности фильтра отпечатывали на обезжиренном предметном стекле.

Предметные стекла с отпечатками высушивали на воздухе, окрашивали азур-эозином по Паппенгейму и исследовали при световой микроскопии, увеличение х100, х400. В представленной работе анализировали только информативный цитологический материал.

Результаты и обсуждение. Известно, что эпителий конъюнктивы состоит из трех слоев клеток: глубокого

слоя цилиндрических клеток, среднего слоя полигональных клеток, поверхностного слоя плоских или низких кубических клеток и рассеянных по поверхности бокаловидных клеток, секретирующих слизь [10].

Анализ исследованных цитогрaмм показал, что в материале с конъюнктивы могут быть обнаружены несколько разновидностей клеток:

1 – незрелые эпителиальные клетки (изолированные, в группах до 10, в скоплениях более 10 клеток) (рис. 1, см. обложку);

2 – зрелые (функционально активные) эпителиальные клетки цилиндрической формы, так называемые бокаловидные клетки (разрозненные 0-1-3 в поле зрения, в группах до 10 клеток, в скоплениях более 10 клеток) (рис. 2, см. обложку);

3 – уплощенные эпителиальные клетки (функционально неактивные) (разрозненные 0-1-3 в поле зрения, в группах до 10 клеток, в скоплениях более 10 клеток) (рис. 3, см. обложку);

4 – безъядерные клетки плоского эпителия (чешуйки, гиперкератоциты) (разрозненные 0-1-3 в поле зрения, в группах до 10, в скоплениях более 10 клеток) (рис. 4, см. обложку);

5 – поверхностные клетки и чешуйки плоского эпителия (рис. 5, см. обложку);

6 – лейкоциты (нейтрофилы, гистиоциты, лимфоциты);

7 – бактерии.

При анализе результатов установлено, что отпечатки тарзальной и бульбарной конъюнктивы всех пациентов без клинических признаков синдрома сухого глаза были представлены:

1) группами (до 10 клеток) и скоплениями (более 10 клеток) эпителиальных клеток кубической формы размером 15-20 мкм (см.рис. 1). Клетки плотно прилегают друг к другу, ядра расположены центрально, цитоплазма в виде узкого базофильного ободка;

2) разрозненными и в группах бокаловидными клетками (см. рис. 2);

3) незначительным количеством поверхностных клеток и чешуек плоского эпителия (единичные в препарате) (разрозненные и в группах) (см. рис. 5).

Клеточный состав цитологических препаратов отпечатков с конъюнктивы пациентов с клиническими признаками ССГ можно разделить на два варианта. Основным компонентом первого варианта были чешуйки плоского эпителия (гиперкератоциты) (см. рис. 4). Этот вариант цитогрaмм установлен у 19 (32%) обследованных пациентов. Для второго варианта (41 (68% пациентов) были характерны группы и скопления уплощенных эпителиальных клеток (см.рис. 3), гиперкератоциты (в группах и скоплениях) и небольшое количество бокаловидных клеток (до пяти в препарате).

Проведенные исследования показали, что при ССГ в эпителии конъюнктивы отсутствуют функционально активные бокаловидные клетки, секретирующие слезу, или значительно уменьшается их количество. Также не выявляются признаки пролиферации незрелых эпителиальных клеток, а, напротив, активизируются процессы клеточной гибели, о чем свидетельствуют гиперкератоциты. Происходит корнификация (кератинизация) эпителия конъюнктивы. Гиперкератоциты - тупик эволюции эпителиальной клетки, один из вариантов клеточной гибели [11].

Метод импрессионной цитологии может быть использован не только для диагностики ССГ, но и для про-

ведения контроля за эффективностью проводимого лечения с возможной его коррекцией вплоть до получения конечного результата лечения. Таким образом, применение в практике способа импрессионной цитологии позволяет: 1) стандартизировать условия взятия клеточного материала с тарзальной и бульбарной конъюнктивы; 2) повысить точность диагностики ССГ; 3) неинвазивно и объективно в динамике проводить оценку муцинпродуцирующей активности эпителиальной выстилки.

Проведенные исследования еще раз показали, что морфология, будучи фундаментальной наукой, остается неотъемлемой частью клинико-экспериментального исследовательского направления в медицине и, в частности, в офтальмологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бржевский В.В., Егорова Г.Б., Егоров Е.А. Синдром «сухого глаза» и заболевания глазной поверхности. Клиника, диагностика, лечение. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
2. Егоров Е.А., Романова Т.Б., Рыбакова Е.Г., Оганезова Ж.Г. Вторичный синдром «сухого глаза»: современный взгляд на проблему. *РМЖ. Клиническая офтальмология*. 2017; 2:106 – 10.
3. Брежнев А.Ю., Баранов В.И., Петров С.Ю. Псевдоэксфолиативный синдром как фактор риска развития синдрома «сухого глаза». *Клиническая офтальмология*. 2016; 16 (1): 30 – 4.
4. Бубнова И.А., Егорова Г.Б., Митичкина Т.С., Аверич В.В., Фетцер Е.И. Вторичный синдром «сухого глаза» после кераторефракционных вмешательств и подходы к лечению и профилактике. *Вестник офтальмологии*. 2018; 5 (ч. 2): 294 – 8.
5. Бржевский В.В., Сомов Е.Е. Роговично-конъюнктивальный кератоз (диагностика, клиника, лечение); издание второе, частично переработанное и дополненное. СПб.: Издательство «Левша»; 2003.
6. Larkin H. Dry-eye tests for diagnostic technologies to watch in the next five years. 12th EURETINA Congress and the XXX Congress of the ESCRS Poster. Milan, Italy 8-12 September; 2012.
7. Krader C.G. Dry eye screening. Non-invasive meibography system performs well compared with slit-lamp-based device. 12th EURETINA Congress and the XXX Congress of the ESCRS Poster. Milan, Italy 8-12 September, 2012.
8. Walt J., Rowe M., Stern K. Evaluating the functional impact of dry eye: the Ocular Surface Disease Index. *Drug Inf J*. 1997; 31: 1436.

9. Егорова Г.Б., Федоров А.А., Митичкина Т.С. Возможности метода импрессионной цитологии в диагностике и оценке эффективности медикаментозной коррекции синдрома сухого глаза при ношении контактных линз. *Вестник офтальмологии*. 2012; 128 (1): 33-5.
10. Хэм А., Кормак Д. Гистология. Пер. с англ. М.: Мир; 1983.
11. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 1–3.

REFERENCES

1. Brzhevsky V.V., Egorova G.B., Egorov E. A. Dry eye syndrome and ocular surface disease. Clinic, diagnosis, treatment. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
2. Egorov E. A., Romanova T. B., Rybakova E. G., Oganезова J.G. Secondary dry eye syndrome: a modern view. *Klinicheskaya oftal'mologiya*. 2017; 2: 106–10. (in Russian)
3. Brezhnev A.Yu., Baranov V.I., Petrov S.Yu. Pseudoexfoliation syndrome as risk factor for «dry eye» syndrome. *Klinicheskaya oftal'mologiya* 2016; 16 (1): 30 – 34. (in Russian)
4. Bubnova I.A., Egorova G.B., Mitichkina T.S., Averich V.V., Fettser E.I. Secondary dry eye syndrome after keratorefractive surgeries and approaches to its treatment and prevention. *Vestnik oftal'mologii*. 2018; 5 (ч. 2): 294 – 8. (in Russian)
5. Brzhevsky V.V., Somov E.E. Corneal-conjunctival xerosis (diagnosis, clinic, treatment); second edition, partially revised and enlarged. St.Petersburg: Publisher «Levsha»; 2003. (in Russian)
6. Larkin H. Dry-eye tests for diagnostic technologies to watch in the next five years. 12th EURETINA Congress and the XXX Congress of the ESCRS Poster. Milan, Italy 8-12 September; 2012.
7. Krader C.G. Dry eye screening. Non-invasive meibography system performs well compared with slit-lamp-based device. 12th EURETINA Congress and the XXX Congress of the ESCRS Poster. Milan, Italy 8-12 September; 2012.
8. Walt J., Rowe M., Stern K. Evaluating the functional impact of dry eye: the Ocular Surface Disease Index. *Drug Inf J*. 1997; 31: 1436.
9. Egorova G.B., Fedorov A.A., Mitichkina T.S. The possibilities of the method of impression cytology in the diagnosis and evaluation of the effectiveness of medical correction of dry eye syndrome when wearing contact lenses. *Vestnik oftal'mologii*. 2012; 128 (1): 33 – 5. (in Russian)
10. Khem A., Kormak D. Histology. Moscow: Mir; 1983. (in Russian)
11. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 1– 3.

Поступила 21.04.19
Принята к печати 21.05.19

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Арзуманян В. Г.¹, Ильина И. В.², Васильева Г. В.¹, Магаршак О. О.¹, Миронов А. Ю.³

НОВОЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДЕРМАТОФИТНЫХ ГРИБОВ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, 105064, Москва, Россия;

²Институт медико-социальных технологий ФГБОУ ВПО МГУП Министерства образования и науки РФ, кафедра кожных и венерических болезней с курсом косметологии, 125080, Москва, Россия;

³ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва

Роль бактерий рода *Staphylococcus* spp., дрожжевых грибов родов *Candida* spp., *Malassezia* spp. при атопическом дерматите (АД) у детей хорошо известна, однако, практически отсутствуют данные о распространённости дерматофитных грибов при этой нозологии. Целью работы явилась оценка результатов обследования детей с АД на носительство дерматофитных грибов.

Группа обследованных состояла из 44 детей в возрасте от 1 до 18 лет с диагностированным АД в стадии обострения. Для проведения исследования разработан безболезненный для пациента и безопасный для персонала способ забора проб, заключающийся в растирании лichenифицированных участков кожи стерильным тупфером, смоченным фосфатным буферным раствором с Твином 80, и последующим отделением кожных чешуек методом центрифугирования.

При исследовании гидролизированных чешуек использовано максимальное увеличение микроскопа (x1750), зарегистрированы различные формы дерматофитных и дрожжевых грибов. Споры дерматофитных грибов встречались с частотой 67,0%, дерматофитный мицелий – с частотой 18,3%. Корреляции между частотами обнаружения дерматофитных спор и дерматофитного мицелия практически не отмечено (коэффициент Пирсона $r=0,236$), ни разу мицелий не обнаружен без спор, а споры в 73,3% случаев обнаруживались без мицелия. Дрожжевые споры выявлены у 45,2% обследованных, что согласуется с данными, полученными ранее культуральным методом, дрожжевой мицелий – у 3,5% пациентов.

Впервые установлена частая встречаемость дерматофитных грибов на поражённых участках кожи при АД, причём в подавляющем большинстве случаев в виде спор. Полученные результаты важны для клинической диагностики, поскольку от них зависит выбор проводимой терапии.

Ключевые слова: дерматофитные грибы; микроскопия; атопический дерматит; клиническая лабораторная диагностика.

Для цитирования: Арзуманян В.Г., Ильина И.В., Васильева Г.В., Магаршак О.О., Миронов А.Ю., Новое в клинической лабораторной диагностике дерматофитных грибов у детей с атопическим дерматитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 351-353. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2-19-64-6-351-353>

Arzumanyan V.G.¹, Il'ina I.V.², Vasilieva G.V.¹, Magarshak O.O.¹, Mironov A.Yu.³

NEW IN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS OF DERMATOPHYTE FUNGI IN CHILDREN WITH ATOPIC DERMATITIS

¹ Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;

² Institute of Medical and Social Technologies, 125080, Moscow, Russia;

³ G. N. Gabrichesky research institute for epidemiology & microbiology, 125212, Moscow

Role of bacteria *Staphylococcus* spp., yeasts of *Candida* spp., *Malassezia* spp. genera in pathogenesis of atopic dermatitis (AD) in infant patients is well known. However, no data concerning the incidence of dermatophytes in such disease entity were obtained. Aim of the study was estimation of dermatophytes carriage in children with AD.

Group of patients involved 44 persons 1 to 18 years old with clinically diagnosed acute AD. Especially for the study a method of skin scales collection was created: painless for patients and safe for medical personnel. The method is based on following stages – rubbing of lichenified skin zones with sterile swab which was preliminary saturated with phosphate/Tween 80 buffer pH 7,9 and centrifuging of the suspension for sedimentation of skin scales.

Microscopic examination of hydrolyzed scales was carried out at maximal magnification x1750, at that different dermatophyte and yeast fungal forms were registered. Spores of dermatophyte fungi were detected with 67,0% frequency, whereas dermatophyte mycelium - with 18,3% frequency. No correlation between dermatophyte spores and mycelium was found out (Pirson's coefficient $r=0,236$), however no mycelium without spores was detected, but in 73,3% of cases spores occurred without mycelium. Yeast spores were detected in 45,2% of patients – this fact is agreed with data obtained earlier by the seeding method, but yeast mycelium was found out in 3,5% of patients.

Therefore frequent occurrence of dermatophyte fungi on the skin of AD infants is revealed for the first time. At that dermatophytes were found out to exist more often in the form of spores. These results are important for choice of the further therapy.

Key words: dermatophyte; microscopy; atopic dermatitis; clinical laboratory diagnostics.

For correspondence: Arzumanyan V.G., Sc.D., professor, head of laboratory of fungal and bacterial physiology; e-mail: veraar@mail.ru

For citation: Arzumanyan V. G., Il'ina I. V., Vasilieva G. V., Magarshak O. O., Mironov A. Yu. New in clinical laboratory diagnostics dermatophyte fungi in children with atopic dermatitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (6): 351-353. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-351-353>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 21.01.2019
Accepted 20.02.2019

Введение. В патогенезе атопического дерматита (АД) немаловажную роль играют микробные аллергены, среди которых часто упоминаются аллергены дрожжевых и плесневых грибов [1-3], значительно реже – дерматофитов [4-7]. Исследования, посвященные взаимосвязи атопии и дерматофитии, проводились на небольших контингентах взрослых пациентов (всего 68 пациентов за все годы), тогда как исследований, посвященных дерматофитии у детей с АД не обнаружено. Сообщалось о частоте обнаружения различных родов дрожжевых грибов при АД [3]. Эти данные получены в результате посевов методом отпечатков или смывов на селективные среды и идентификации грибов классическими микробиологическими методами. Обычно врач-аллерголог направляет ребенка с АД именно на такое исследование кожной микрофлоры, хотя при этом посевы на дерматофитные грибы не производятся. Причиной этого является, в основном, длительность их культивирования и идентификации. В данном случае в помощь врачу служит микроскопия, результаты которой в большой степени обусловлены квалификацией персонала и качеством микроскопа.

Цель работы - усовершенствование методов забора материала и микроскопии, оценка результатов обследования детей с АД на носительство дрожжевых и дерматофитных грибов.

Материал и методы. Обследована группа из 44 детей в возрасте от 1 до 18 лет (медиана 10 лет) с диагностированным АД в стадии обострения. Сбор кожных чешуй производили с лихенифицированных участков кожи следующим образом. Готовили раствор 0,1 М фосфатного буфера с Твином 80, pH 7,9; к 100 мл дистиллированной воды добавляли 1,96 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ и 0,1 мл Твина 80, pH доводили до 7,9 с помощью 10% раствора КОН, стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин. В пробирку Эппендорф вносили 0,7 мл данного буферного раствора, в который обмакивали стерильный тупфер (палочку с ватиком), отжимали о стенку пробирки для удаления излишков жидкости. Увлажненным тупфером растирали пораженный участок кожи, после чего тупфер промывали в той же пробирке, отжимали, процедуру повторяли 3-4 раза до тех пор, пока суспензия в пробирке не становилась очень мутной. Полученную суспензию центрифугировали со скоростью 15000 об/мин в течение 5 мин, супернатант удаляли, полученный осадок заливали раствором едкого кали с диметилсульфоксидом, оставляли на ночь при комнатной температуре [8].

Полученный гомогенат микроскопировали при суммарном увеличении в 1750 раз (рис. 1, а – з, см.обложку). Обилие обнаруженных морфотипов грибов в среднем в 10 полях зрения выражали в баллах: 0 – отсутствие; 1 балл – наличие в среднем 1-2 клеток в поле зре-

ния; 2 балла – от 3 до 5; 3 балла – 6 и выше.

Расчет коэффициентов корреляции Пирсона проводили с помощью программы Microsoft Excell. Расчет коэффициентов Манна-Уитни, свидетельствующих о наличии/отсутствии значимости различий между показателями, проводили с помощью автоматической программы [9].

Результаты. Результат по частоте носительства дрожжей (см. таблицу) согласуется с результатом, ранее полученным культуральным методом [3], обращает на себя внимание отсутствие дрожжевого мицелия. 43,2% детей являлись одновременно носителями и дрожжей и дерматофитов. Из 44 детей у 35 на коже обнаружены дерматофиты, причём у 11 человек – на локтевых сгибах и кистях, у 8 – на лице, у 6 – на подколенных ямках и стопах, у 4 – на груди и спине, у 4 – на волосистой поверхности головы, у 1 – на лобке и у 1 – за ухом. Корреляции между частотами обнаружения дерматофитных спор и дерматофитного мицелия практически не отмечено (коэффициент Пирсона $r=0,236$), ни разу мицелий не обнаружен без спор, споры в 73,3% случаев обнаруживались без мицелия. Достоверность различий между обилием (и частотой встречаемости) дерматофитных и дрожжевых спор лежит в области значимости по критерию Манна-Уитни: $0,01 \leq p \leq 0,05$. Возраст и пол пациентов не коррелировали с частотой обнаружения дерматофитных спор/ мицелия и дрожжевых спор/ мицелия (см. таблицу).

Обсуждение. О случаях обнаружения поверхностной трихофитии у детей в Московском регионе сообщалось ранее [10], рост заболеваемости авторы связывали с низким уровнем санитарно-просветительной работы, некачественной дезинфекцией спортивного инвентаря и др. Детей с АД можно небезосновательно считать группой риска при инфицировании не только *S. aureus* и дрожжами [11], но и дерматофитными грибами. Термин «атопико-дерматофитозный синдром» впервые введен для обозначения роли аллергенов дерматофитов в хроническом течении АД у взрослых пациентов [4]. Нам не удалось обнаружить работ, касающихся такого явления у детей. Проведение исследования в данном направлении имеет важное клиническое значение, поскольку от его результатов во многом может зависеть успех назначаемого лечения.

Важным моментом при работе с пациентами детско-

Обнаружение морфотипов микроорганизмов в чешуях кожи пациентов с атопическим дерматитом

Показатели носительства	Бактерии		Дерматофитные грибы		Дрожжевые грибы	
	кокки	палочки	мицелий	споры	мицелий	споры
Частота встречаемости, %	13,9	81,7	18,3	67,0	3,5	45,2
Обилие (баллы), ср. знач. $\pm$ ср. откл.	0,33 $\pm$ 0,57	2,47 $\pm$ 0,65	0,22 $\pm$ 0,36	1,87 $\pm$ 1,07	0,04 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,96
Корреляция показателя с полом пациентов	-0,083	-0,088	-0,047	-0,044	0,044	-0,058
Корреляция показателя с возрастом пациентов	-0,208	-0,102	0,138	-0,016	0,128	0,023

го возраста является наличие удобного, быстрого, безболезненного для пациента и безопасного для персонала способа забора проб. Традиционным методом отбора образцов кожных чешуй является соскоб, однако, его недостатки в данном случае совершенно очевидны. Нами разработан новый способ забора проб у детей с atopическим дерматитом, позволяющий быстро, безболезненно и качественно брать необходимое количество материала. Способ заключается в многократном смыве чешуй с поверхности кожи с помощью стерильного тупфера, периодически погружаемого в специальный буферный раствор, с последующим удалением водной фракции и обработкой фракции, содержащей клетки.

Другой важный момент – традиции микроскопии образцов кожи. Обычно диагноз «дерматофития» выставляют на основании наличия мицелиальных форм грибов. По нашему глубокому убеждению огромное значение имеет не только мицелий, но и споры, поскольку у диморфных грибов эти две формы являются лишь различными стадиями размножения [12]. В этой связи квалификация исследователя играет не последнюю роль, т. к. «узнавание» спор при их морфологическом разнообразии – процесс довольно сложный, ведь в монографиях и пособиях приведены в основном те морфотипы, которые образуются при культивировании грибов вне организма на питательных средах. Морфотипы грибов, встречающиеся в патологическом материале, разнообразнее тех, что имеют место при лабораторном культивировании. Большое значение имеет увеличение микроскопа. В подавляющем большинстве клинических лабораторий максимальное суммарное увеличение микроскопов составляет $\times 900$, тогда как в данной работе использован микроскоп с увеличением $\times 1750$, что значительно облегчило идентификацию грибов.

Из полученных результатов следует, что дерматофитные грибы на коже пациентов с АД встречаются чаще и в большем обилии, чем дрожжевые. Часто имеет место одновременное носительство дрожжевой и дерматофитной микробиоты. Локализация дерматофитов и дрожжей соответствует участкам с лихенифицированной кожей. Обращает на себя внимание высокая частота обнаружения спор дерматофитов при отсутствии мицелия (в 73,3% случаев). Это позволяет сделать вывод о высокой вероятности ложноотрицательных результатов при традиционной микроскопии.

Что касается бактериальной микробиоты, важно отметить, что частота обнаружения кокков на коже пациентов с АД при микроскопии значительно ниже, чем культуральным методом (14% против 95%) [11]; палочковидные бактерии, причём в высоком обилии, представлены, очевидно, родом *Propionibacterium* spp., о чём свидетельствуют с одной стороны размеры и форма обнаруживаемых клеток, с другой – данные литературы и собственные данные [13, 14].

Выводы:

1. Усовершенствован метод пробоподготовки материала кожных чешуй и последующей микроскопии.

2. Проведена оценка результатов обследования детей с АД на предмет носительства дрожжевых и дерматофитных грибов.

3. Установлена высокая частота обнаружения спор дерматофитных грибов наряду со спорами дрожжевых грибов в кожных чешуйках детей с АД.

4. Полученные результаты могут быть полезны в клинике, поскольку от них зависит выбор проводимой терапии.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории физиологии грибов и бактерий НИИВС им. И. И. Мечникова Артёмовой Т. А. и Бутовченко Л. М. за помощь при проведении исследований.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИР № 0525-2014-0042 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4 – 6, 8, 12, 14 см. REFERENCES)

1. Сергеев Ю.В., Иванов О.Л., Новиков Д.К., Караулов А.В., Сергеев А.Ю. Атопический дерматит: современная диагностика и лечение. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2001; 4: 39-63.
2. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В., Караулов А.В., Кудрявцева Е.В. Атопический дерматит: от патогенеза к диагностике. *Практическая пульмонология*. 2003; 4: 35-9.
3. Арзуманян В.Г. Дрожжевая микрофлора кожи и респираторного тракта при аллергических заболеваниях. Дисс. Москва; 2002.
7. Соколова Т.В., Малиарчук А.П., Газарян О.Л. Количественные критерии дифференциальной диагностики микозов крупных складок. *Успехи медицинской микологии*. 2015; XIV: 38-43.
9. Математические методы обработки данных (он-лайн расчёт) (источник: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html>)
10. Степанова Ж.В., Климова И.Я., Воробьева И.А. К вопросу о хронической трихофитии у детей. *Успехи медицинской микологии*. 2003; 2: 177-8.
11. Арзуманян В.Г., Зайцева Е.В., Кабаева Т.И., Темпер Р.М. Оценка стафилококковой и нелипофильной дрожжевой микрофлоры кожи у больных с кожной патологией при контактно-споровом посеве. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2004; 6: 3-6.
13. Нобл У.К. Микробиология кожи человека. М.: Медицина; 1986.

REFERENCES

1. Sergeev Y.V., Ivanov O.L., Novikov D.K., Sergeev A.Y. Atopic dermatitis: modern diagnostics and surgery. *Immunopatologia, allergologia, infectologia*. 2001; 4: 39-63. (in Russian)
2. Sergeev A.Y., Sergeev Y.V., Karaulov A.V., Kudriavtseva E.V. Atopic dermatitis: from pathogenesis to diagnostics. *Practicheskaia pulmonologia*. 2003; 4: 35-9. (in Russian)
3. Arzumanyan V.G. Yeast microflora of skin and respiratory tract in allergic diseases. Diss. Moscow; 2002. (in Russian)
4. Jones H.E. The atopic-dermatophytosis syndrome. *Acta Derm. Venerol.* (Stockh). 1980; 92:81-5.
5. Wilson B.B., Deuell B., Mills T.A. Atopic dermatitis associated with dermatophyte infection and Trichophyton hypersensitivity. *Cutis*. 1993; 51(3):191-2.
6. Klein P.A., Clark R.A., Nicol N.H. Acute infection with Trichophyton rubrum associated with flares of atopic dermatitis. *Cutis*. 1999; 63(3):171-2.
7. Sokolova T.V., Maliarchuk A.P., Gazarian O.L. Quantitative criteria of differential diagnostics of large body folds mycoses. *Uspekhi meditsinskoy mycologii*. 2015; XIV: 38-43. (in Russian)
8. Rebell G., Taplin D. Dermatophytes. Their recognition and identification. University of Miami Press. 1971.
9. Mathematical methods of data processing (on-line calculation). Available at: <https://www.psychol-ok.ru/lib/statistics.html> (in Russian)
10. Stepanova J.V., Klimova I.Y., Vorobieva I.A. About chronic trichophytia in children. *Uspekhi meditsinskoi mycologii*. 2003; 2: 177-8. (in Russian)
11. Arzumanyan V.G., Zaitseva E.V., Kabaeva T.I., Temper R.M. Evaluation of cutaneous staphylococcal and non-lipophilic yeast microflora in patients with skin diseases by contact method of seeding. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2004; 6: 3-6. (in Russian)
12. de Hoog G.S., Guarro J., eds. Atlas of Clinical Fungi. Baarn and Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 1995.
13. Nobl W.K. Microbiology of human skin [Mikrobiologiya kozhi cheloveka]. Moscow: Meditsina; 1986. (in Russian)
14. Arzumanyan V., Zaborova V., Globa A., Shmeleva O. Communities of Skin Propionic Bacteria: Cultivation and Antifungal Antagonistic Activity. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2016; 7: 266.

Поступила 21.01.19

Принята к печати 20.02.19

Чеканова Т.А.¹, Неталиева С.Ж.², Шпынов С.Н.³, Бабаева М.А.², Костарной А.В.¹

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РИККЕТСИОЗОВ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ НА ТЕРРИТОРИИ ВЫСОКОГО РИСКА ИНФИЦИРОВАНИЯ *RICKETTSIA CONORII* SUBSP. *CASPIA*

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Россия;

²ГБУЗ Астраханской области «Областная инфекционная клиническая больница имени А.М. Ничоги», 414011, Астрахань, Россия;

³ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск, Россия

Ретроспективно изучены 723 сыворотки крови 537 пациентов, госпитализированных в областную инфекционную больницу Астрахани в период высокой активности в регионе клещей рода *Rhipicephalus* (май-сентябрь 2015 г.), на наличие IgG/IgM к антигенам риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ). IgG и/или IgM к *Rickettsia conorii* выявлены в 145 сыворотках крови 130 пациентов, при этом антитела к *R. sibirica* (группоспецифические) – в 143 сыворотках из вышеуказанных 145. Антитела к *R. conorii* выявлены в сыворотках крови 71,4% пациентов с предварительным диагнозом «астраханская пятнистая лихорадка» (АПЛ), 28,4% пациентов с диагнозом «острая респираторная вирусная инфекция», 19,1% с диагнозом «вирусная инфекция неясной этиологии» и 40% больных с симптомами аденовирусной инфекции (АВИ). Острый риккетсиоз, с высокой вероятностью – астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ), серологически обоснован для 71 пациента. Дана оценка срокам выявления IgM/IgG к *R. conorii* и их динамики в сыворотках крови серопозитивных к антигенам риккетсий группы КПЛ пациентов с различными предварительными диагнозами. У пациентов с симптомами АВИ антитела класса М к *R. conorii* выявляли на более позднем сроке, по сравнению с другими группами. На территории с высоким риском инфицирования *R. conorii* subsp. *caspia* следует дифференцировать выявляемые в сыворотках крови специфические антитела на диагностические и анамнестические. Требуется изучение причин серонегативности при отсутствии молекулярно-биологических маркеров приблизительно в трети случаев у пациентов с клиническими признаками, характерными для АПЛ, а также совершенствование препаратов и алгоритмов диагностики риккетсиозов группы КПЛ.

Ключевые слова: астраханская пятнистая лихорадка; риккетсиозы группы клещевой пятнистой лихорадки; *Rickettsia conorii*; иммуноферментный анализ; IgG и IgM.

Для цитирования: Чеканова Т.А., Неталиева С.Ж., Шпынов С.Н., Бабаева М.А., Костарной А.В. Ретроспективная серологическая диагностика риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки на территории высокого риска *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 354-359

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-354-359>

Chekanova T.A.¹, Netalieva S.Zh.², Shpynov S.N.³, Babaeva M.A.², Kostarnoy A.V.¹

RETROSPECTIVE SEROLOGICAL DIAGNOSTICS OF SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIOSES IN HIGH RISK AREAS OF *RICKETTSIA CONORII* SUBSP. *CASPIA* INFECTION

¹N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia;

²A.M. Nichogi Regional Infectious Clinical Hospital, 414011, Astrakhan, Russia;

³Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia

723 blood sera from 537 patients of Regional Infectious Clinical Hospital, Astrakhan were obtained during high activity period of *Rhipicephalus* ticks (May-September 2015) and retrospectively studied for IgG/IgM to antigen of spotted fever group (SFG) *Rickettsia*. IgG and/or IgM to *Rickettsia conorii* were detected in 145 sera from 130 patients, and antibodies to *R. sibirica* (group-specific) were detected in 143 sera from 145. Antibodies to *R. conorii* were detected for 71,4% patients with Astrakhan spotted fever (ASF), for 28,4% patients with acute respiratory viral infection, for 19,1% patients with infection of unspecified etiology and for 40% patients having symptoms of an adenovirus infection. Acute rickettsiosis, provably ASF, is serologically validated for 71 patients. Dynamic of IgM/IgG to *R. conorii* in sera of patients having different preliminary diagnoses is discussed. IgM to *R. conorii* in sera of patients having adenovirus infection symptoms were detected at a later time as compared with others. For regions of high risk of *R. conorii* subsp. *caspia* infection the differentiation of diagnostic and anamnestic specific antibodies is very important. The absence of serological and molecular biological markers in third of patients with ASF symptoms is necessary to study. Preparations and algorithms for diagnosis of SFG rickettsioses are needed to improve.

Key words: Astrakhan spotted fever; spotted fever group rickettsioses; *Rickettsia conorii*; ELISA; IgG and IgM.

For citation: Chekanova T.A., Netalieva S.Zh., Shpynov S.N., Babaeva M.A., Kostarnoy A.V. Retrospective serological diagnostics of spotted fever group rickettsioses in high risk areas of *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 354-359 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-354-359>

For correspondence: Chekanova T.A., PhD in Biology, Senior Researcher; e-mail: tchekanova74@mail.ru

Information about authors:

Chekanova T.A. <http://orcid.org/0000-0003-2532-0054>

Shpynov S.N. <https://orcid.org/0000-0002-4550-3459>

Kostarnoy A.V. <https://orcid.org/0000-0002-9080-6221>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 05.05.2019

Accepted 07.05.2019

Астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ) – острая зоонозная инфекция, возбудителем которой является *Rickettsia conorii*, подвид *caspia* из группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ). АПЛ регистрировалась в Астраханской области с 70-х годов XX века как «вирусная экзантема неясной этиологии» с клиническими проявлениями, характерными для средиземноморской (марсельской) пятнистой лихорадки, спустя 20 лет доказана её риккетсиальная этиология. Штаммы *R. conorii* subsp. *caspia* выделены из крови больных, гемолимфы клещей *Rhipicephalus pumilio*, снятых с собак, кошек, ежей. Помимо трансмиссивного механизма передачи возбудителя возможен контактный, аэрогенный пути инфицирования посредством попадания гемолимфы раздавленного клеща/нимфы на конъюнктиву глаза, слизистую оболочку носа, при вдыхании инфицированного материала. АПЛ с острым началом, высокой температурой и макулопапулезной (розеолёзно-пятнистой), реже с геморрагическими проявлениями сыпью регистрируется, как правило, в весенне-осенний период, приходящийся на сроки активного паразитирования половозрелых клещей рода *Rhipicephalus* и их нимф [1-4]. Согласно данным Роспотребнадзора заболеваемость АПЛ, регистрация которой как отдельной нозологической формы риккетсиоза ведётся с 2013 года, не имеет тенденции к снижению.

Ведущая роль в диагностике АПЛ принадлежит клинко-эпидемиологическим данным. Для её верификации от ряда других инфекций со сходными клиническими симптомами необходимо лабораторное подтверждение.

Цель работы – ретроспективное исследование наличия специфических IgG и IgM к антигенам риккетсий группы КПЛ в сыворотках крови пациентов, проживающих в регионе с высоким уровнем риска инфицирования *R. conorii* subsp. *caspia* и госпитализированных с различными направительными (первичными) диагнозами в инфекционную больницу в сезон активности клещей рода *Rhipicephalus*.

Материал и методы. В мае-сентябре 2015 г. получены 723 сыворотки крови от 537 пациентов, госпитализированных в ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги», из которых 145 несовершеннолетних (средний возраст $7,3 \pm 5,0$) и 392 взрослых (средний возраст $43,3 \pm 16,5$). Лихорадка являлась ведущим клиническим симптомом у большинства пациентов. По совокупности клинко-эпидемиологических данных предварительный диагноз «АПЛ» поставлен 28 пациентам (5,2%). 67 пациентов (12,5%) имели клиническую картину, характерную для острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ). У 52 госпитализированных лиц (9,7%) отмечен симптомокомплекс, характерный для аденовирусной инфекции (АВИ). Прочие направительные диагнозы (острая

кишечная инфекция, вирусный гепатит, инфекционный мононуклеоз, серозный менингит, коксиеллез) составили 5,2% случаев (28 пациентов). 362 пациентам (67,4%) предварительный диагноз сформулирован как «вирусная инфекция неутонченной этиологии» (ВИНЭ).

От 363 больных на $6,7 \pm 3,4$ день с начала регистрации клинических симптомов получены сыворотки крови и от 174 пациентов парные сыворотки: первый образец получен на $6,5 \pm 2,8$ день болезни, приходящийся, как правило, на начало госпитализации; второй – на $10,5 \pm 3,5$ день; у 10 пациентов на $12,8 \pm 3,5$ день с начала проявления клинических симптомов дополнительно проведён третий забор крови с целью получения сыворотки. Такие временные интервалы забора крови для получения парных сывороток обусловлены необходимостью исключения ряда острых заболеваний арбовирусной/флавивирусной этиологии. Сыворотки крови хранились при $-18-20^\circ\text{C}$. В дальнейшем они исследованы на наличие антител IgM и IgG к антигенам риккетсий группы КПЛ с применением разработанных в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» экспериментальных иммуноферментных тест-систем на основе инаktivированных цельнорастворимых/растворимых антигенов *R. conorii* и *R. sibirica* subsp. *sibirica* (штамм «Нецветаев»), накопление которых проводилось в овокультурах (желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов).

На первом этапе проводили скрининг в ИФА сывороток крови в начальном разведении 1: 40 с целью исследования на наличие IgG и 1: 20 для выявления IgM к *R. conorii* с определением конечных титров в позитивных образцах. Поскольку риккетсиальные антигены, полученные из овокультур, содержат примеси последних, а в исследуемых образцах встречаются перекрестно-реагирующие с антигенами тканей куриных эмбрионов антитела (аллергия, повышенный уровень антител при ряде заболеваний), для повышения специфичности экспериментальных тест-систем разработан раствор для разведения образцов (РРО), позволяющий сократить количество ложноположительных реакций. Образцы, показавшие положительный результат с *R. conorii*, дополнительно исследованы в ИФА на наличие антител к контрольному антигену, представляющему собой гомогенизат стенок желточного мешка незараженных риккетсиями развивающихся куриных эмбрионов. При регистрации положительной иммунореактивности исследуемого образца с контрольным антигеном при использовании вышеупомянутого РРО, результаты ИФА на наличие антител к *R. conorii* не учитывались. Серопозитивные к *R. conorii* образцы исследовали на наличие IgG и IgM к *R. sibirica* с оценкой их конечных титров.

В 2015 г. в клинко-диагностической лаборатории инфекционной больницы избирательно проводились молекулярно-биологические исследования на наличие

ДНК *R. conorii* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в лейкоцитарном осадке крови пациентов с подозрением на АПЛ с помощью экспериментального набора реагентов «АмплиСенс®Rickettsia conorii-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, набор зарегистрирован в 2018 г.). Молекулярно-биологические исследования носили научно-исследовательский характер.

Статистическую обработку данных проводили в Microsoft Excel 2003.

Результаты. Серодиагностика риккетсиозов группы КПЛ с использованием растворимых/цельнорастворимых антигенов является группоспецифической. При этом антиген *R. sibirica*, как более доступный в РФ препарат, нередко используется не только для лабораторной верификации сибирского клещевого тифа Северной Азии (клещевого риккетсиоза), но и других риккетсиозов группы КПЛ (например, марсельской лихорадки) [5]. Принимая это во внимание, проведён первичный скрининг сывороток в ИФА на наличие IgG/IgM к *R. conorii* с последующей оценкой в выявленных положительных образцах антител к *R. sibirica*. IgG и/или IgM к *R. conorii* выявлены в 145 сыворотках крови, принадлежавшим 130 пациентам. В числе 130 серопозитивных к *R. conorii* пациентов 47 несовершеннолетних, из них в возрасте 2-9 лет – 32. Антитела к *R. sibirica*, являющимися по сути группоспецифическими, обнаружены в 143 сыворотках из 145 упомянутых выше, при этом с превышением титра антител к *R. conorii* (включая двукратное) в 109 образцах от 96 лиц, одинаковым титром в 23 образцах, с более высоким титром антител к *R. sibirica* в 11 случаях. Показатель «иммунной прослойки» к *R. conorii* среди пациентов, включённых в данное исследование, может быть скорректирован, но ввиду отсутствия чёткой серологической дифференцировки внутри группы КПЛ это требует осторожности. Далее изложены только данные изучения в сыворотках крови антител к *R. conorii*.

Антитела IgM к *R. conorii* выявляли с 1 дня, приходящегося, как правило, на день госпитализации, до 22 дня наблюдения (в среднем, на $8,4 \pm 4,7$ день), IgG – с 1 по 30 день наблюдения (в среднем, на $8,1 \pm 4,1$ день).

Исследование парных сывороток крови от 174 пациентов позволило у 34 выявить антитела к *R. conorii*, причём у 10 лиц в образцах, полученных, в среднем, с недельным интервалом, определены IgG (титры 1:40-1:320) без изменения динамики, что может свидетельствовать о перенесённом ранее риккетсиозе. Сероconversion в парных сыворотках крови к *R. conorii* отмечена в 24 случаях из 174. У 13 пациентов после серонегативного результата тестирования в ИФА первой сыворотки во второй обнаружены антитела к *R. conorii*: в 6 случаях – IgM в титрах 1:40-1:80 на $8,8 \pm 2,1$ день с начала регистрации клинических симптомов; у 6 больных – IgG в начальных титрах 1:40 на $9,8 \pm 2,8$ день заболевания; у одного пациента на 14 день болезни одновременно детектированы антитела обоих классов (IgM – 1:40, IgG – 1:80). Первые негативные в ИФА сыворотки крови получены, в среднем, на $5,8 \pm 2,1$ день.

Опишем серологическую картину 11 пациентов, у которых отмечена динамика титров антител. У двух пациентов на 5-6 день с начала регистрации симптомов заболевания выявлены IgM к *R. conorii* в титрах 1:160, спустя 7-9 дней наряду с IgM (титры 1:40 и 1:80) детектировали IgG (титры 1:80 и 1:40, соответственно). У

трёх пациентов в первой сыворотке выявлены антитела обоих классов к *R. conorii* ($6,7 \pm 2,5$ день), во второй сыворотке крови ($11,0 \pm 3,9$ день) – только IgG, причём с увеличением титра в 4 раза. В парных сыворотках 6 пациентов выявлены только IgG к *R. conorii* с 4-кратной сероконверсией со средним временным интервалом $9,5 \pm 1,3$ день после первого забора крови.

Наибольший интерес представлял анализ ретроспективного изучения серопозитивности к *R. conorii* в группе 28 пациентов с предварительным диагнозом «АПЛ». В сыворотках крови 20 пациентов из 28 выявлены IgG и/или IgM к *R. conorii*. ДНК *R. conorii* в лейкоцитарном осадке крови пациентов обнаружена в 4 клинических образцах из 15 исследуемых (табл. 1).

В исследовании доступны парные сыворотки крови только двух пациентов, при этом изменение динамики антителообразования отмечено в обоих случаях, что свидетельствовало в пользу острого/текущего риккетсиоза. У одного пациента на 9 день заболевания выявлены специфические антитела IgG и IgM в титрах 1:80 (при одновременном обнаружении в лейкоцитарном осадке крови ДНК возбудителя), спустя 7 дней определены только IgG к *R. conorii* в титре 1:320, результат в ПЦР – отрицательный. Пациенту с предварительным диагнозом «ВИНЭ» (на 5 день болезни в экспериментальной тест-системе выявлены IgM к *R. conorii*, титр 1:40) на 15 день, на основании клинико-эпидемиологических данных, диагноз изменён на «АПЛ» (ретроспективный анализ в ИФА - определены IgM и IgG к *R. conorii*, ПЦР-исследование не проводилось).

В сыворотках крови 8 пациентов из 28 с предварительным диагнозом «АПЛ» не обнаружены IgM и IgG к *R. conorii*, при этом результат ПЦР отрицательный. Сыворотки крови получены, в среднем, на $4,5 \pm 1,3$ день заболевания, ПЦР-исследование проведено в эти же сроки.

Представлял интерес оценки средних сроков выявления IgM, IgG и суммарных антител к *R. conorii* в сыворотках крови серопозитивных к антигенам риккетсий группы КПЛ пациентов, госпитализированных в инфекционную больницу с различными первичными диагнозами (табл. 2).

Обсуждение. Серологическая диагностика риккетсиозов группы КПЛ в РФ, включая АПЛ, сопряжена с рядом трудностей по причине дефицита зарегистрированных в Росздравнадзоре диагностических препаратов соответствующего назначения. Для практического применения рекомендованы «Диагностикум риккетсиозный Сибирика для РСК» (ФГУП «НПО «Микроген») и иммуноферментные тест-системы для определения IgG/IgM к *R. conorii* производства Vircell, Испания. Нужно учитывать группоспецифический характер серологической диагностики риккетсиозов группы КПЛ по причине использования для диагностических целей растворимого (группоспецифического) антигена, что дополнительно подтвердили полученные данные.

При первичном обращении пациентов к врачу АПЛ часто расценивается как острое респираторное заболевание, лихорадка неясного генеза. Несмотря на наличие характерного симптомокомплекса, верный направительный диагноз ставится лишь в половине случаев [6]. Необходимо лабораторное подтверждение диагноза, однако факт наличия специфических антител в сыворотке крови пациента, особенно IgG, не является достаточным основанием для установления риккетсиальной этиологии заболевания. Классическим подтверждением острого риккетсиоза считается 4-кратная сероконверсия спец-

Таблица 1

Изучение в ИФА и ПЦР клинических образцов, полученных от пациентов с предварительным диагнозом «АПЛ»

№ образца	Срок забора крови со дня регистрации клинических симптомов	Результат тестирования сыворотки крови на наличие антител к <i>R. conorii</i>	Результат ПЦР на наличие ДНК <i>R. conorii</i> в лейкоцитарном осадке крови
5276	2	IgM	положительный
5035	7	IgG	положительный
5266*	9	IgG+IgM	положительный
5514*	16	IgG	отрицательный
6327	15	IgG+IgM	н.и.
4950	11	IgG	отрицательный
5422	1	IgG+IgM	н.и.
6416	8	IgG	отрицательный
6582	6	IgG+IgM	отрицательный
6720	12	IgG+IgM	н.и.
4834	2	IgG	отрицательный
6412	4	IgM	отрицательный
6490	2	IgG	отрицательный
6414	8	IgG+IgM	отрицательный
5369	2	IgG	отрицательный
6718	12	IgG	отрицательный
5367	3	IgM	положительный
5508	2	IgM	н.и.
5422	1	IgG+IgM	н.и.
6608	12	IgG+IgM	н.и.
6218	7	IgM	отрицательный

Примечание. * - парные сыворотки крови от одного пациента, н.и. – образец не исследован.

Таблица 2

Спектр антител к *R. conorii* в группах пациентов с различными предварительными клиническими диагнозами

Предварительный клинический диагноз	Количество пациентов, содержащих антитела к <i>R. conorii</i> (сроки выявления антител, дни)		
	IgM	IgM+IgG	IgG
АПЛ ($n=20$)	4 ($2,8\pm0,9$)	7 ($7,2\pm4,8$)	8 ($8,0\pm5,2$)
ОРВИ ($n=19$)	5 ($5,2\pm0,7$)	5 ($4,9\pm2,9$)	9 ($7,1\pm3,3$)
АВИ ($n=21$)	8 ($11,6\pm5,6$)	7 ($8,8\pm3,4$)	6 ($6,7\pm1,0$)
ВИНЭ ($n=69$)	17 ($7,9\pm2,9$)	9 ($6,8\pm1,8$)	43 ($7,8\pm4,3$)
Инфекционный мононуклеоз ($n=1$)	-	1 (15)	-
Всего пациентов ($n=130$)	34	29	66

Примечание. n – количество пациентов.

и физических антител в парных сыворотках крови, взятых с оптимальным временным интервалом. В пользу острого риккетсиоза может свидетельствовать наличие в сыворотке крови ранних специфических IgM-антител.

Согласно полученным данным ретроспективного серологического анализа текущая риккетсиальная инфекция (вероятно, АПЛ) не исключена у 71 пациента (13,2% от числа госпитализированных в инфекционную больницу в период высокой активности клещей рода *Rhipicephalus*). В эту группу вошли:

– 20 пациентов с клиническими симптомами острого риккетсиоза – первичный диагноз «АПЛ», подтверждённый лабораторно,

– 24 пациента с отмеченной в парных сыворотках крови сероконверсией или изменением динамики титров специфических антител,

– 27 лиц, в сыворотке крови которых выявлены IgM или суммарные антитела к *R. conorii*.

Учитывая, что парные сыворотки получены, в среднем, с недельным интервалом, что может быть не всегда информативным для регистрации динамики титров специфических антител при риккетсиозах, вышеуказанные цифры не позволяют в полной мере отразить встречаемость случаев острого риккетсиоза (АПЛ) в структуре инфекционных больных эндемичного региона.

Отсутствие специфических антител у 8 пациентов

с клиническими признаками, характерными для АПЛ, может свидетельствовать о «серологическом окне», имеющем место в ранний период заболевания. В это время информативны молекулярно-биологические исследования, которые также не показали наличие ДНК возбудителя в лейкоцитарном осадке крови пациентов. Эффективность выявления ДНК риккетсий группы КПЛ значительно возрастает при использовании в качестве материала для исследования смывов с очагов первичных аффектов, возникающих на месте присасывания клеща [7, 8]. При АПЛ не всегда удается заметить первичный аффект, поскольку он выражен неярко, в ряде случаев и вовсе отсутствует, когда инфицирование произошло не в результате присасывания клеща, а при контактно-аэрогенном заражении. Ввиду отсутствия парных сывороток крови и других дополнительных сведений сделать окончательный вывод об этиологии заболевания упомянутых 8 пациентов, не представилось возможным. Наши данные согласуются с наблюдениями других авторов, отмечавшими феномен «серонегативности» приблизительно у трети пациентов с клиническими симптомами клещевого риккетсиоза, возбудителем которого является представитель группы КПЛ - *R. sibirica* [9].

Практически равнозначные сроки регистрации антител IgM и IgG, учтённые по всем серопозитивным образцам, могут иметь несколько объяснений. Во-первых, инкубационный период при АПЛ может варьировать и зависеть от возрастной категории, особенностей иммунного статуса пациента, инфицирующей дозы, пути инфицирования. Во-вторых, точный срок начала заболевания нередко сложно установить. Наибольший интерес представили результаты изучения сроков детекции специфических антител в группах серопозитивных к *R. conorii* пациентов с различными клиническими проявлениями или предварительными диагнозами (табл. 2).

У пациентов с первичным диагнозом «АПЛ», подтверждённым лабораторно, динамика антителообразования характерна для большинства первичных острых/текущих инфекционных заболеваний: вначале детектируется IgM, затем оба класса иммуноглобулинов, позже – IgG. В настоящем исследовании на 2,8±0,9 день в сыворотке крови таких пациентов определяли IgM к *R. conorii*, на 7,2±4,8 день – иммуноглобулины классов Ми G одновременно, на 8,0±5,2 день - IgG к *R. conorii*. Подобную сероконверсию, но менее выраженную, наблюдали в группе 19 пациентов с предварительным диагнозом «ОРВИ», однако IgM выявляли на более позднем сроке (5,2±0,7 день, $p<0,05$), и, вероятно, по причине отсутствия в это время сыпи у пациентов, АПЛ изначально не предполагалась. Короткий период наблюдения за этими пациентами не позволил сделать окончательные выводы в отношении их возможного заражения *R. conorii* subsp. *caspia*.

Средние сроки обнаружения IgG и/или IgM к *R. conorii* в крови пациентов с первичным диагнозом «ВИНЭ» были приблизительно одинаковыми. Скорее всего, большинство пациентов с наличием специфических IgG перенесли риккетсиоз ранее, выявленные антитела являются анамнестическими. В этой группе пациентов наблюдались случаи вероятного острого/текущего риккетсиоза с характерной для этого серологической картиной – наличие антител IgM к *R. conorii* в сочетании/без IgG или сероконверсия в парных сыворотках.

Отметим группу серопозитивных пациентов с предварительным диагнозом «АВИ», установленным, по ха-

рактерному для данной инфекции симптомокомплексу (конъюнктивит, острые катаральные явления, лихорадка). Антитела IgM к *R. conorii* в этой группе пациентов выявлены на более позднем, по сравнению с другими, сроке - 11,6±5,6 день со дня регистрации клинических симптомов. Риккетсиоз мог развиться после попадания гемолимфы заражённого клеща/нимфы на конъюнктиву глаза слизистую оболочку носа, приведшему к сходным с АВИ клиническим признакам, и, вероятно, при таком инфицировании в отличие от трансмиссивного (присасывание клеща), АПЛ имеет более длительный инкубационный период. Средние сроки регистрации специфических IgG к *R. conorii* в этой группе опережали IgM. Серологически такое возможно при рецидиве персистирующих инфекций или при повторном заражении. Клинические случаи повторного заражения риккетсиозами группы КПЛ не описаны. Мы не исключаем такую возможность, как и то, что повторное заболевание может протекать атипично, вероятно, в отсутствии характерной сыпи, что требует дальнейшего наблюдения и изучения.

Сопоставление результатов исследования 723 сывороток крови пациентов инфекционной больницы с данными ретроспективного анализа этого клинического материала в отношении выявления серологических маркёров Q лихорадки [10] показало, что в 7 образцах (3 пациента с диагнозом «ВИНЭ» и 4 с симптомами АВИ) наряду с IgM к *Coxiella burnetii* Пфазы выявлены IgM к *R. conorii*. Не исключено, что клещи рода *Rhipicephalus*, являющиеся переносчиками возбудителя *R. conorii* subsp. *caspia*, могли быть инфицированы коксииеллами Бернета или коксииеллоподобными микроорганизмами. Описана высокая встречаемость *Coxiella burnetii* в клещах *Rhipicephalus sanguineus*, снятых с домашних собак [11].

Проведённое ретроспективное исследование закономерно подтвердило высокий процент серопозитивных к антигенам риккетсий группы КПЛ пациентов, проживающих в эндемичном регионе и госпитализированных в сезон активности клещей рода *Rhipicephalus* с признаками острого инфекционного заболевания. Специфические IgG и/или IgM к *R. conorii* выявлены в 71,4% случаях среди пациентов с предварительным диагнозом «АПЛ», у 28,4% пациентов с направительным диагнозом «ОРВИ», 19,1% с диагнозом «ВИНЭ» и в сыворотках крови 40% пациентов с клиническими симптомами аденовирусной инфекции. Сопоставление наличия серологических и молекулярно-биологических маркёров с предварительными клиническими диагнозами свидетельствует о том, что эндемичный риккетсиоз (в частности, АПЛ) в начальном периоде/стадии разгара может иметь как характерную для него клиническую картину, так и протекать стерто или атипично. Последнее зависит от многих факторов, включая пути инфицирования (присасывание клеща, контактный или аэрогенный пути передачи).

Для подтверждения текущего заболевания риккетсиальной этиологии в регионах с высоким риском инфицирования *R. conorii* subsp. *caspia* представляется целесообразным дифференцировать диагностические и анамнестические специфические антитела по оценке динамики их титров в парных сыворотках, полученных с оптимальным временным интервалом (желательно, не менее 2 нед), либо альтернативным методом, например, определением индекса avidности специфических антител IgG к антигенам риккетсий группы КПЛ при

их наличии. Требуется изучение причин серонегативности при отсутствии молекулярно-биологических маркёров приблизительно в трети случаев у пациентов с клиническими признаками, характерными для АПЛ. Не вызывает сомнения необходимость дальнейшего совершенствования препаратов и алгоритмов диагностики риккетсиозов группы КПЛ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 8, 10–11
см. REFERENCES)

1. Тарасевич И. В. Астраханская пятнистая лихорадка. М.: Медицина; 2002.
2. Тарасевич И. В. Современное представление о риккетсиозах. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2005; 7 (2): 119–28.
3. Гафарова М. Т., Вербенетс Е. А., Ачкасова Т. А., Шмойлов Д. К., Мидикари А. С. Эпидемиология и клинические особенности марсельской лихорадки в Крыму. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2017, 2 (19): 61–6.
4. Уголева С. В., Буркин А. В., Шабалина С. В., Семина Н. А. Клинико-эпидемиологические аспекты астраханской риккетсиозной лихорадки. *Инфекционные болезни*. 2008, 6(1): 35–40.
5. Карань Л. С., Мокрецова Е. В., Щучинова Л. Д., Неталиева С. Ж., Григорьева Я. Е., Федорова М. В. и др. Сравнительный анализ эффективности выявления ДНК риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок в разных видах клинического материала и возможность видовой идентификации возбудителя методом ПЦР. *Инфекционные болезни*. 2015; 13(2): 25–9.
6. Рудаков Н. В., Абрамова Н. В., Штрек С. В., Шаламова Е. В., Пенневская Н. А., Рудакова С. А. и др. Клинико-лабораторная диагностика клещевых риккетсиозов на территории низкого риска инфицирования *Rickettsia sibirica*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(11): 717–21.
7. Чеканова Т. А., Шпынов С. Н., Неталиева С. Ж., Бабаева М. А. Диагностическая значимость определения спектра антител к *Coxiella burnetii* в I и II фазовых состояниях. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2018; 23(4): 165–71.

REFERENCES

1. Tarasevich I. V., Makarova V. A., Fetisova N. F., Stepanov A. V., Miskarova E. D., Balaeva N., Raoult D. Astrakhan fever, a spotted fever rickettsiosis. *Lancet*. 1991; 337(8734): 172–3.
2. Tarasevich I. V., Makarova V. A., Fetisova N. F., Stepanov A. V., Miskarova E. D., Raoult D. Studies of a «new» rickettsiosis «Astrakhan» spotted fever. *Eur. J. Epidemiol.* 1991; 7 (3): 294–8.
3. Tarasevich I. V. Astrakhan spotted fever [Astrakhnskaya pyatnistaya likhoragka]. Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
4. Tarasevich I. V. A modern view of rickettsiosis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2005; 7 (2): 119–28. (in Russian)
5. Gafarova M. T., Verbenets E. A., Achkasova T. A., Shmoylov D. K., Midikari A. S. Epidemiology and clinical features of the Marseilles fever in the Crimea. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye*. 2017; 2 (19): 61–6. (in Russian)
6. Ugoleva S. V., Burkin A. V., Shabalina S. V., Semina N. A. Clinical and epidemiological aspects of Astrakhan rickettsial fever. *Infektsionnyye bolezni*. 2008; 6 (1): 35–40. (in Russian)
7. Karan L. S., Mokretsova E. V., Shchuchinova L. D., Netalieva S. Zh., Grigoryeva Ya. E., Fedorova M. V. et al. Comparative analysis of the efficiency of DNA detection of spotted fevers group *Rickettsia* in different types of clinical material and the possibility of specific identification of the pathogen by PCR. *Infektsionnyye bolezni*. 2015; 13 (2): 25–9. (in Russian)
8. Levin M. L., Snellgrove A. N., Zemtsova G. E. Comparative value of blood and skin samples for diagnosis of spotted fever group rickettsial infection in model animals. *Ticks and Tick Borne Dis.* 2016; 7(5): 1029–34.
9. Rudakov N. V., Abramova N. V., Shtrek S. V., Shalamova E. V., Penyevskaya N. A., Rudakova S. A. et al. Clinical and laboratory diagnosis of tick-borne rickettsioses in areas of low risk of infection *Rickettsia sibirica*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(11): 717–21. (in Russian)
10. Chekanova T. A., Shpynov S. N., Netalieva S. Zh., Babaeva M. A. The diagnostic significance of antibodies spectrum to *Coxiella burnetii* in I and II phases. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni*. 2018; 23 (4): 165–71. (in Russian)
11. Watanabe M., Nakao R., Amin-Babjee S. M., Maizatun A. M., Youn J. H., Qiu Y. et al. Molecular screening for *Rickettsia*, *Anaplasmataceae* and *Coxiella burnetii* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Malaysia. *Tropical Biomedicine*. 2015; 32(2): 390–8.

Поступила 05.05.19

Принята к печати 07.05.19

Косилова И.С.¹, Домотенко Л.В.¹, Фурсова Н.К.¹, Дентовская С.В.¹, Ершова М.Г.², Шепелин А.П.¹

ИСПЫТАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА «АГАР МЮЛЛЕРА-ХИНТОН II – ОБОЛЕНСК»

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, 142279, п. Оболенск, Московская обл., Россия;

²ГБУЗ Ярославской области «Инфекционная клиническая больница № 1», 150040, Ярославль, Россия

Приведены результаты сравнительных испытаний разработанной в ФБУН ГНЦ ПМБ питательной среды «Агар Мюллера-Хинтон II – Оболенск» и контрольной питательной среды «Mueller Hinton II Agar» импортного производства при определении чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) клинических штаммов бактерий с помощью диско-диффузионного метода и метода градиентной диффузии (Е-тесты), при оценке карбапенемазной активности штаммов, несущих гены карбапенемаз, в СИМ-тесте. Использованы 173 охарактеризованных штамма бактерий видов: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Photobacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., в том числе на наличие генов карбапенемаз OXA- и NDM-типов у грамотрицательных бактерий. Показана высокая степень совпадения результатов определения чувствительности к антимикробным препаратам для двух питательных сред. Показатель согласования категорий чувствительности штаммов к АМП (S, I, R) составил 98,2% для диско-диффузионного метода, 94,4-100% – для методов Е-тестов и СИМ-теста. В рамках Программы импортозамещения успешно разработана отечественная питательная среда «МХА II-Оболенск», удовлетворяющая требованиям ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы in vitro. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам».

Ключевые слова: питательная среда; агар Мюллера-Хинтон; диско-диффузионный метод; Е-тесты; СИМ-тест; грамотрицательные бактерии; грамположительные бактерии.

Для цитирования: Косилова И. С., Домотенко Л. В., Фурсова Н. К., Дентовская С. В., Ершова М. Г., Шепелин А. П. Испытания питательной среды отечественного производства «Агар Мюллера-Хинтон II – Оболенск». Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 360-367. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-360-367>

Kosilova I. S.¹, Domotenko L. V.¹, Fursova N. K.¹, Dentovskaya S. V.¹, Ershova M. G.², Shepelin A. P.¹

TRIALS OF THE DOMESTICALLY PRODUCED NUTRIENT MEDIUM «AGAR MULLER-HINTON II – OBOLENSK»

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, 142279, Obolensk, Moscow region, Russia;

²State Healthcare Institution of the Yaroslavl Region «Infectious Clinical Hospital No. 1», Yaroslavl, Russia

The results of the comparative tests of the «Agar Muller-Hinton II – Obolensk» nutrient medium developed in SRCAMB, Obolensk, and the control nutrient medium imported «Mueller Hinton II Agar» are presented in the study. The susceptibility of bacterial clinical strains to antimicrobial agents (AMP) was determined by the disc diffusion method and the method of gradient diffusion (E-test). The carbapenemase activity of the strains carrying the carbapenemase genes was determined by CIM-test. Total 173 characterized bacterial strains of species *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Photobacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. were used in the study, including producers of OXA- and NDM-types carbapenemases for gram negative bacteria. A high degree of coincidence of the results obtained on both nutrient media was shown. The consistency index of the strain sensitivity categories to AMPs (S, I, and R) was 98.2% for the disc diffusion method, and 94.4-100% – for E-test and CIM-test methods. Thus, within the framework of the Import Substitution Program, the domestic nutrient medium «MHA II-Obolensk» has been successfully developed. The nutrient medium meets the requirements of GOST R ISO 20776-2-2010 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices».

Key words: nutrient medium; Müller-Hinton agar; disc diffusion method; E-test; CIM-test; gram-negative bacteria; gram-positive bacteria.

For citation: Kosilova I. S., Domotenko L. V., Fursova N. K., Dentovskaya S. V., Ershova M. G., Shepelin A. P. Trials of the domestically produced nutrient medium «Agar Muller-Hinton II – Obolensk». Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 360-367 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-360-367>

For correspondence: Kosilova I.S., Junior Researcher, Laboratory of Nutrient Medium Development; e-mail: kosilova.irina@gmail.com

Information about authors:

Kosilova I.S., <http://orcid.org/0000-0003-4020-0894>
Domotenko L.V., <http://orcid.org/0000-0002-4785-6418>
Shepelin A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>

Fursova N.K., <https://orcid.org/0000-0001-6053-2621>
Dentovskaya S.V., <http://orcid.org/0000-0002-1996-8949>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 25.04.2019
Accepted 30.04.2019

Введение. Инфекционные болезни, вызываемые бактериальными патогенами, во всем мире представляют серьёзную угрозу здоровью и жизни людей. Ситуация усугубляется угрожающим распространением антибиотикорезистентных бактерий. По результатам масштабного исследования только в Европе и США каждый год до 50 тыс. жизней уносят инфекции, вызванные возбудителями, устойчивыми к лекарственной терапии, к 2050 г. прогнозируется рост летальных исходов до 10 млн. в год [1]. Устойчивость к антимикробным препаратам (АМП) – многогранная проблема, которая определяется многими взаимосвязанными факторами и требует слаженных действий от всего общества [2]. Ключевыми задачами, стоящими перед клиническими микробиологами, являются выделение, идентификация возбудителя инфекции и проведение тестов по определению чувствительности к АМП.

Для определения чувствительности микроорганизмов к АМП используют различные методы, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Наиболее часто применяемыми являются метод микроразведений в бульоне, диско-диффузионный метод, метод градиентной диффузии, так называемый метод Е-тестов. Метод микроразведений в бульоне, являющийся референтным, в основном, выполняется в автоматизированном варианте с использованием коммерческих автоматизированных анализаторов. Диско-диффузионный метод и метод градиентной диффузии относятся к «ручным» методам. Перечисленные методы обеспечивают качественную оценку чувствительности микроорганизмов к АМП с использованием трёх клинически ориентированных категорий: чувствительные, условно-резистентные, устойчивые (резистентные). Методы микроразведений и градиентной диффузии дают количественные результаты оценки чувствительности к АМП, выражаемые в значениях минимальной подавляющей концентрации (МПК). Все три метода преследуют одну цель, которая заключается в обеспечении надёжного прогнозирования эффективности лечения конкретного пациента с помощью конкретного АМП¹. Результаты тестирования должны быть надёжными и достоверными.

Достоверность результатов, получаемых при использовании методов определения чувствительности к АМП, зависит от качества питательных сред и реагентов, выбора метода тестирования и соблюдения стандартной процедуры исследования, регулярного проведения контроля качества и др. Для выполнения диско-диффузионного метода и метода градиентной диффузии используют агар Мюллера-Хинтона, к качеству которого предъявляют строгие требования. В стандартах Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), экспертных правилах European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» приведены данные интегрального метода оценки качества агара Мюллера-Хинтона, основанного на анализе соответствия размеров зон подавления роста АМП для контрольных штаммов целевым значениям или нахождения этих показателей в установленных пределах. Современные критерии пригодности питательной среды для оценки антимикробной

чувствительности изложены в новом международном стандарте ISO/TS 16782:2016 «Clinical laboratory testing – Criteria for acceptable lots of dehydrated Mueller-Hinton agar and broth for antimicrobial susceptibility testing», не имеющем пока российского аналога в виде ГОСТа. В документе содержатся физико-химические критерии, среди которых содержание марганца, цинка, тимидина, и интегральные критерии, а именно допустимые значения диаметров зон подавления роста контрольных штаммов для конкретных комбинаций микроорганизм – АМП, являющиеся своеобразными индикаторами качества питательной среды. Несоответствие критериям пригодности может быть причиной ошибок при определении чувствительности к АМП [3-5].

В ФБУН ГНЦ ПМБ разработана технология и организовано производство отечественного агара Мюллера-Хинтона II. Римская цифра II исторически введена в название питательной среды, свидетельствуя о том, что при её производстве все компоненты используются в сухом виде [6]. Со временем цифра из названия среды некоторых фирм-производителей исчезла и сохранилась только у BioMerieux, BD BBL, HiMedia.

Разработанная среда удовлетворяет современным требованиям нормативов EUCAST, Клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», Стандарта ISO/TS 16782:2016, в том числе по содержанию элементов кальция, магния, марганца, цинка, влияющих на результаты определения чувствительности микроорганизмов. Диаметры зон подавления роста всех использованных тест-штаммов соответствовали рекомендованным целевым значениям или незначительно отличались от них, находясь в рекомендованных диапазонах.

Цель исследования – оценить качество агара Мюллера-Хинтона II отечественного производства при определении чувствительности к АМП микроорганизмов, относящихся к различным видам и родам, включая новые, с помощью диско-диффузионного метода, метода градиентной диффузии, при выявлении карбапенемаз-продуцирующих штаммов грамотрицательных микроорганизмов с помощью CIM-теста.

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

Питательные среды. В работе использованы питательные среды «Агар Мюллера-Хинтона II» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия, РУ № РЗН 2017/5962) – далее по тексту «МХА II-Оболонск», в качестве контрольной среды – «Mueller Hinton II Agar» (Becton Dickinson, США) – далее по тексту «МХА II-BD».

Штаммы. В работе использованы охарактеризованные музейные штаммы грамотрицательных возбудителей внутрибольничных инфекций ($n=18$): *Klebsiella pneumoniae* ($n=8$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n=2$), *Acinetobacter baumannii* ($n=3$), *Proteus mirabilis* ($n=2$), *Serratia marcescens* ($n=1$), *Enterobacter aerogenes* ($n=1$), *Escherichia coli* ($n=1$); музейные штаммы нового патоген-

¹Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. Версия 2018-03.

на *Photorhabdus* spp. (n=8), клинические изоляты бактерий (n=147), включая *K. pneumoniae* (n=49), *A. baumannii* (n=49), *Staphylococcus aureus* (n=14), *Enterococcus* spp. (n=14), *E. coli* (n=12), *P. aeruginosa* (n=9).

Диски с АМП. При определении чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом использованы диски с 50 АМП (BD, США), относящиеся к 17 функциональным группам: *пенициллины*, включая пенициллины, защищенные ингибиторами β-лактамаз, (ампициллин, ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавулановая кислота, бензилпенициллин, карбенициллин, мециллинам, пиперациллин, пиперациллин/тазобактам, тикарциллин, тикарциллин/клавулановая кислота), *цефалоспорины* (цефуроксим, цефокситин, цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефоперазон/сульбактам, цефепим, цефтаролин), *монобактамы* (азтреонам), *карбапенемы* (эртапенем, меропенем, имипенем, дорипенем), *аминогликозиды* (канамицин, тобрамицин, гентамицин, амикацин, нетилимицин), *хинолоны/фторхинолоны* (налидиксовая кислота, норфлоксацин, офлоксацин, перфлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин), *макролиды* (эритромицин, кларитромицин, азитромицин), *тетрациклины* (тетрациклин, доксициклин, миноциклин, тигециклин), *липепептиды* (колистин, полимиксин), *гликопептиды* (ванкомицин), *рифамицины* (рифампицин), *линкозамиды* (клиндамицин), *сульфаниламиды* (триметоприм/сульфаметоксазол), *нитрофураны* (нитрофурантоин), *амфениколы* (хлорамфеникол), *фузидиевая кислота*.

Е-тесты. При определении чувствительности микроорганизмов методом градиентной диффузии использованы Е-тесты (BioMérieux, Франция) 13 наименований: амоксициллин 0,016-256 мг/л, ампициллин 0,016-256 мг/л, цефотаксим 0,016-256 мг/л, цефтазидим 0,016-256 мг/л, имипенем 0,002-32 мг/л, меропенем 0,002-32 мг/л, гентамицин 0,016-256 мг/л, стрептомицин 0,064-1024 мг/л, ципрофлоксацин 0,02-32 мг/л, левофлоксацин 0,002-32 мг/л, тетрациклин 0,016-256 мг/л, доксициклин 0,016-256 мг/л, хлорамфеникол 0,016-256 мг/л.

Диско-диффузионный метод. Чувствительность микроорганизмов к АМП определяли в соответствии с Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» и стандартами EUCAST (Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам)². Культивирование бактерий осуществляли при температуре 35°С в течение 18-20 ч, за исключением штаммов *Photorhabdus* spp., которые выращивали при двух температурах (25 и 37°С) в течение 18-20 ч (*P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US86, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US88, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* AU46, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* AU97, *P. asymbiotica* CbKj163, *P. luminescens* subsp. *luminescens* HbT) и в течение 42-44 ч (*P. luminescens* subsp. *akhurstii* FRG04, *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01T).

Диаметр зон подавления роста бактерий измеряли в мм, регистрируя клиническую категорию чувствительности: чувствительный (S), умеренно-резистентный (I), устойчивый (R) штамм. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с критериями, изложенными в клинических рекомендациях, за исключением резуль-

татов по тестированию *A. baumannii* к пиперациллину, пиперациллин/тазобактаму, цефтазидиму, ампициллину/сульбактаму, *P. aeruginosa* к колистину, полимиксину, *E. coli* к налидиксовой кислоте, *K. pneumoniae* к налидиксовой кислоте, миноциклину, *S. aureus* к норфлоксацину, *Enterococcus* spp. к левофлоксацину, тетрациклину, которые интерпретировали по стандарту CLSI³. Результаты, полученные при тестировании *A. baumannii* к азтреонаму, тигециклину, цефоперазон/сульбактаму, *Enterococcus* spp. к гентамицину, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* к цефоперазон/сульбактаму, оценивали только путём сравнения абсолютных значений с таковыми для контрольных штаммов.

Определение чувствительности методом Е-тестов проводили в соответствии с инструкцией производителя. Минимальные подавляющие концентрации антимикробных препаратов в мг/л определяли визуально, идентифицируя клиническую категорию штамма: чувствительный (S), умеренно-резистентный (I), резистентный (R), в соответствии с актуальной версией стандарта EUCAST.

СИМ-тест (Carbapenem Inactivation Method) проводили в соответствии с рекомендациями W. Song и соавт. [7]. Диски, содержащие 10 мкг меропенема, выдерживали в бактериальной суспензии исследуемого штамма, плотность которой соответствовала 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, при температуре 35°С в течение 2 ч. Обработанные и контрольные (необработанные) диски помещали на поверхность питательных сред «МХА II-Оболеск» и «МХА II-BD», со свежесеемым газом тест-штамма *E. coli* ATCC 25922. Посевы инкубировали при температуре 35°С в течение 16-18 ч. При отсутствии зоны подавления роста тест-штамма фиксировали наличие карбапенемазной активности в исследуемом клиническом штамме (положительный результат), при наличии зоны подавления роста с диаметром >20 мм – отсутствие карбапенемазной активности в исследуемом штамме (отрицательный результат).

Детекция генов антибиотикорезистентности. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в классическом режиме со специфичными праймерами определяли гены карбапенемаз *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-244}, *bla*_{OXA-40-like}, *bla*_{NDM}, как описано ранее [8-10].

Результаты. Для оценки качества питательной среды «МХА II-Оболеск» выбраны грамположительные и грамотрицательные бактерии – возбудители ИСМП, новый патоген – *Photorhabdus* spp., тестирование проводили в несколько этапов.

Чувствительность возбудителей ИСМП. На I этапе проводили испытания новой питательной среды в лаборатории разработки питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ с использованием 18 музейных штаммов грамотрицательных бактерий, охарактеризованных по чувствительности к АМП и наличию генетических детерминант антибиотикорезистентности (табл. 1). Выбор тест-штаммов обусловлен клинической значимостью бактерий видов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* и др. в качестве возбудителей ИСМП [11]. Определяли чувствительность штаммов к 28 антибиотикам на среде «МХА II-Оболеск» диско-

²European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Version 8.1, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute (M100-S24 Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty – Fourth Informational Supplement, January, 2014 г.).

Характеристика нозокомиальных штаммов, использованных для тестирования среды «МХА II-Оболенск»

Вид микроорганизма	Штамм	Резистентность к АМП	Генетические детерминанты антибиотикорезистентности
<i>K. pneumoniae</i>	B-1822/14	AMC, CEF, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, AMI, CIP, TET, TGC, CTZ, NIT, CM	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-48}
	B-1969/14	AMC, CEF, CTA, CEX, EPM, IMI, TOB, CIP, CTZ, NIT, CM	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-48}
	B-352K/15	AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, NIT, CM	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-244}
	B-369/15	AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, TGC, CTZ, NIT, CM	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-244}
	410	AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, CTZ, NIT, CM	<i>bla</i> _{NDM}
	409	AMC, CEF, CEX, CTA, CAZ, FEP, EPM, GEN, TOB, CIP, CTZ, NIT, CM	<i>bla</i> _{NDM}
	I-1627	AMP, TCA	<i>bla</i> _{SHV}
	I-2135	AMP, TCA	<i>bla</i> _{SHV}
<i>A. baumannii</i>	B-740/14	AMC, CEF, CEX, CTX, CTA, CAZ, FEP, IMI, GEN, TOB, AMI, CIP, CTZ, NIT, CM	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{OXA-40-like} , <i>bla</i> _{OXA-51-like}
	B-2137/14A	AMC, CEF, CEX, CTX, CTA, CAZ, FEP, IMI, GEN, TOB, AMI, CIP, TET, CTZ, NIT, CM	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-23-like} , <i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>int2</i>
	B-774/15A	AMC, CEF, CEX, CTX, CTA, CAZ, FEP, IMI, GEN, TOB, AMI, CIP, NIT, CM	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-115} , <i>bla</i> _{OXA-40-like} , <i>bla</i> _{OXA-51-like} , <i>int1</i>
<i>P. aeruginosa</i>	B-458/14	AMC, CAZ, TCA, TCC, PIP, FEP, IMI, MER, GEN, TOB, CIP, PEF, CTZ	<i>bla</i> _{VIM-2} , <i>int1</i>
	B-519/14P	AMC, CAZ, TCA, TCC, PIP, FEP, IMI, MER, GEN, TOB, CIP, PEF, CTZ	<i>bla</i> _{VIM-2}
<i>P. mirabilis</i>	B-757M	CEF, CTA, FEP, TET, TGC, GEN, TOB, CIP, NIT, CM	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-244} , <i>int2</i>
	B-912/14	CEF, TET, TGC, CIP, NIT, CM	<i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>int1</i> , <i>int2</i>
<i>S. marcescens</i>	B-208/15	CEF, CTA, FEP, GEN, TOB, CIP, NIT, CM	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-3}
<i>E. aerogenes</i>	B-658/15	CEF, CEX, CTX, FEP, AZR, GEN, AMI, NET, CTZ	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>int1</i>
<i>E. coli</i>	B-529/15	AMC, CEF, CTX, CAZ, FEP, CIP, CTZ	<i>bla</i> _{CTX-M-15}

Примечание. AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, AMP – ампициллин, CEF – цефуроксим, CEX – цефокситин, CTX – цефотаксим, CTA – цефтриаксон, CAZ – цефтазидим, TCA – тикарциллин, TCC – тикарциллин/клавулановая кислота, PIP – пиперацillin, FEP – цефепим, EPM – эртапенем, AZR – азтреонам, IMI – имипенем, MER – меропенем, TET – тетрациклин, TGC – тигециклин, CIP – ципрофлоксацин, PEF – пefлоксацин, CM – хлорамфеникол, GEN – гентамицин, TOB – тобрамицин, AMI – амикацин, CTZ – триметоприм/сульфаметоксазол, NET – нетилицин, NIT – нитрофурантоин; *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{NDM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{VIM} – гены бета-лактамаз SHV, CTX-M, OXA, NDM, TEM, и VIM типов; *int1* – интегрон класса 1, *int2* – интегрон класса 2.

диффузионным методом (см. рисунок на обложке). Параллельно оценивали чувствительность этих штаммов к тем же АМП на контрольной питательной среде – «МХА II-BD». Значения диаметров зон подавления роста всех исследованных штаммов микроорганизмов, полученные на обеих питательных средах, совпадали между собой практически для всех АМП, отличаясь максимально на ±3 мм, что не влияло на результаты интерпретации в соответствии с клиническими критериями чувствительности (табл. 2). В ходе испытаний выполнили по 1512 тестов на разработанной и контрольной питательных средах. В 1506 тестах (99,6%) получили совпадающие результаты, в шести (0,4%) – результаты не совпадали. Штамм *P. aeruginosa* B-519/14P классифицирован на среде «МХА II-BD» как резистентный к цефтазидиму, на среде «МХА II-Оболенск» – как чувствительный. Штамм *K. pneumoniae* B-1969/14 определен на среде «МХА II-BD» как резистентный к миноциклину, на среде «МХА II-Оболенск» – как умеренно-резистентный.

Сравнение данных диско-диффузионного метода с данными, полученными при тестировании штаммов на приборе Vitek 2 Compact, показали совпадение интерпретации чувствительности с данными, полученными на контрольной среде «МХА II-BD».

Чувствительность клинических изолятов. На II этапе проводили клинические испытания разработанной питательной среды на базе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ярославской области «Инфекционная клиническая больница» диско-диффузионным методом. Использовано 147 клинических изолятов бактерий, из которых *K. pneumoniae* – 49, *A. baumannii* – 49, *S. aureus* – 14, *Enterococcus* spp. – 14, *E. coli* – 12, *P. aeruginosa* – 9, выделенных от пациентов нескольких отделений больницы. Значения диаметров зон подавления роста тест-культур на двух средах отличались максимально на 1-2 мм для всех использованных дисков с АМП. Полученные различия не влияли на определение клинических категорий чувствительности

Таблица 2

Результаты определения чувствительности музейных штаммов и клинических изолятов грамотрицательных бактерий на питательных средах «МХА II-Оболеск» и «МХА II-BD» (I и II этапы испытаний)

I этап испытаний				II этап испытаний			
Музейные штаммы	Количество АМП к которым проводили тестирование	Всего проделанных тестов*	Количество совпавших тестов**	Клинические изоляты	Количество АМП к которым проводили тестирование	Всего проделанных тестов*	Количество совпавших тестов**
<i>K. pneumoniae</i> (n=8)	28	672	669	<i>K. pneumoniae</i> (n=49)	28	4116	4116
<i>A. baumannii</i> (n=3)	28	252	252	<i>A. baumannii</i> (n=49)	28	4116	4116
<i>P. aeruginosa</i> (n=2)	28	168	165	<i>S. aureus</i> (n=14)	8	336	336
<i>P. mirabilis</i> (n=2)	28	168	168	<i>Enterococcus</i> spp. (n=14)	9	378	378
<i>S. marcescens</i> (n=1)	28	84	84	<i>E. coli</i> (n=12)	12	432	429
<i>E. aerogenes</i> (n=1)	28	84	84	<i>P. aeruginosa</i> (n=9)	11	297	297
<i>E. coli</i> (n=1)	28	84	84				
Итого	28	1512	1506	Итого	28	9675	9672

Примечание. * – определение чувствительности к каждому АМП выполняли в трех повторах; ** – данные в сравнении с результатами тестов на контрольной питательной среде «МХА II-BD».

сти, за исключением одного несовпадающего результата для изолята *E. coli* X 623, который чувствителен к амоксициллину/клавулановой кислоте на контрольной среде «МХА II-BD» и устойчив к этому препарату на среде «МХА II-Оболеск» (табл. 2).

В соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010⁴ изделия, применяемые для испытаний антибактериальной чувствительности, считаются пригодными, если показатель согласования категорий клинической чувствительности с референтным методом превышает 90%, при этом допустимый процент больших расхождений и очень больших расхождений – менее 3%. В соответствии с приведёнными показателями проведён анализ результатов определения чувствительности 165 штаммов возбудителей ИСМП и внегоспитальных инфекций к АМП на разработанной питательной среде «МХА II-Оболеск» и контрольной питательной среде «МХА II-BD» надёжного производителя Becton Dickinson с помощью диско-диффузионного метода. Показатель согласования клинических категорий (S, I, R), полученных на разработанной и контрольной средах, составил 98,2% (162 из 165 штаммов). Поскольку все три несовпадающих результата фиксировали при тестировании грамотрицательных бактерий, дальнейший расчёт показателей расхождений проводили только для них (n=137).

Первое расхождение, касающееся определения чувствительности штамма *P. aeruginosa* B-519/14P к цефтазидиму, отнесли к категории «очень большие расхождения». Доля «очень больших расхождений», рассчитываемая как отношение количества штаммов с «очень большим расхождением» (n=1) к количеству проанализированных устойчивых к цефтазидиму грамотрицательных бактерий (n=87), составила 1,1%. Такой уровень расхождений не превышает допустимых значений, изложенных в ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 (3%).

Второе выявленное расхождение, полученное при тестировании чувствительности штамма *K. pneumoniae*

B-1969/14 к миноциклину, отнесли к категории «малые расхождения». Доля «малых расхождений», определенная как отношение количества штаммов с «малым расхождением» (n=1) к общему количеству проанализированных на чувствительность к миноциклину грамотрицательных бактерий (n=137), составила 0,7%. Требования к данному показателю в ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 отсутствуют.

Третий случай несовпадения результатов чувствительности бактерий к АМП на разработанной питательной среде «МХА II-Оболеск» и контрольной питательной среде «МХА II-BD», отмеченный для клинического изолята *E. coli* X 623 по отношению к амоксициллину/клавулановой кислоте, отнесли к категории «большие расхождения». Доля «больших расхождений», определенная как отношение количества штаммов с «большим расхождением» (n=1) к количеству проанализированных чувствительных к амоксициллину/клавулановой кислоте грамотрицательных бактерий (n=42), составила 2,7%, что не превышало допустимых значений в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 (3%).

Чувствительность штаммов *Photobacterium* spp.
На III этапе испытаний оценивали питательную среду «МХА II-Оболеск» при определении чувствительности к АМП диско-диффузионным методом восьми музейных штаммов *Photobacterium* spp., нового патогена человека [12]. Грамотрицательные почвенные бактерии рода *Photobacterium* (сем. *Enterobacteriaceae*) известны как симбионты энтомопатогенных нематод семейства *Heterorhabditidae* и паразиты личиночных форм насекомых, их применяют в сельском хозяйстве в качестве биологических инсектицидов. Установлена этиологическая роль представителя этого рода *P. asymbiotica* при развитии инфекционно-воспалительных заболеваний у иммунокомпрометированных пациентов [13-18]. Для тестирования питательной среды «МХА II-Оболеск» использованы пять патогенных для человека штаммов *P. asymbiotica* и три непатогенных штамма *P. luminescens*. По данным литературы чувствительность *Photobacterium* spp. к АМП зависит от температуры культивирования [18], тестирование проводили при двух температурах: 25 и 37° С, имитирующих условия в организме нематод и личинок насекомых или в организме человека, соответственно (табл. 3).

⁴Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. https://allgosts.ru/11/100/gost_r_iso_20776-2-2010.pdf

Таблица 3

Результаты определения чувствительности штаммов *Photorhabdus* spp. к АМП диско-диффузионным методом на питательных средах «МХА II-Оболенск» и «МХА II-BD» (III этап испытаний)

Диски с антимикробными препаратами	Штаммы <i>Photorhabdus</i> spp. / Температура культивирования, °C															
	<i>P. asymbiotica</i> US86		<i>P. asymbiotica</i> US88		<i>P. asymbiotica</i> AU46		<i>P. asymbiotica</i> AU97		<i>P. asymbiotica</i> CbKj163		<i>P. luminescens</i> Hb ^T		<i>P. luminescens</i> FRG04		<i>P. luminescens</i> TT01 ^T	
	25	37	25	37	25	37	25	37	25	37	25	37	25	37	25	37
Амоксициллин/клавулановая к-та	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Ампициллин	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
Бензилпенициллин	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Гентамицин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Доксициклин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Имипенем	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Канамицин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Карбенициллин	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
Кларитромицин	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	I	I	R	R	R	R
Хлорамфеникол	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Левифлоксацин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Пеперазиллин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Тобрамицин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Триметоприм/сульфаметоксазол	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Цефепим	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Цефокситин	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S
Цефотаксим	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Цефтазидим	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Цефтриаксон	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ципрофлоксацин	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S

Примечание. S- чувствительный, I умеренно-резистентный и R- устойчивый штаммы.

Таблица 4

Определение чувствительности возбудителей ИСМП к АМП методом Е-тестов на питательных средах «МХА II-Оболенск» и «МХА II-BD» (IV этап испытаний)

Тест-штаммы	Всего проделанных тестов*	Количество совпавших тестов**	Количество тестов, для которых значение МПК отличалось на одно двукратное разведение (наименования АМП)**	Количество тестов, для которых значение МПК отличалось на два двукратных разведения (наименования АМП)**
<i>K. pneumoniae</i> (n=8)	312	177	54 (AM, CT, TZ, IP, MER, CI, LE, GM, CL)	81 (AM, CT, TZ, IP, MER, CI, LE, GM, CL)
<i>A. baumannii</i> (n=3)	117	69	30 (IP, MER, LE, GM, CI)	18 (IP, MER, LE, GM, CI)
<i>P. aeruginosa</i> (n=2)	78	51	15 (IP, MER, LE, CI, GM)	12 (GM, IP, MER, TZ)
<i>P. mirabilis</i> (n=2)	78	60	18 (CT, IP, MER, CI, LE, GM)	0
<i>S. marcescens</i> (n=1)	39	27	12 (IP, MER, CI, LE)	0
<i>E. aerogenes</i> (n=1)	39	24	15 (AM, CT, TZ, IP, MER)	0
<i>E. coli</i> (n=1)	39	15	24 (AM, CT, TZ, GM)	0
Итого	702	423	168	111

Примечание. * - определение чувствительности к каждому АМП выполняли в трех повторах; ** - данные в сравнении с результатами тестов на контрольной питательной среде «МХА II – BD». AM – ампициллин, CT – цефотаксим, TZ – цефтазидим, IP – имипенем, MER – меропенем, GM – гентамицин, CI – ципрофлоксацин, LE – левофлоксацин, CL – хлорамфеникол.

Обнаружено влияние температуры культивирования на результаты определения чувствительности к ампициллину, бензилпенициллину, амоксициллину/клавулановой кислоте для трёх штаммов *P. asymbiotica* US86, *P. asymbiotica* US88, *P. asymbiotica* AU46 и одного штамма *P. luminescens* Hb^T: при температуре 25° С их регистрировали как резистентные, при 37° С – как чувствительные. При определении чувствительности этих штаммов к остальным АМП не наблюдали зависимости результатов от температуры, но регистрировали устойчивость к некоторым АМП при обеих температурах (табл. 3). Четыре штамма *P. asymbiotica*

AU97, *P. asymbiotica* CbKj163, *P. luminescens* FRG04, *P. luminescens* TT01T проявляли чувствительность к большинству АМП. Исключение составил штамм *P. asymbiotica* AU97: штамм был резистентный к пяти АМП и умеренно-резистентный к одному АМП. Аналогичные результаты получили для штамма *P. asymbiotica* CbKj163, за исключением устойчивости к кларитромицину. Штамм *P. luminescens* FRG04 резистентен к четырём АМП, штамм *P. luminescens* TT01T – к пяти АМП. Различий в антибиотикограммах штаммов, полученных на питательной среде «МХА II-Оболенск» и на контрольной среде «МХА II-BD», не выявлено.

Детекция карбапенемазной активности штаммов методом СИМ-теста на питательных средах «МХА II-Оболensk» и «МХА II-ВД» (V этап испытаний)

Вид бактерий	Штамм	Гены карба- пенемаз	Результаты СИМ-метода	Вид бактерий	Штамм	Гены карбапе- немаз	Результаты СИМ-метода
<i>K. pneumoniae</i>	410	<i>bla</i> _{NDM-1}	Положительный	<i>K. pneumoniae</i>	YKP203	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	409	<i>bla</i> _{NDM-1}	Положительный	<i>K. pneumoniae</i>	I-1627	—	Отрицательный
<i>K. pneumoniae</i>	B-352K/15	<i>bla</i> _{OXA-244}	Положительный	<i>K. pneumoniae</i>	I-2135	—	Отрицательный
<i>K. pneumoniae</i>	B-369/15	<i>bla</i> _{OXA-244}	Положительный	<i>K. pneumoniae</i>	YKP1648	—	Отрицательный
<i>K. pneumoniae</i>	B-1822/14	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>K. pneumoniae</i>	YKP2111	—	Отрицательный
<i>K. pneumoniae</i>	B-1969/14	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	B-740/14	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP201	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	B-774/15A	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP202	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	B-2137/14A	<i>bla</i> _{OXA-23-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP200	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB43	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP16	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB61	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP2160	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB66	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP1645	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB118	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP1747	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB127	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP1643	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB179	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP1646	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB144	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP1644	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB121	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP902	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB140	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP533	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB220	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP2395	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB224	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP498	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB246	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP522	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB268	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP87	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB56	<i>bla</i> _{OXA-40-like}	Положительный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP669	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB199	—	Отрицательный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP2291	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB122	—	Отрицательный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP1142	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB246	—	Отрицательный
<i>K. pneumoniae</i>	YKP178	<i>bla</i> _{OXA-48}	Положительный	<i>A. baumannii</i>	YAB245	—	Положительный

Примечание: *bla*_{OXA} и *bla*_{NDM} – гены карбапенемаз OXA- и NDM- типов, «—» – отсутствие гена карбапенемазы.

Метод Е-тестов. На IV этапе проводили оценку качества разработанной питательной среды «МХА II-Оболensk» при определении чувствительности штаммов возбудителей ИСМП, использованных на первом этапе испытаний (см. табл. 1) методом градиентной диффузии (Е-тестов). Данный метод позволяет определять значение минимально подавляющей концентрации (МПК) антимикробных препаратов, что сопоставимо с данными метода разведений (см. рисунок). В ходе исследования на разработанной и контрольной питательных средах провели по 702 теста. Значения МПК антимикробных препаратов на обеих средах полностью совпали в 423 тестах (60,2%), различались на одно двукратное разведение, – в 168 тестах (23,9%), различались на два двукратных разведения – в 111 тестах (15,8%). Только один штамм (*K. pneumoniae* B-1969/14) интерпретировали на разработанной и контрольной питательных средах по-разному: как чувствительный к доксициклину на среде «МХА II-ВД» и как умеренно-резистентный – на среде «МХА II-Оболensk» (табл. 4).

Показатель согласования категорий чувствительности 18 музейных штаммов бактерий к АМП при определении значений МПК для амоксициллина, ампициллина, гентамицина, стрептомицина, тетрациклина, имипенема, меропенема, хлорамфеникола, левофлоксацина, ципрофлоксацина, цефотаксима, цефтазидима составил

100%, для доксициклина – 94,4%, что соответствует требованиям ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010.

СИМ-тест. На V этапе испытаний оценивали экспериментальные данные по инаktivации карбапенемов клеточными лизатами штаммов-продуцентов карбапенемаз на разработанной питательной среде «МХА II-Оболensk» в сравнении с контрольной питательной средой «МХА II-ВД». Этот тест позволяет идентифицировать штаммы, продуцирующие карбапенемазы. Использованы штаммы, несущие гены карбапенемаз OXA-48-типа ($n=23$), OXA-244-типа ($n=2$), OXA-40-типа ($n=16$), OXA-23-типа ($n=1$), NDM-1 ($n=2$) и не имеющие гены карбапенемаз ($n=8$). Все штаммы *K. pneumoniae* и *A. baumannii*, содержащие гены карбапенемаз, продемонстрировали положительный результат в СИМ-тесте. Штаммы, не имеющие гены карбапенемаз, показали отрицательный результат в СИМ-тесте, кроме одного штамма (*A. baumannii* YAB245), который продемонстрировал положительный результат, возможной причиной которого может являться наличие в этом штамме не выявленного с помощью использованного набора праймеров для ПЦР гена карбапенемазы (табл. 5). Несовпадений результатов, полученных на разработанной питательной среде «МХА II-Оболensk» и на контрольной питательной среде «МХА II-ВД», не зафиксировано.

Обсуждение. Испытания разработанной в ФБУН ГНЦ ПМБ питательной среды «МХА II-Оболensk» в

сравнении с контрольной питательной средой «МХА II-BD» продемонстрировали высокую степень совпадений полученных результатов тестирования чувствительности грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий к АМП разных функциональных классов. Подавляющее большинство использованных тест-штаммов и клинических изолятов отнесены к категориям чувствительных, умеренно-резистентных, устойчивых бактерий идентично на обоих использованных питательных средах. Отмеченные единичные случаи расхождений результатов соответствуют требованиям ГОСТ Р ИСО 20776-2-2010 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам». Возможность получения адекватных результатов микробиологических экспериментов продемонстрирована при использовании диско-диффузионного метода, метода градиентной диффузии, СИМ-теста, что подтверждает фенотипическое выражение генетических детерминант антибиотикорезистентности.

В рамках Программы импортозамещения в России успешно разработана питательная среда «МХА II-Оболонск», пригодная для получения надёжных и достоверных результатов определения чувствительности клинически значимых бактерий к антимикробным препаратам.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

ЛИТЕРАТУРА (1, 3-4, 7-11, 13-17 см. REFERENCES)

2. Мионов А.Ю., Крапивина И.В., Мудрак Д.Е., Иванов Д.В. Молекулярные механизмы резистентности к β -лактамам патогенов внутрибольничных инфекций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 39-43.
5. Шепелин А.П., Морозова Т.П., Косилова И.С., Глазкова Г.П., Домотенко Л.В. Оценка качества питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам. *Дезинфекция. Антисептика*. 2013; 1: 43-8.
6. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. *Питательные среды для медицинской микробиологии*. СПб.: Издательство «ЭЛБИ-СПб»; 2008.
12. Авдошин В.П., Макаров О.В., Киричек А.А. *Phototribadus asymbiotica* — новый представитель грамотрицательной микрофлоры в инфекции мочевых путей. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: медицина*. 2013; 4: 94-9.
18. Киршева Н.А., Ганина Е.А., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Инфекционная чувствительность мышей линии BALB/c к заражению *Phototribadus asymbiotica* и *Phototribadus temperate*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2012; 3(113): 64-6.

REFERENCES

1. Jim O'Neill. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. London: The review on antimicrobial resistance. 2016. URL: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf.
2. Mironov A.YU., Krapivina I.V., Mudrak D.E., Ivanov D.V. Molecular mechanisms of the antibacterial resistance of nosocomial infection pathogens to β -lactams. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 1: 39-43. (in Russian)

3. Veenemans J., Mouton J.W., Kluytmans J.A., Donnelly R., Verhulst C., van Keulen P.H. Effect of manganese in test media on in vitro susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* to tigecycline. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(9): 3077-9.
4. Daly J. S., Dodge R. A., Glew R. H., Soja D. T., Deluca B. A., Hebert S. Effect of zinc concentration in Mueller-Hinton Agar on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(4): 1027-9.
5. Shepelin A.P., Morozova T.P., Kosilova I.S., Glazkova G.P., Domotenko L.V. Assessment of the quality of nutrient media for determining sensitivity to antibacterial drugs. *Dezinfektsiya Antiseptika*. 2013; 1: 43-8. (in Russian)
6. Polyak M.S. Nutrient media for medical and sanitary microbiology. St.Petersburg: ELBI-SPb; 2008. (in Russian)
7. Song W., Kim H.-S., Kim J.-S., Kim H. S., Shin D. H., Shin S., Park M.-J. Carbapenem Inactivation Method: Accurate Detection and Easy Interpretation of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. *Ann. Clin. Microbiol.* 2016; 19(4): 83-7.
8. Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., Kartsev N.N., Leonova E.S., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Kurdyumova N.V., Sazikina S.Y., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Dyatlov I.A. The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2015; 14(1): 46.
9. Dyatlov I., Astashkin E., Kartsev N., Ershova O., Svetoch E., Firsova V., Fursova N. Novel blaCTX-M-2-type gene coding extended spectrum beta-lactamase CTX-M-115 discovered in nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in Russia. In: Multidisciplinary Approaches for Studying and Combating Microbial Pathogens. Ed. A. Mendez-Vilas. Brown Walker Press. Boca Raton, Florida, USA. 2015; 107-110. ISBN-10: 1-62734-544-2. ISBN-13: 978-1-62734-544-6.
10. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2014; 44(2): 152-5.
11. Rodrigo-Troyano A., Sibila O. The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Respirology*. 2017; 22: 1288-99.
12. Avdoshin V.P., Makarov O.V., Kirichek A.A. *Phototribadus asymbiotica* is a new representative of gram-negative microflora in urinary tract infections. *Bulleten' Rossiyskogo Universiteta Druzhby narodov. Seriya :Meditsina*. 2013; 4: 94-9. (in Russian)
13. Costa S.C., Chavez C.V., Jubelin G. et al. Recent insight into the pathogenicity mechanisms of the emergent pathogen *Phototribadus asymbiotica*. *Journal Microbes and Infection*. 2010; 12: 182-9.
14. Gerrard J., Waterfield N., Vohra R. et al. Human infection with *Phototribadus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. *Journal Microbes and Infection*. 2004; 6: 229-37.
15. Gerrard J.G., McNeven S., Alfredson D. et al. *Phototribadus* species: bioluminescent bacteria as emerging human pathogens? *Journal Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9: 251-4.
16. Peel M.M., Alfredson D.A., Gerrard J.G. et al. Isolation, identification, and molecular characterization of strains of *Phototribadus luminescens* from infected humans in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 3647-53.
17. Weissfeld A.S., Halliday R.J., Simmons D.E. et al. *Phototribadus asymbiotica*, a pathogen emerging on two continents that proves that there is no substitute for a well-trained clinical microbiologist. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(8): 4152-55.
18. Kirsheva N.A., Ganina E.A., Kombarova T.I., SHajhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Infectious sensitivity of BALB/c mice to infection with *Phototribadus asymbiotica* and *Phototribadus temperate*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; 3(113): 64-6. (in Russian)

Поступила 25.04.19

Принята к печати 30.04.19

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *SALMONELLA* К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Бактерии рода Salmonella являются ведущими возбудителями инфекций, передающихся пищевым путём: ежегодно в Российской Федерации регистрируют около 50 тыс. случаев сальмонеллёзов. Антимикробная терапия рекомендована в случае тяжёлого течения заболевания у детей до 6 лет и лиц старше 50 лет, у пациентов с тяжёлыми сопутствующими состояниями, в случае генерализации инфекции. Бета-лактамы, хинолоны, азитромицин входят в перечень препаратов, рекомендуемых для лечения сальмонеллёзов, включая брюшной тиф. Эффективность терапии во многом зависит от правильного определения чувствительности штамма к антибиотикам: выбора метода тестирования, индикаторных препаратов и интерпретации полученных результатов. Род Salmonella относится к семейству Enterobacteriaceae и характеризуется общими для энтеробактерий механизмами резистентности к хинолонам и бета-лактамам, но оценка чувствительности штаммов Salmonella к антибиотикам этих групп имеет ряд особенностей. В статье представлены современные данные о чувствительности штаммов Salmonella, включая возбудителя брюшного тифа Salmonella Typhi, к антимикробным препаратам и ведущих клинически значимых механизмах резистентности. Подробно описаны методические особенности определения чувствительности штаммов Salmonella к антибиотикам, применяемым для лечения сальмонеллёзов (хинолонам, бета-лактамам, азитромицину). Представлены особенности интерпретации результатов тестирования штаммов Salmonella с позиций современных международных и российских рекомендаций. Представлены алгоритмы определения чувствительности Salmonella к хинолонам, цефалоспорином, карбапенемам, критерии интерпретации результатов, позволяющие проводить детекцию клинически значимых механизмов резистентности к бета-лактамам (продукция бета-лактамаз различных молекулярных классов), хинолонам (хромосомные мутации и приобретённые гены резистентности).

Ключевые слова: *Salmonella*; резистентность к антимикробным препаратам; БЛРС; карбапенемаза; фторхинолоны.

Для цитирования: Егорова С. А., Кафтырева Л. А. Методические особенности определения чувствительности штаммов *Salmonella* к антимикробным препаратам (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64(6): 368-375. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-368-375>

Egorova S.A.¹, Kaftyreva L.A.^{1,2}

METHODICAL ASPECTS OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF *SALMONELLA* (REVIEW OF LITERATURE)

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint-Petersburg, Russia;

²State Educational Institution of the Higher Professional Education «North-Western state medical University n.a. I. I. Mechnikov» of the Ministry of Health of the Russian Federation

Salmonella is one of the leading food-borne infection pathogen: annually in the Russian Federation about 50 thousand cases of salmonellosis are registered. Antimicrobial therapy is necessary in the case of severe infection in children under 6 years and persons over 50 years, in patients with severe accompanying disease, as well as in the case of generalization of the infection. Beta-lactam antibiotics, quinolones and azithromycin are included in the list of drugs recommended for antimicrobial therapy of salmonellosis, including typhoid fever. The effectiveness of therapy largely depends on the appropriate antimicrobial susceptibility testing: the choice of testing method, indicator antibiotics and result interpretation. Salmonella belong to the Enterobacteriaceae family and are characterized by common mechanisms of resistance to quinolones and beta-lactams, but antimicrobial susceptibility testing of Salmonella to these groups of antibiotics has a number of features. The article presents current data on the susceptibility of Salmonella, including S. Typhi, to antibiotics and leading clinically significant resistance mechanisms. The methodical aspects of Salmonella antimicrobial susceptibility testing of the drugs used for the treatment of salmonellosis (quinolones, beta-lactams and azithromycin) are described in detail. Interpretation of Salmonella testing results according the modern international and Russian recommendations are presented. The authors propose the algorithms for Salmonella antimicrobial susceptibility testing of quinolones, cephalosporins and carbapenems, as well as criteria for result interpretation, allowing the detection of clinically significant mechanisms of resistance to beta-lactams (production of beta-lactamases of different molecular classes) and quinolones (chromosomal mutations and acquired resistance genes).

Key words: *Salmonella*; resistance; antimicrobial susceptibility; ESBL; carbapenemase; quinolones.

For citation: Egorova S.A., Kaftyreva L.A. Methodical aspects of antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 368-375 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-6-368-375>

For correspondence: Egorova S.A., PhD, senior researcher of laboratory of enteric infections; egorova72@mail.ru

Information about authors:

Egorova Svetlana A., <https://orcid.org/0000-0002-7589-0234>

Kaftyreva Lidiya A., <https://orcid.org/0000-0003-0989-1404>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 23.04.2019

Accepted 30.04.2019

В странах Евросоюза *Salmonella* spp. занимают второе место (после *Campylobacter* spp.) в рейтинге возбудителей инфекций, передающихся с пищевым путём: в 2016 г. зарегистрировано 94,5 тыс. случаев сальмонеллёза [1]. По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 г.» в последние 10 лет заболеваемость сальмонеллёзами составляла в среднем 32,9 на 100 тыс. населения, ежегодно регистрировались около 50 тыс. случаев заболеваний.

Для лечения неосложнённого сальмонеллёзного гастроэнтерита лёгкой и средней тяжести не рекомендовано использовать антимикробные препараты (АМП), поскольку показано, что назначение АМП не сокращает продолжительность симптомов, но в ряде случаев повышает частоту и длительность бактериовыделения [2]. Современные рекомендации по лечению диареи (в том числе, сальмонеллёзной этиологии) предлагают антимикробную терапию при тяжёлом течении заболевания у детей до 6 лет и лиц старше 50 лет, у пациентов с тяжёлыми сопутствующими состояниями, в случае генерализации инфекции. В качестве эмпирической терапии сальмонеллёзной инфекции в разные годы использовали хлорамфеникол, ампициллин, триметоприм/сульфаметоксазол. В связи с разработкой новых более безопасных и эффективных АМП, для лечения сальмонеллёзов стали применять фторхинолоны и цефалоспорины расширенного спектра (ЦРС) [3]. В настоящее время в качестве стартовой эмпирической терапии рекомендовано использование фторхинолонов, триметоприм/сульфаметоксазола, цефалоспоринов расширенного спектра или азитромицина [4-8].

Системы надзора, действующие в экономически развитых странах, направлены в первую очередь на выявление устойчивости штаммов *Salmonella* к АМП наиболее важным для медицины: фторхинолонам и ЦРС. В странах Евросоюза доля штаммов, устойчивых к этим группам препаратов, составляла у трёх ведущих сероваров *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*: к фторхинолонам – 13,0%, 8,5%, 23,4%, соответственно; к ЦРС – менее 1,0%, 2,0%, 6,9%, соответственно [9]. На административных территориях РФ актуальна проблема устойчивости *Salmonella* к АМП, используемым для лечения сальмонеллёзов: доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, составляла от 0 до 45,3%, фторхинолонам – от 0 до 53,6% [10-13]. В этих условиях может возникнуть необходимость коррекции стартовой эмпирической антимикробной терапии по результатам тестирования возбудителя. Несмотря на то, что *Salmonella* относятся к семейству *Enterobacteriaceae* и характеризуются общими для энтеробактерий механизмами приобретённой резистентности к хинолонам и бета-лактамам, оценка чувствительности штаммов *Salmonella* к этим группам АМП имеет ряд особенностей. Методические вопросы проведения исследования (приготовление агара/бу-

льона Мюллера-Хинтона и инокулюма, способ посева, условия инкубации и учёта результатов) представлены в российских Клинических рекомендациях «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (далее по тексту – КР) и не отличаются от других энтеробактерий [14].

Определение чувствительности штаммов *Salmonella* к хинолонам. Группа хинолонов включает нефторированные (налидиксовая кислота) и фторированные (ципрофлоксацин, пefлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин и др.) хинолоны. Основным механизмом резистентности у штаммов энтеробактерий является модификация мишени - ферментов, участвующих в репликации ДНК (ДНК-гиразы и топоизомеразы). Мутации в генах, кодирующих структуру этих ферментов (гены *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), снижают их сродство к хинолонам, что выражается в повышении минимальной подавляющей концентрации (МПК). Устойчивость к этой группе препаратов в большинстве случаев развивается ступенчато. Первая мутация, как правило, в гене *gyrA*, ведёт к развитию устойчивости высокого уровня к налиндиксовой кислоте - МПК повышается до 128-256,0 мг/л и более. При этом МПК ципрофлоксацина повышается до 0,12-0,5 мг/л (устойчивость низкого уровня к фторхинолонам) [15]. Такие штаммы энтеробактерий (кроме *Salmonella*) остаются в клинической категории «чувствительный» к фторхинолонам и их сложно выявить при рутинном тестировании диско-диффузионным методом (ДДМ), если не тестировать налиндиксовую кислоту, которая является чувствительным индикатором хромосомного механизма устойчивости, даже низкого уровня. Устойчивость низкого уровня к фторхинолонам у штаммов энтеробактерий (кроме *Salmonella*) не рассценивается как клинически значимая. Согласно «Экспертным правилам оценки чувствительности бактерий к антимикробным препаратам», приведённым в КР, в результате исследования можно внести комментарий о том, что при лечении инфекции фторхинолонами у такого штамма может возникнуть резистентность высокого уровня.

При использовании хинолонов в процессе лечения возможна селекция штаммов с дополнительными мутациями, у таких штаммов повышается МПК ципрофлоксацина до 4,0 мг/л и выше (возникает устойчивость высокого уровня к фторхинолонам), штамм переходит в клиническую категорию «устойчивый» и его легко выявить при тестировании ципрофлоксацина ДДМ.

В отличие от других энтеробактерий, у штаммов *Salmonella* устойчивость низкого уровня к фторхинолонам (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л) признана клинически значимой. Неэффективность фторхинолонов (используемых в стандартной дозировке) при лечении брюшного тифа, вызванного такими штаммами *S. Typhi*, подтверждена многочисленными рандомизированными клиническими исследованиями (категория доказательств

А) [16-18]. Такие данные имеются и в отношении других сероваров *Salmonella* (категория доказательств С). Некоторые исследователи указывают на эффективность использования максимально высоких доз современных фторхинолонов (гатифлоксацина) в отношении *S. Typhi* с устойчивостью низкого уровня [19].

Чувствительность штаммов *Salmonella* к фторхинолонам можно определять различными методами. Наиболее достоверным показателем для оценки предположительной эффективности терапии фторхинолонами является МПК ципрофлоксацина (определенная методами серийных разведений, градиентной диффузии и др.). Согласно рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (EUCAST) и КР для штаммов *S. Typhi* (и других *Salmonella*, вызывающих инвазивные инфекции) используются особые критерии интерпретации для ципрофлоксацина ($S \leq 0,06$ мг/л; $R > 0,06$ мг/л), отличающиеся от критериев, используемых для энтеробактерий ($S \leq 0,25$ мг/л; $R > 0,5$ мг/л). Штаммы *Salmonella*, для которых МПК ципрофлоксацина превышает 0,06 мг/л, следует считать устойчивыми ко всем фторхинолонам. Из рекомендаций EUCAST и КР исключены пограничные значения диаметров зон подавления роста для ципрофлоксацина при тестировании штаммов *Salmonella*, поскольку показано, что полученные результаты недостоверны при тестировании штаммов *Salmonella* [20].

Если в лаборатории нет технической возможности определить МПК ципрофлоксацина, допускается определение чувствительности к фторхинолонам ДДМ. В этом случае в качестве предиктора чувствительности/резистентности к этой группе препаратов следует использовать диск с пefлоксацином (5 мкг): штамм *Salmonella* расценивают как «чувствительный» к фторхинолонам, если диаметр зоны подавления роста составляет 24 мм и выше, «устойчивый» - менее 24 мм. Учитывая отсутствие категории «умеренно-устойчивый» для пefлоксацина, а также возможные «технические» колебания результатов ДДМ в пределах 1-2 мм, существует вероятность ошибочной интерпретации результатов, особенно если зона подавления роста составляет 23-25 мм. Объективно оценивая возможные сложности при интерпретации результатов, EUCAST рекомендовал использовать

для тестирования диски пefлоксацина тех производителей, которые при тестировании референс - штамма *E. coli* ATCC 25922 дают зону подавления роста 28 ± 1 мм.

По данным референс-центра по мониторингу возбудителя брюшного тифа (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) в РФ в 2005-2017 г. практически все изученные штаммы *S. Typhi*, устойчивые к фторхинолонам, имели хромосомный механизм резистентности [21]. Исследования, проводимые в различных странах в отношении устойчивых штаммов *Salmonella* других сероваров, указывают на то, что хромосомный механизм является ведущим при формировании устойчивости к хинолонам [15]. Учитывая тот факт, что налидиксовая кислота является достоверным маркером данного механизма резистентности, целесообразно включать диск налидиксовой кислоты наряду с пefлоксацином в тестирование *Salmonella* ДДМ.

В редких случаях возможно возникновение устойчивости к фторхинолам вследствие плазмидопосредованных механизмов (гены *qnr*; *aac(6')-Ib-cr*) [22]. В этом случае у штамма *Salmonella* возникает «парадоксальный» фенотип устойчивости к хинолонам: МПК ципрофлоксацина повышается до 0,12-0,5 мг/л (устойчивость низкого уровня), но штамм остается чувствительным к налидиксовой кислоте (МПК менее 16,0 мг/л; диаметр зоны подавления роста 16 мм и более). В этом случае использование диска налидиксовой кислоты в дополнение к пefлоксацину при тестировании штаммов *Salmonella* помогает дифференцировать механизмы устойчивости (рис. 1).

Определение чувствительности штаммов *Salmonella* к бета-лактамам. Устойчивость энтеробактерий к бета-лактамам АМП вызвана в большинстве случаев инактивацией антибиотика ферментами бета-лактамазами. Спектр активности бета-лактамазы, продуцируемой штаммом энтеробактерий, обуславливает фенотип устойчивости к группам бета-лактамов: аминопенициллинам, ЦРС, карбапенемам. По данным национальных систем надзора стран Европы и США, доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к аминопенициллинам, составляла 29,5 и 12,4%, соответственно [1; 23] и обусловлена, продукцией бета-лактамазы широкого спектра TEM-1; бета-лактамазы генетических семейств SHV и OXA выявлены значительно реже [23]. Такая



Рис. 1. Алгоритм определения чувствительности штаммов *Salmonella* к фторхинолонам диско-диффузионным методом. d - диаметр зоны подавления роста.

устойчивость преодолевается «ингибиторозащищенными» пенициллинами и ЦРС, поэтому не имеет клинического значения.

Устойчивость к ЦРС у энтеробактерий обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС): «классических» молекулярного класса А по классификации Ambler (подавляются такими ингибиторами β-лактамаз как клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам), цефалоспоринов молекулярного класса С (AmpC), не чувствительных к классическим ингибиторам. В 1980-х г. г. появились штаммы *Salmonella*, устойчивые к ЦРС, причём распространение таких штаммов отмечено даже в странах с низкими доходами, где использование цефалоспоринов ограничено из-за их относительно высокой стоимости. Согласно данным национальных систем надзора стран Евросоюза, США, Канады высокая частота устойчивости к ЦРС характерна для определённых сероваров *Salmonella*: *S. Kentucky* (17,1%), *S. Dublin* (66,7%), *S. Heidelberg* (31,0%), *S. Infantis* (от 2,6 до 6,9%), монофазная *Salmonella* 1,4,5,12:i:- (6,0%) [1; 22-24]. В РФ доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, составляет от 0 до 45,3%, и характерна для сероваров *S. Typhimurium* и *S. Enteritidis* [10-13].

Молекулярно-генетические исследования показали, что у штаммов *Salmonella* распространена продукция БЛРС генетического семейства CTX-M, цефалоспориноаз AmpC генетического семейства CMY-2. В Корее доля штаммов, устойчивых к ЦРС, за период с 2010 по 2017 г. г. выросла с 0 до 25,0%, выявлена продукция CTX-M79, CTX-M15, CMY-2 [25]. По данным национальной системы надзора США в 2015 г. в коллекции штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, в подавляющем большинстве выявлены гены *bla*_{CMY} у единичных штаммов - *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} [23]. В РФ выявлена продукция БЛРС генетического семейства CTX-M у сероваров *S. Typhimurium*, *S. Virchow*, *S. Enteritidis* и цефалоспориноазы CMY-2 у штаммов *S. Newport* [11; 26; 27].

Особое клиническое значение имеет устойчивость к бета-лактамам у штаммов *S. Typhi*, поскольку при брюшном тифе обязательно проводят антимикробную терапию, причём ЦРС являются препаратами первой линии при лечении детей и пациентов пожилого возраста. У штаммов *S. Typhi*, так же как и у других сероваров *Salmonella*, устойчивость к аминопенициллинам обусловлена продукцией бета-лактамазы широкого спектра TEM-1. Такие штаммы характеризуются множественной устойчивостью к ампициллину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, тетрациклину, детерминанты резистентности к этим АМП локализованы на плазмиде. Исследования, проведенные в 1995-2015 г. г. в азиатских странах, на которые ежегодно приходится до 80,0% случаев брюшного тифа (Индия, Вьетнам, Непал, Бангладеш, Камбоджа, Лаос, Тайланд, Китай), показали, что доля таких штаммов *S. Typhi* составляла от 16,0 до 37,0% [28; 29].

Штаммы *S. Typhi*, устойчивые к ЦРС, в мире выделяются редко. В странах Азии (Индия, Кувейт, Нигерия, Корея, Пакистан, Бангладеш), Африки (Нигерия, Конго) идентифицированы штаммы, продуцирующие как «классические» БЛРС генетических семейств CTX-M (как правило, CTX-M15), SHV-12, так и цефалоспориноазы AmpC (CMY-2, ACC-1). Штаммы, выделенные в европейских странах (Германия, Норвегия, Нидерланды, Испания) и США, имели азиатское происхождение [22; 30-35]. В РФ по данным референс-центра в 2005-2016

г. г. доля штаммов *S. Typhi*, устойчивых к аминопенициллинам, продуцировавших TEM-1, составляла около 3,0%, штаммы, устойчивые к ЦРС, не выявлены [21].

Детекция БЛРС у штаммов *Salmonella* рекомендована в рамках проведения инфекционного контроля. Согласно руководству EUCAST по детекции механизмов резистентности к АМП для этих целей следует тестировать так называемые «индикаторные» препараты из группы ЦРС: цефтазидим и цефотаксим [36]. Поскольку БЛРС различных генетических семейств характеризуются субстратной специфичностью, что может выражаться в больших различиях в значениях МПК между цефотаксимом и цефтазидимом, при скрининге следует тестировать оба эти препарата. Тесты, подтверждающие продукцию БЛРС у штаммов *Salmonella*, следует проводить в том случае, если МПК цефотаксима и/или цефтазидима превышает 1,0 мг/л или диаметр зоны подавления роста вокруг диска с цефотаксимом (5 мкг) и цефтазидимом (10 мкг) составляет менее 22 и 21 мм, соответственно. В основе подтверждающих тестов лежит выявление синергизма между цефотаксимом/цефтазидимом и ингибитором бета-лактамаз класса А – клавулановой кислотой. Для этого можно использовать любой из методов: комбинированных дисков (сравнение зон подавления роста вокруг дисков с цефалоспоринами и их комбинаций с клавулановой кислотой); двойных дисков (выявление «пробки шампанского» - расширения зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином в сторону диска с амоксициллин/клавулановой кислотой); градиентной диффузии и разведений в бульоне, основанные на сравнении МПК цефалоспоринов и их комбинаций с клавулановой кислотой [36]. У штаммов, одновременно продуцирующих классические БЛРС и AmpC, результаты подтверждающих тестов могут быть неопределёнными или ложноотрицательными. Для подтверждения продукции БЛРС у таких штаммов рекомендуется проводить тесты синергизма, используя цефепим, который не гидролизуется AmpC β-лактамазами.

Фенотипическая дифференциация «классических» БЛРС и AmpC у энтеробактерий основана на определении чувствительности к цефокситину (при высоком уровне экспрессии AmpC МПК цефокситина превышает 8,0 мг/л) и флуксациллину, который является эффективным ингибитором AmpC-бета-лактамаз. В этом случае для метода комбинированных дисков используются диски или таблетки, содержащие цефотаксим и цефтазидим в сочетании с клавулановой кислотой и флуксациллином [36]. Доступны наборы производства MAST (Великобритания), Rosco (Дания), Liophilchem (Италия). Алгоритм выявления БЛРС и AmpC у штаммов *Salmonella* представлен на рис. 2.

В последние годы у штаммов энтеробактерий, вызывающих инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), с высокой частотой обнаруживают устойчивость к карбапенемам, ранее являющимся препаратами резерва для инфекций, вызванных полирезистентными возбудителями. Основной механизм резистентности энтеробактерий к этой группе препаратов - продукция карбапенемаз: сериновых молекулярных классов А (KPC и др.), D (OXA-48 и др.), металло-бета-лактамаз молекулярного класса В (NDM, VIM, IMP и др.). Несмотря на то, что карбапенемы не используют для лечения сальмонеллёзов, штаммы *Salmonella* различных сероваров, продуцирующие карбапенемазы, выделены от людей, животных и из продуктов животного

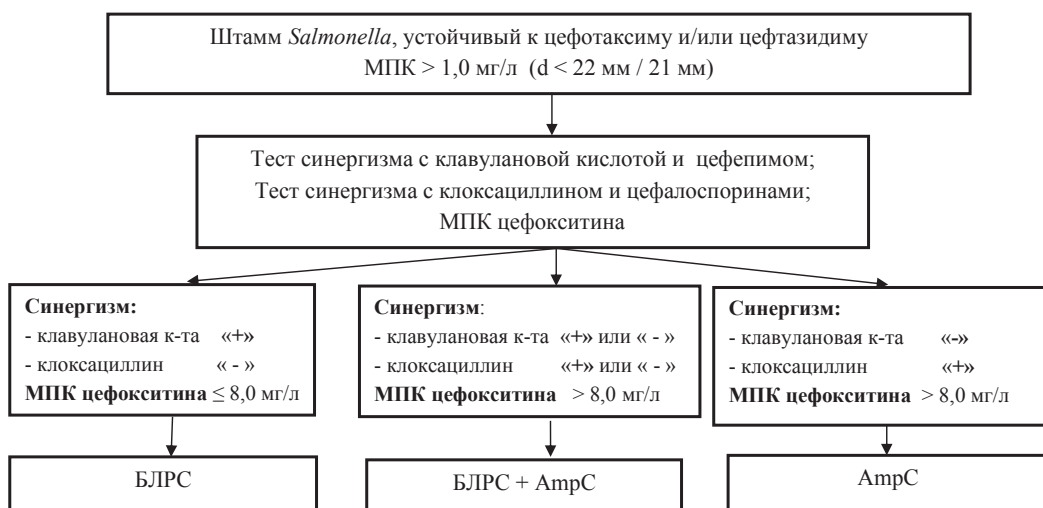


Рис. 2. Алгоритм детекции БЛРС и цефалоспориноаз AmpC у штаммов *Salmonella*.

МПК- минимальная подавляющая концентрация; d - диаметр зоны подавления роста; БЛРС – бета-лактамаза расширенного спектра; AmpC – цефалоспориноаза AmpC; «+» - положительный результат теста, синергизм выявлен; «-» - отрицательный результат теста, синергизм не выявлен.

происхождения в Великобритании, Франции, Германии, Швейцарии, США, Китае, Индии, Пакистане, Австралии, Марокко, Колумбии. Во многих случаях отмечено, что инфицирование людей произошло в странах Индийского субконтинента и Африки [37]. У штаммов *Salmonella* обнаружены карбапенемазы пяти генетических семейств, имеющие высокую клиническую значимость: KPC (S. Typhimurium, S. Cubana), OXA-48 (S. Typhimurium, S. Kentucky, S. Saintpaul), металло-бета-лактамазы IMP (S. Waycross, S. Typhimurium), VIM (S. Kentucky, S. Infantis), NDM (S. Seftenberg, S. Stanley, S. Agona, S. Indiana, S. Corvallis, S.1,4,5,12:i:-). Пока не выявлены устойчивые штаммы S. Typhi, но резистентность к карбапенемам, обусловленная продукцией OXA-48, описана у штамма S. Paratyphi B, выделенного в 2013 г. в Великобритании от пациента, вернувшегося из Африки [37].

Выявление продукции карбапенемаз у штаммов энтеробактерий может вызвать трудности в том случае, если значения МПК карбапенемов у штаммов-продуцентов не достигают пограничных значений вследствие низкого уровня экспрессии. При детекции карбапенемаз скрининговые значения отличаются от клинических пограничных значений [36]. Меропенем (из группы карбапенемов) характеризуется наилучшим сочетанием чувствительности и специфичности при детекции карбапенемаз: подозрение на продукцию карбапенемаз вызывают штаммы с МПК > 0,12 мг/л (зона подавления роста < 28 мм).

При выявлении «подозрительного» штамма рекомендовано выполнить фенотипические подтверждающие тесты, основанные на выявлении синергизма меропенема и ингибиторов различных карбапенемаз. Доступны методы комбинированных дисков MAST (Великобритания), Rosco (Дания), Liophilchem (Италия), в состав которых входят диски или таблетки, содержащие меропенем и его комбинации с ингибиторами: бороновой кислотой (ингибитор карбапенемаз молекулярного класса A), дипикколиновой кислотой или EDTA (ингибиторы карбапенемаз класса B), клоксациллином (ингибитором AmpC β-лактамаз).

Доступны отечественные тест-системы для ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс®MDR MBL-FL», «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ) для детекции генов наиболее распространенных карбапенемаз у штаммов или в пробах клинического материала. Алгоритм, рекомендуемый для выявления карбапенемаз у штаммов *Salmonella* представлен на рис. 3.

Определение чувствительности штаммов *Salmonella* к бета-лактамам не вызывает методических затруднений при условии тестирования индикаторных препаратов и постановки подтверждающих тестов (фенотипических или молекулярных). Экспертная оценка результатов остается предметом дискуссий. Согласно рекомендациям EUCAST, используемые методы тестирования и пограничные значения позволяют выявить устойчивость к бета-лактамам у большинства штаммов энтеробактерий, включая *Salmonella*, продуцирующих различные бета-лактамазы (БЛРС, AmpC, карбапенемазы), поэтому дополнительное подтверждение продукции БЛРС или карбапенемазы не является обязательным. В тоже время, часть штаммов с низким уровнем продукции бета-лактамаз могут попадать в категорию «чувствительный» или «умеренно резистентный». Из экспертных правил EUCAST исключены рекомендации о том, что штаммы с подтвержденной продукцией БЛРС (или карбапенемаз) следует расценивать как устойчивые ко всем цефалоспорином и азтреонаму (или карбапенемам). Для таких штаммов существует вероятность неэффективности лечения соответствующими бета-лактамами АМП. По мнению многих авторов степень доказательств эффективности бета-лактамов в отношении штаммов с низким уровнем продукции бета-лактамаз недостаточна. Значения МПК или диаметров зон, полученные рутинными методами, могут варьировать в зависимости от используемых сред, дисков, методов и квалификации персонала. В отличие от EUCAST, российские КР (2014, 2015, 2018 г. г.) рекомендуют информировать клинициста о

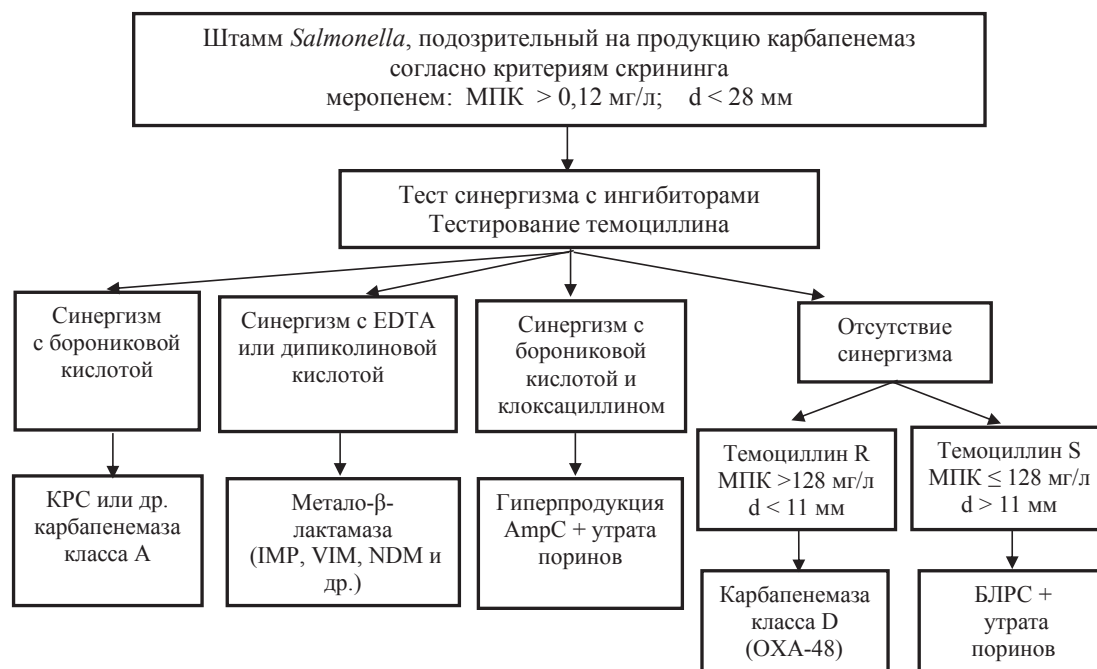


Рис. 3. Алгоритм детекции карбапенемаз у штаммов *Salmonella*. AmpC – цефалоспориноаза AmpC; БЛРС – бета-лактамаза расширенного спектра; МПК- минимальная подавляющая концентрация; d - диаметр зоны подавления роста; R – резистентный; S- чувствительный; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

возможной нечувствительности штамма-продуцента БЛРС (или карбапенемазы) к цефалоспорином и азтреонаму (или карбапенемам), даже если этот штамм формально попадает в категорию «чувствительный» [14].

При тестировании возбудителя брюшного тифа, учитывая генерализованный характер инфекции и возможность тяжёлых осложнений, в случае выявления продукции БЛРС (или карбапенемазы) штамм *S. Typhi* следует расценивать как «устойчивый» ко всем цефалоспорином (или карбапенемам) независимо от полученных результатов тестирования.

Определение чувствительности штаммов *Salmonella* к азитромицину. В связи с высокими уровнями устойчивости к фторхинолонам штаммов *Salmonella* во многих странах для лечения брюшного тифа и сальмонеллёзов используют азитромицин [7; 8; 38]. Из-за отсутствия критериев интерпретации при определении чувствительности к азитромицину методами разведений или ДДМ, чувствительность штаммов *Salmonella* к этому препарату можно оценить только ориентировочно, сравнивая МПК штамма со значениями, полученными для «дикой» популяции (штаммы, которые не имеют механизмов резистентности): по данным EUCAST большая часть популяции *Salmonella* имеет диапазон МПК азитромицина от 4,0 до 16,0 мг/л. Масштабное исследование более 1500 штаммов *S. Typhi*, выделенных в семи азиатских странах, показало, что для 99,5% штаммов МПК азитромицина не превышала 16 мг/л и лечение азитромицином пациентов, инфицированных такими штаммами, было успешным в 91% случаев [28].

Согласно рекомендациям EUCAST и КР азитромицин используют при лечении инфекции, вызванных штаммам *S. Typhi*, у которых МПК не превышает 16 мг/л. Использо-

вание ДДМ для определения чувствительности к азитромицину осложняется тем, что зона подавления роста *S. Typhi* вокруг диска с этим антибиотиком формирует нечёткую границу, диаметр зоны не имеет прямой зависимости от МПК. Для штаммов с МПК 8,0 мг/л диаметр зоны может колебаться от 13 до 25 мм [28]. Для определения чувствительности к азитромицину следует использовать методы, позволяющие получить значение МПК азитромицина.

Закключение. Род *Salmonella* включает более 2500 серологических вариантов, не более 100 сероваров вызывают заболевания у человека, а широкое эпидемическое распространение имеют 40-50 из них. Учитывая неуклонный рост резистентности к клинически значимым препаратам, у штаммов *Salmonella* необходимо определять чувствительность к АМП не только с целью назначения адекватной этиотропной терапии, но и для мониторинга чувствительности/резистентности штаммов разных серологических вариантов, результаты которого должны учитываться при формировании тактики эмпирической антимикробной терапии сальмонеллёзов, включая брюшной тиф. Особенности определения чувствительности к АМП у штаммов *Salmonella* заключаются в том, что для локализованной (гастроинтестинальный вариант) и генерализованной (тифоподобный и септический варианты) форм инфекции используют разные подходы к тестированию и интерпретации результатов для хинолонов по сравнению с другими энтеробактериями. В бланке направления пробы биологического материала в диагностическую лабораторию для выявления бактерий рода *Salmonella* должна быть указана форма заболевания (локализованная или генерализованная).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (1-4, 7-9, 11, 15-20, 22-25, 28-38 см. REFERENCES)

5. Клинические рекомендации (протокол ведения) «Сальмонеллез у взрослых». ФГБУ ВПО «Дагестанская государственная медицинская академия» МЗ РФ, ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ России. Available at: <http://nnoi.ru/uploads/files/Salmonelles.pdf>
6. Клинические рекомендации (протокол лечения) оказания медицинской помощи детям, больным сальмонеллезом. ФГБУ НИИДИ ФМБА России. Утв. 09.10.2013. Available at: <http://niidi.ru/dotAsset/6501246b-27f5-4d17-964d-7dc4defb8b43.pdf>
10. Милютин Л.Н., Гурьева О.В. Эволюция лекарственной резистентности сальмонелл, выделенных от детей, и ее клиническая значимость. *Лаборатория*. 2011; 3: 5-7.
12. Гончар Н.В., Лазарева И.В., Рычкова С.В., Кветная А.С., Альшаник Л.П., Фомичева Ю.В. и др. Заболеваемость детей сальмонеллезом и уровень резистентности клинических штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам в Санкт-Петербурге. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(1): 80-6.
13. Жирнова Л.Ю., Уткина Н.П., Сихандо Л.Ю., Пеленко Т.Ф., Егорова С.А., Кафтырева Л.А. и др. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2015 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6(3): 27.
14. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>
21. Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Макарова М.А., Тюленев С.В., Трифонова Г.Ф., Калинина О.В. Особенности резистентности к антимикробным препаратам возбудителя брюшного тифа, зарегистрированного на территории Российской Федерации в 2005-2016 гг. *Профилактическая и клиническая медицина*. 2017; 2(63): 14-9.
26. Козырева В.К., Эйдельштейн М.В., Тапальский Д.В., Азизов И.С., Романов А.В., Козлов Р.С. Клональное распространение СТХ-М-5-продуцирующих нозокомиальных штаммов *Salmonella* Typhimurium в России, Беларуси и Казахстане. *Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия*. 2012; 14(1): 38-50.
27. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Войтенкова Е.В., Смирнова Е.В., Толузакова Н.В., Черткова С.А. Механизмы резистентности к фторхинолонам и цефалоспорином штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2016 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2016; 6(3): 23.

REFERENCES

1. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*. 2017; 15(12): 5077.
2. Sirinavin S., Garner P. Antibiotics for treating *Salmonella* gut infections. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2000; 2: CD001167.
3. Crump J.A., Sjölund-Karlsson M., Gordon M.A., Parry C.M. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28 (4): 901-37.
4. Riddle M.S., DuPont H.L., Bradley A. Connor B.A. ACG Clinical Guideline: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Acute Diarrheal Infections in Adults. *Am. J. Gastroenterol.* 2016; 111: 602-22.
5. Guidelines (protocol of treatment) "Salmonellosis in adults". Available at: <http://nnoi.ru/uploads/files/Salmonelles.pdf>. (in Russian)
6. Guidelines for treatment of salmonellosis in children. Available at: <http://niidi.ru/dotAsset/6501246b-27f5-4d17-964d-7dc4defb8b43.pdf>. (in Russian)
7. Guarino A., Ashkenazi S., Gendrel D., Vecchio A.L., Shamir R., Szajewska H. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/ European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of

- acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014; 59(1): 132-52.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Yellow Book, 2017, Chapter 2. Travelers' Diarrhea. Available from <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/the-pre-travel-consultation/travelers-diarrhea>.
9. The European Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA Journal*. 2016; 2:5182.
10. Milyutina L.N., Gur'eva O.V. Evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from children, and its clinical significance. *Laboratoriya*. 2011; 3: 5-7. (in Russian)
11. Egorova S., Kaftyreva L., Grimont P.A.D., Weill F-X. Prevalence and characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant non-typhoidal *Salmonella* isolates in adults in St-Petersburg, Russia (2002-2005). *Microbial Drug Resistance*. 2007; 13(2):102-7.
12. Gonchar N.V., Lazareva I.V., Rychkova S.V., Kvetnaya A.S., Al'shanik L.P., Fomicheva Yu.V. et al. Salmonellosis in children and antimicrobial resistance of *Salmonella* in Saint-Petersburg. *Zhurnal infektologii*. 2015; 7(1): 80-6. (in Russian)
13. Zhirnova L.Yu., Utkina N.P., Sikhando L.Yu., Pelenko T.F., Egorova S.A., Kaftyreva L.A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated in Saint-Petersburg in 2014-2015. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6(3): 27. (in Russian)
14. Guidelines "Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms". Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>. (in Russian)
15. Piddock L.J. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002; 26: 3-16.
16. Crump J.A., Kretsinger K., Gay K. Clinical response and outcome of infection with *Salmonella enterica* serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States FoodNet multicentre retrospective study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52: 1278-84.
17. Parry C.M., Ho V.A., Phuong L.T., Van Be Bay P., Lanh M.N., Tung L.T. et al. Randomized controlled comparison of ofloxacin, azithromycin, and an ofloxacin-azithromycin combination for treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 819-25.
18. Dolecek C., Phi La T.T., Rang N.N., Phuong L.T., Vinh H., Tuane P.Q. et al. A Multi-Center Randomised Controlled Trial of Gatifloxacin versus Azithromycin for the Treatment of Uncomplicated Typhoid Fever in Children and Adults in Vietnam. *PLoS ONE*. 2008; 3(5): e2188.
19. Thompson C.N., Karkey A., Dongol S., Arjyal A., Wolbers M., Darton T. et al. Treatment Response in Enteric Fever in an Era of Increasing Antimicrobial Resistance: An Individual Patient Data Analysis of 2092 Participants Enrolled into 4 Randomized, Controlled Trials in Nepal. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64 (11): 1522-1531.
20. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints
21. Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Makarova M.A., Tjulenev C.V., Trifonova G.F., Kalinina O.V. Features of antimicrobial resistance of S.Typhi isolated in Russian Federation in 2005-2016. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2017; 2(63): 14-9. (in Russian)
22. Rodriguez-Martinez J.M., Cano M.E., Velasco C., Martinez-Martinez L., Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J. Infect. Chemother.* 2011; 17(2): 149-182.
23. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2015 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018. Available at: https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf
24. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) annual report, 2013. Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-2013-annual-report.html>

25. Jeon H.Y., Kim Y.B., Lim S.K., Lee Y.J., Seo K.W. Characteristics of cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates from poultry in Korea, 2010–2017. *Poultry Science*. 2019; 98(2): 957-965.
26. Kozyreva V.K., Eydel'shteyn M.V., Tapal'skiy D.V., Azizov I.S., Romanov A.V., Kozlov R.S. Clonal expansion of CTX-M-5-producing nosocomial *Salmonella* Typhimurium in Russian, Belarus and Kazakhstan. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya terapiya*. 2012;14(1):38-50. (in Russian)
27. Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Voytenkova E.V., Smirnova E.V., Toluzakova N.V., Chertkova S.A. Resistance mechanisms of *Salmonella* isolated in Saint-Petersburg in 2014-2016 to fluoroquinolones and cefaphosporins. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6(3): 23. (in Russian)
28. Parry C.M., Thieu N.T.V., Dolecek C., Karkey A., Gupta R., Turner P. et al. Clinically and microbiologically derived azithromycin susceptibility breakpoints for *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2015; 59:2756-64.
29. Kuijpers L.M.F., Phe T., Veng C.H., Lim K., Ieng S., Kham C. et al. The clinical and microbiological characteristics of enteric fever in Cambodia, 2008-2015. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2017; 11(9): e0005964.
30. Hendriksen R.S., Leekitcharoenphon P., Mikoleit M., Jensen J.D., Kaas R.S., Roer L. et al. Genomic dissection of travel-associated extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates originating from the Philippines: a one-off occurrence or a threat to effective treatment of typhoid fever? *J. Clin. Microbiol*. 2015; 53(2): 677-80.
31. Gul D., Potter R.F., Riaz H., Ashraf S.T., Wallace M.A., Munir T. et al. Draft genome sequence of a *Salmonella enterica* serovar Typhi strain resistant to fourth-generation cephalosporin and fluoroquinolone antibiotics. *Genome Announc*. 2017; 5:e00850-17.
32. Akinyemi K.O., Iwalokun B.A., Alafe O.O., Mudashiru S.A., Fakorede C. *bla* CTX-M-I group extended spectrum beta lactamase-producing *Salmonella* Typhi from hospitalized patients in Lagos, Nigeria. *Infect. Drug. Resist*. 2015; 11(8): 99-106.
33. Akinyemi K.O., Iwalokun B.A., Oyefolu A.O., Fakorede C.O. Occurrence of extended-spectrum and AmpC β -lactamases in multiple drug resistant *Salmonella* isolates from clinical samples in Lagos, Nigeria. *Infect. Drug Resist*. 2017; 10:19-25.
34. Ahamed Riyaaz A.A., Perera V., Sivakumaran S., de Silva N. Typhoid Fever due to Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serovar Typhi: A Case Report and Literature Review. *Case Reports in Infectious Diseases*. 2018; Article ID 4610246.
35. Ramachandran A., Shanthi M., Sekar U. Detection of *bla*_{CTX-M} Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Salmonella enterica* Serotype Typhi in a Tertiary Care Centre. *J. Clin. Diagn. Res*. 2017; 11(9): DC21-DC24.
36. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017-07-11). Available at: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms
37. Fernández J., Guerra B., Rodicio M.R. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. *Veterinary sciences*. 2018; 5(2): 40.
38. Effa E.E., Bukirwa H. Azithromycin for treating uncomplicated typhoid and paratyphoid fever (enteric fever). *Cochrane Database Syst. Rev*. 2011;5(10): CD006083.

Поступила 23.04.19

Принята к печати 30.04.19

ДИАГНОСТИКА ГИАРДИАЗА У ДЕТЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ МИКРОСКОПИИ, ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА, ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 414000, Астрахань, Россия

Гиа́рдиаз у детей остается актуальной проблемой, значимость которой определяется эндемичностью для многих стран и регионов, полиморфизмом клиники, что обуславливает трудности клинической диагностики этой патологии. Представлены результаты диагностической значимости методов лабораторной диагностики гиа́рдиаза: микроскопии нативного и окрашенного раствором Люголя препарата фекалий, иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие антител класса IgM и IgG к антигенам лямблий в сыворотке крови и антигена G. Lamblia в кале, полимеразной цепной реакции (ПЦР) - обнаружение ДНК лямблий в кале, полученные при обследовании 160 больных гиа́рдиазом детей в возрасте от 3 до 14 лет. Результаты исследования позволяют считать, что наиболее информативными методами диагностики лямблиоза у детей является копроскопия (специфичность - 96,2%, чувствительность - 98,1%), ПЦР копрофильтрата (специфичность - 85%, чувствительность 82,5%), определение антигена в кале методом ИФА (специфичность - 87,5%, чувствительность - 60%). При высокой специфичности метода ИФА крови (90%), чувствительность метода составляет только 27,5%. «Золотым стандартом» диагностики гиа́рдиаза остается микроскопия нативного и окрашенного раствором Люголя препарата фекалий с проведением трёхкратного исследования с интервалом в 2-3 дня.

Ключевые слова: дети; гиа́рдиаз; лабораторная диагностика; микроскопия; ИФА; ПЦР.

Для цитирования: Кимирилова О. Г., Харченко Г. А. Диагностика гиа́рдиаза у детей с применением методом микроскопии, иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64(6): 376-379. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2019-64-6-376-379>

Kimirilova O. G., Kharchenko G. A.

DIAGNOSIS OF GIARDIOSIS IN CHILDREN: RESULTS OF A RETROSPECTIVE COHORT STUDY

Astrakhan State Medical University, 414000, Astrakhan, Russia

Giardiasis in children remains an urgent problem, the importance of which is determined by the endemicity for many countries and regions, polymorphism of the clinic, which causes difficulties in clinical diagnosis of this pathology.

The report presents the results of the diagnostic significance of methods of laboratory diagnostics giardiase: microscopy of native and stained with Lugol solution preparation fecal enzyme-linked immunoassay (ELISA) for the presence of antibodies of class IgM and IgG antibodies to the antigens of Giardia in the serum and antigen of G. Lamblia in feces, polymerase chain reaction (PCR) - detection of Giardia DNA in feces obtained during the examination of 160 patients with giardiasis children aged 3 to 14 years. The results of our study suggest that the most informative methods of diagnosis of giardiasis in children is coproscopy (specificity - 96.2%, sensitivity - 98.1%), PCR coprofiltrate. (specificity - 85%, sensitivity 82.5%), determination of antigen in feces by ELISA (specificity - 87.5%, sensitivity - 60%). With high specificity of the blood ELISA method (90%), the sensitivity of the method is only 27.5%. It should be recognized that the «gold standard» diagnosis of giardiasis remains microscopy of native and stained with a solution of Lugol preparation of feces with a three - time study at intervals of 2-3 days.

Key words: children; giardias; microscopy of feces; EFA; blood; stool EFA; PCR of feces.

For citation: Kimirilova O.G., Kharchenko G.A. The results of the diagnosis of giardiasis in children with the use of the method of microscopy, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (6): 376-379 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-376-379>

For correspondence: Kimirilova Olga Gennadievna; e-mail: Olgakim@mail.ru

Information about authors:

Kimirilova O. G., <http://orcid.org/0000-0003-4066-2431>.

Kharchenko G. A., <http://orcid.org/0000-0001-7764-0995>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 29.03.2019
Accepted 05.04.2019

Гиа́рдиаз - часто встречающееся заболевание человека, которое вызывается простейшими *Giardia lamblia*. Показатель заболеваемости гиа́рдиазом, на различных территориях Российской Федерации, у детей от 100 до 350 и более на 100 тыс. детского населения [1,2]. Существуют лямблии в виде вегетативной и цистной форм.

Инцистирование происходит в дистальных отделах тонкой и ободочной кишки [3]. Выделение цист из кишечника происходит не постоянно, а с промежутками в 8-12 дней. Длительность паразитирования лямблий в кишечнике - от нескольких дней до 8-9 мес, возможно персистирование паразита, как следствие аутоинвазии [4]. Гиа́рдиаз у детей часто протекает в виде различных вариантов гастроэнтерологической патологии (гастрит, холецистит, энтерит и др.) с рецидивирующим течением [5 - 7]. Манифестные формы гиа́рдиаза характеризуются

Для корреспонденции: Кимирилова Ольга Геннадьевна, канд.мед. наук, доц. каф. детских инфекций; e-mail: Olgakim@mail.ru

наличием диарейного синдрома, болей в животе, тошноты, рвоты. При длительной инвазии на первый план выступают признаки дисбиоза кишечника, лактазной недостаточности [8, 9].

Основным методом диагностики гiardиаза является выявление цист и вегетативных форм паразита в кале и дуоденальном содержимом. В последние годы чаще стал использоваться метод ИФА для определения специфических антигенов лямблий в кале, антител к антигенам лямблий в крови (IgM, IgG) и ПЦР для обнаружения ДНК лямблий в кале [10].

В основе ИФА лежит использование антител к трофозоитам или моноспецифических антител к антигенам паразитов. Выявляемость возбудителя составляет 50-70% при первичном анализе и повышается до 90% при трёхкратном исследовании [11]. По результатам ИФА исследования крови можно судить о течении болезни (острое или хроническое течение).

ПЦР позволяет определять наличие не только живых паразитов, но и их фрагменты после гибели [12]. Обобщающие сведения о результатах диагностики гiardиаза представлены в научных работах [12–14]. Оценка результатов диагностики авторов этих работ существенно различаются и могут быть обусловлены различным методологическим качеством исследований.

Цель исследования - установить диагностическую значимость методов лабораторной диагностики (микроскопии кала, ИФА, ПЦР) при гiardиазе у детей.

Материал и методы. Проведено ретроспективное, когортное исследование. Критериями включения в исследование являлись дети в возрасте от 3 до 14 лет, наличие в медицинской документации письменного согласия родителей или законного представителя ребёнка на обработку данных и их использование в научных целях. Учитывали случаи болезни, подтверждённые по месту обследования положительными результатами: а) 3-х кратного (с интервалом в 2 сут) исследования кала на цистные формы *G. lamblia*, методом микроскопии нативного и окрашенного раствором Люголя препарата; б) ИФА крови (наличие антител класса IgM к антигенам лямблий в сыворотке крови пациента); в) ИФА кала (наличие антигена лямблий в кале); г) ПЦР кала (наличие ДНК лямблий в кале). Источниками информации являлись амбулаторные карты и результаты обследования 160 пациентов с верифицированным диагнозом гiardиаз, в возрасте от 3 до 14 лет, за период с января 2015 по январь 2018 года.

Определение антител к лямблиям в крови методом ИФА проводилось с использованием конъюгата моноклональных антител против иммуноглобулинов человека с пероксидазой хрена (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), позволяющим определять IgG, IgA, IgM.

Определение антигена *Giardia lamblia* в кале мето-

дом ИФА, с применением моноклональных антител к антигену GSA-65 (R- Biopharm, Ag, Германия).

ПЦР диагностика лямблий в кале проводилась с использованием набора «ДНК-экспресс» (НПФ «Литех», Москва).

Взятие биоматериала для обнаружения цист лямблий методом микроскопии проводилось при амбулаторном обращении. Определение антигена в кале, антител в крови методом ИФА, ДНК паразита методом ПЦР проводилось после получения результатов микроскопического исследования (до начала лечения).

Заключение этического комитета на проведение исследования не запрашивалось.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета «Statistica 6,0 (Stat. Soft, USA)». Количественные показатели оценивали по среднему арифметическому значению и стандартному отклонению. Сравнение количественных показателей в 4 группах обследованных (микроскопия кала, ИФА крови, ИФА кала, ПЦР копрофильтрата) выполнено с применением дисперсионного анализа качественных показателей с применением критерия χ -квадрат.

Результаты. Из 160 детей, находившихся под наблюдением, 144 (90%) составляли дети из организованных коллективов (дошкольные учреждения, школьники младших классов) проживающие в городе 140 (87,5%). В возрастной структуре больных гiardиазом преобладали дети в возрасте от 3 до 10 лет – 135 (84,4%), на долю детей в возрасте 11-14 лет приходилось 25 (15,6% случаев от общего количества больных). Во всех группах больных гiardиазом существенных различий частоты заболеваемости у мальчиков 79 (49,4% от общего числа больных) и девочек 81 (50,6%) не прослеживалось (табл. 1).

Клиническая симптоматика гiardиаза обуславливалась сочетанием болевого абдоминального, диспептического синдромов. Абдоминальный синдром характеризовался болями в области пупка у 72 (45%), эпигастрия у 10 (6%) детей, сочетающимися с болями в правом и левом подреберьях у 15 (9%) пациентов.

Клиническими симптомами диспептического синдрома являлись: снижение аппетита у 28,8%, тошнота у 17,3%, рвота у 9,2%, диарея у 71,5% пациентов, от общего количества больных.

Наличие дисбиотических нарушений (по результатам исследования микробного пейзажа кала) за счёт снижения количества бифидо- и лактобактерий определялось у 115 (72%), кишечной палочки у 105 (65%) и роста условно патогенных бактерий у 54 (33%) детей.

Микроскопия мазка кала на лямблии, с окраской 1% раствором Люголя, проведенная у 160 детей показала, что чувствительность данного метода исследования 98,1%, специфичность 96,2%.

Таблица 1

Группы детей, обследованных по поводу гiardиаза

Пол	Группы обследованных				p
	1-я (n=160)	2-я (n=40)	3-я (n=40)	4-я (n=40)	
девочки/мальчики, абс.	81/79	20/20	18/22	22/18	0,900
Возраст, годы	5,9±3,5	6,0±3,1	5,6±3,5	6,3±3,6	0,995

Примечание. 1-я группа - больные обследованные методом микроскопии кала; 2-я группа - методом микроскопии+ИФА крови; 3-я группа – методом микроскопии +ИФА кала; 4-я группа – методом микроскопии + ПЦР кала; p – значимость качественных показателей при $df=3$.

Диагностическая значимость методов лабораторной диагностики гиардиаза у детей

Метод исследования	Количество больных	Специфичность метода, %	Чувствительность метода, %
Копроскопия с окраской 1% раствором Люголя	160	96,2	98,1
Определение антител в сыворотке крови методом ИФА	40	90	27,5
Определение антигенов в кале методом ИФА	40	87,5	60
ПЦР диагностика кала	40	85	82,5

Методом ИФА исследовано 80 сывороток крови (от 40 больных в динамике, с интервалом 10 сут). Наличие специфических антител к антигену *G. lamblia* определялось у 36 (90%) детей в титре от 1:100 до 1:800 и более. Высокий титр антител от 1:800 до 1:1600 имел место при рецидивирующем варианте инвазии, 1:200 с нарастанием в динамике до 1:400 и более при остром течении, низкий 1:100 при бессимптомных формах гиардиаза. Диагностическая значимость ИФА выше при повторных заражениях лямблиями и при длительной персистенции паразитов, что может быть связано с сенсibilизацией иммунокомпетентных клеток антигенами лямблий при повторных заражениях [4]. При высокой специфичности (90%), чувствительность ИФА, на антитела к лямблиям в сыворотке крови 27,5%, что более чем в 3 раза ниже метода копроскопии (98,1%). Чувствительность ИФА для обнаружения антигена лямблий в кале уступает методу копроскопии (табл. 2). Специфичность и чувствительность ПЦР по обнаружению ДНК лямблий в кале достаточно высокая - 85% и 82,5% соответственно, но ниже метода микроскопии кала (табл. 2).

Обсуждение. Данные литературы по определению чувствительности и специфичности разных методов диагностики гиардиаза неоднозначны, что может обуславливаться отличиями методик и кратностью проведённых исследований. По данным [15] однократное микроскопическое исследование кала позволяет определить наличие лямблий у 54% пациентов, при трёхкратном исследовании число истинно положительных результатов увеличивается до 98%. В работе [9] отмечается, что чувствительность микроскопии кала 85% и более, специфичность - 100%. В нашем исследовании специфичность микроскопии кала составляла 96,2%, чувствительность 98,1%. Выделение цист лямблий из кишечника больного происходит не постоянно. Промежутки между выделением паразита могут составлять от 2 до 14 дней, что отрицательно сказывается на результатах исследования. Повышение эффективности методики до 90% и более достигается трёхкратным исследованием, с интервалом 3-4 дня, при использовании микроскопии с формалин-эфирным осаждением и окраской мазка 1% раствором Люголя [6, 15, 16]. Показатели ИФА крови по результатам исследований [9, 12] имеют чувствительность 20,4-36,5%, специфичность - 93-95% с прогностической значимостью положительных результатов ИФА 97%, отрицательных 22%. Данные исследования [17] прямо противоположные: истинно-положительные результаты составляют 2,9%, ложноотрицательные 14,8%, ложноположительные 26,8%, истинноотрицательные 55,5%. Специфичность ИФА исследования крови - 67,4%, чувствительность - 16,5%, прогностическая ценность положительных результатов - 9,8%, отрицательных - 21%. Приведённые параметры

результатов ИФА крови не позволяют дать однозначного заключения о наличии у пациента, текущего гиардиаза. Полученные нами данные позволяют считать, что ИФА исследование крови на лямблии имеет достаточно высокую специфичность - 90%, при низкой чувствительности - 27,5%. ИФА имеет ряд недостатков: лямблии являясь пристеночными паразитами не вызывают выраженный системный гуморальный ответ, приводящий к синтезу достаточного количества антител, у детей с вторичным иммунодефицитом антитела в сыворотке крови могут не определяться. Возможны перекрестные реакции антигенов лямблий с другими паразитарными и соматическими антигенами [4, 7, 13]. При оценке результатов ИФА исследования крови необходимо учитывать, что IgM появляются в крови в конце 2 нед болезни, IgG позже и могут сохраняться в крови более 6 мес. после перенесенного заболевания, что затрудняет использование методики с целью контроля эффективности лечения и выздоровления. Обнаружение антител класса IgG к антигенам лямблий не является безусловным основанием для постановки диагноза гиардиаза и назначения лечения. Возникает необходимость дополнительного обследования с целью обнаружения лямблий другими методами, в частности методом микроскопии. Результаты определения антител к *G. lamblia* позволяют установить стадию патологического процесса при гиардиазе: наличие IgM (при отсутствии IgG) указывает на острое течение гиардиаза, нарастание титра IgG (в сочетании или без IgM) свидетельствует о хроническом течении болезни или начале периода реконвалесценции острого гиардиаза. Чем выше титр антител в сыворотке крови больного, тем чаще наблюдается отрицательное цисто-выделение [4, 18].

Метод обнаружения антигенов лямблий в копро-фильtrate позволяет выявлять специфический антиген лямблий GSA-65. Антиген выявляется при численности паразитов в кишечнике ниже порога паразитологического метода и исчезает в течение 2 нед после элиминации лямблий. По результатам исследования [9,12] чувствительность метода 20,4%, специфичность 93,5%. Прогностическая значимость положительных результатов 83%, отрицательных 42,6%. По данным [11,17], чувствительность метода составила 90%, специфичность 98,5%. По нашим данным специфичность ИФА кала составляла 87,5%, чувствительность 60%.

Данные литературы по оценке результатов исследования кала методом ПЦР различаются незначительно чувствительность метода 78,8% и 62,7%, специфичность 89,8% и 88,8% [9, 12, 18]. Специфичность ПЦР исследования кала по нашим данным составляла 85%, чувствительность 82,5%

Заключение. Наиболее информативными методами диагностики лямблиоза у детей является копроскопия

(специфичность - 96,2%, чувствительность – 98,1%), ПЦР копрофильтрата. (специфичность – 85%, чувствительность 82,5%), определение антигена в кале методом ИФА (специфичность -87,5%, чувствительность - 60%). «Золотым стандартом» диагностики гиардиаза остается микроскопия нативного и окрашенного раствором Люголя препарата фекалий с проведением трёхкратного исследования с интервалом в 2-3 дня.

Ограничения исследования. В исследовании проанализированы результаты обследования только 160 (13%) случаев гиардиаза, от общего числа больных детей, зарегистрированных в Астраханской области в период исследования (Федеральное статистическое наблюдение. «Сведения о паразитарных заболеваниях»). Этот факт ограничивает распространение полученных результатов на все случаи гиардиаза у детей, включая бессимптомные формы болезни.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Бегайдинова Р.Х., Насакаева Г. Е., Кузбигекова А. Б., Юхневич-Насонова Е. А., Алтибекова А. Р. Клинико-эпидемиологическая характеристика лямблиоза. *Международный журнал экспериментального образования*. 2013; 10:70-5.
- Ершова И. Б., Мочалова А. А., Осипова Т. Ф. Усовершенствование терапии лямблиоза. *Актуальная инфектология*. 2015; 3 (8): 49-54.
- Лысенко А.Я., Владимиров М. Г., Кондрашин А. В., Майори Дж. *Клиническая паразитология*. Женева: ВОЗ; 2002.
- Сергиев В.П., Лобзин Ю.В., Козлов С.С. *Паразитарные болезни человека (протозоозы и гельминтозы)*. СПб.: Издательство Фолиант; 2006.
- Харченко Г. А., Буркин В. С. *Кишечные инфекции у детей раннего возраста*. Ростов- на -Дону: Издательство Феникс; 2007.
- Бехтерева М. И., Луппова Е. Н., Корниенко Е. А., Минина С. С. Рабочий протокол диагностики и лечения лямблиоза у детей. *Вопросы детской диетологии*. 2013; 6: 72-7.
- Приворотский В. Ф., Лупова Н. Е. Лямблиоз у детей: современное состояние проблемы. *Педиатр*. 2013; 4(3): 101-10.
- Бронштейн А. М., Малышев Н. А. *Гельминтозы человека*. Москва: Медицина; 2006.
- Корниенко Е.А., Минина С. Н., Фадиная С.А. Клиника, диагностика и лечение лямблиоза у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2009;6(4): 2-7.
- Одинцова В. Е., Александрова В. А. Методы диагностики и лечения глистно-протозойных инвазий у детей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. *Детские инфекции*. 2010;9(2): 58-66.
- Файзуллина Р.Г. Лямблиоз у детей: современные подходы к диагностике и лечению. *Практическая медицина*. 2008; 31: 56-61.
- Корниенко Е. А., Минина С. С., Фадиная С. А., Калинина Н. М., Суворов А. Н. Диагностика и лечение лямблиоза у детей. *Инфекционные болезни*. 2009; 1: 4-11.
- Файзуллина Р.А. Лямблиоз у детей: современные особенности клиники, диагностики и лечения. *ДокторРу*. Педиатрия. Гастроэнтерология. 2014; 3(91): 23-30.
- Николаева И. В. Современные принципы диагностики и лечения лямблиоза у детей. *Практическая медицина*. 2014;7(83):17-23.
- Ермакова Л.А., Амбалов Ю.М., Черникова Е.А., Думбадзе О.С. Оценка эффективности многократного копрологического исследования для диагностики лямблиоза. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2007; 4: 32-3.
- Усенко Д.В., Кананыхина С.Ю. Современные аспекты диагностики и лечения лямблиоза. *Вопросы современной педиатрии*. 2015; 14(1): 108-13.
- Ермакова Л.А., Амбалов Ю.М., Пшеничная Н.Ю., Черникова Е.А. Оценка эффективности иммуноферментного анализа (ИФА) при инвазии *Lambliia intestinalis*. *Цитокины и воспаление*. 2008; 3: 45.
- Александрова В.А., Одинцова В.Е. Сравнительная характеристика диагностики и лечения гельминтно-протозойных инвазий у детей на современном этапе. *Лечащий врач*. 2010; 8: 33-5.
- Begaydarova R. H., Nakakaawa G. E., Kuznyecova A. B., Yuhnevich-Nasonova E.A., Alibekova A.R. Clinical and epidemiological features of giardiasis. *Mezhdunarodnyi zhurnal eksperimental'noy obrazovaniya*. 2013; 10: 70-5. (in Russian)
- Ershov, I.B., Mochalov A.A., Osipova T.F. Improvement of therapy of giardiasis. *Aktual'naya infektsiologiya*. 2015; 3 (8): 49-54. (in Russian)
- Lysenko A.Ya., Vladimirova M.G., Kondrashin A.V., Majori J. *Klinicheskaya parazitologiya*. Geneva: VOZ; 2002. (in Russian)
- Sergiey V. P., Lobzin Yu. V., Kozlov S. S. *Human parasitic diseases (protozoa and helminthiasis)*. St.Petersburg: Izdatel'stvo Foliant; 2006. (in Russian)
- Kharchenko G. A., Burkin V. S. *Intestinal infections in children of early age*. Rostov-na-Donu: Izdatel'stvo Feniks; 2007. (in Russian)
- Bekhtereva M. I., Luppova E. N., Kornienko E. A., Minina S. S. Working protocol of diagnosis and treatment of giardiasis in children. *Voprosy detskoy dietologii*. 2013; 6: 72-7. (in Russian)
- Privorotsky V.F., Lupova N.E. Giardiasis in children: the current state of the problem. *Pediatr*. 2013; 4 (3): 101-10. (in Russian)
- Bronstein A.M., Malyshev N. A. *Yuman Helminthiasis*. Moscow: Meditsina; 2006. (in Russian)
- Kornienko E. A., Minina S. N., Fadina S. A. Clinic, diagnosis and treatment of giardiasis in children. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2009; 6 (4): 2-7. (in Russian)
- Odintsovo V.E., Alexandrova V. A. Methods of diagnosis and treatment of worm-protozoan infestations in children with diseases of the gastrointestinal tract. *Detskie infektsii*. 2010; 9 (2): 58-66. (in Russian)
- Fayzullina R. G. Giardiasis in children: modern approaches to diagnosis and treatment. *Prakticheskaya meditsina*. 2008; 31: 56 – 61. (in Russian)
- Kornienko E. A., Minina S. S., Fadina S. A., Kalinina N. M., Suvorov A. N. Diagnosis and treatment of giardiasis in children. *Infektsionnye bolezni*. 2009; 1: 4-11. (in Russian)
- Fayzullina R. A. Giardiasis in children: modern features of the clinic, diagnosis and treatment. *DoktorRu. Peditriya. Gastrojenterologiya*. 2014; 3 (91): 23-30. (in Russian)
- Nikolaeva I. V. Modern principles of diagnosis and treatment of giardiasis in children. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; 7 (83):17-23. (in Russian)
- Ermakova L. A., Ambalov Yu. M., Chernikova E. A., Dumbadze O. S. evaluation of the effectiveness of multiple coprological studies for the diagnosis of giardiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2007; 4: 32-3. (in Russian)
- Usenko D. V., Kananykina S. Y. Modern aspects of diagnostics and treatment of giardiasis. *Voprosy sovremennoy peditrii*. 2015; 14(1): 108-13. (in Russian)
- Ermakova L. A., Ambalov Yu. M., Wheat N. Yu., Chernikova E. A. Evaluation of the effectiveness of enzyme immunoassay (ELISA) in the invasion of *Lambliia intestinalis*. *Tsitokiny i vospalenie*. 2008; 3: 45. (in Russian)
- Alexandrova V. A., Odintsovo V. E. Comparative characteristics of diagnosis and treatment of helminthic-protozoan infestations in children at the present stage. *Lechaschiy vrach*. 2010; 8: 33-5. (in Russian)

Поступила 29.03.19

Принята к печати 05.04.19

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Покровская М.С., Борисова А.Л., Сивакова О.В., Метельская В.А., Мешков А.Н., Шаталова А.М., Драпкина О.М.

УПРАВЛЕНИЕ КАЧЕСТВОМ В БИОБАНКЕ. МИРОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ОПЫТ БИОБАНКА ФГБУ «НМИЦ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ» МИНЗДРАВА РОССИИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины» Минздрава России,
101990, Москва, Россия

Вопросы разработки и внедрения эффективной системы менеджмента качества являются актуальным элементом в организации деятельности биобанка. В статье приведены определения понятия «биобанк», предложенные в разные годы различными авторами; список стандартов, разработанных Международной организацией по стандартизации (ISO), применимых к деятельности биобанков; проанализированы правовые и этические требования и нормы, российская законодательная база в сфере биобанкинга, международные передовые практики и рекомендации; приведен опыт разработки и внедрения систем менеджмента качества по стандарту ISO 9001 в зарубежных биобанках и опыт банка биологического материала ФГБУ «НМИЦ профилактической медицины» Минздрава России. Вышедший в августе 2018 г. стандарт по биобанкингу ISO 20387 объединил в себе знания и опыт специалистов со всего мира и определил общие требования, обязательные к исполнению биобанками и хранилищами, желающими гарантировать своим потребителям высокое качество преаналитического этапа научных исследований, биологических образцов и ассоциированных с ними данных. В 2019 г. ожидается выход российской версии данного стандарта. Документы системы менеджмента качества являются мощным инструментом управления и позволяют обеспечить воспроизводимость деятельности по основным процессам хранения, что облегчает процедуры включения нового сотрудника в рабочий процесс и ежегодную оценку знаний, умений и навыков персонала; проведение внутренних и внешних аудитов; управление знаниями биобанка – постоянное повышение квалификации персонала. Внедрение эффективной системы менеджмента качества в деятельность биобанка позволяет гарантировать исследователям и всем заинтересованным сторонам высокое качество биообразцов, стандартизированное проведение преаналитического этапа научных работ, надежное регламентированное долговременное хранение биоматериала и сопутствующей информации для применения их в исследовательских целях в текущей работе и в будущих исследованиях.

Ключевые слова: биобанк; биобанкирование; качество; система менеджмента качества; качество биообразцов; контроль качества.

Для цитирования: Покровская М.С., Борисова А.Л., Сивакова О.В., Метельская В.А., Мешков А.Н., Шаталова А.М., Драпкина О.М. Управление качеством в биобанке. Мировые тенденции и опыт биобанка ФГБУ «НМИЦ профилактической медицины» Минздрава России Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (6): 380-384.
DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-380-384>

Pokrovskaya M.S., Borisova A.L., Sivakova O.V., Metelskaya V.A., Meshkov A.N., Shatalova A.M., Drapkina O.M.

QUALITY MANAGEMENT IN BIOBANK. WORLD TENDENCIES AND EXPERIENCE OF BIOBANK OF FSI «NMRC FOR PREVENTIVE MEDICINE» OF THE MINISTRY OF HEALTHCARE OF RUSSIA

FSI National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 101990, Moscow, Russia

This paper provides several definitions of the term “biobank”; a list of standards developed by the International Organization for Standardization (ISO) applicable to the activities of biobanks; analyzes the legal and ethical requirements; the Russian legal framework in the field of biobanking, the best international practices and recommendations; describes the experience of the development and implementation of quality management systems according to ISO 9001 in Biobanks established in different countries, and the experience of the Bank of Biological Material of the National Medical Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of Russia. The ISO 20387 Biobanking Standard, released in August 2018, combined the knowledge and experience of specialists from around the world and defined the general requirements that must be fulfilled by biobanks and repositories wishing to guarantee their customers the high quality of the preanalytical stage of scientific research, biological samples and associated data. In 2019, the Russian version of this standard is expected. Documents of the quality management system provide the reproducibility of activities on the main storage processes and facilitates the process of incorporating a new employee; conducting internal and external audits; Biobank knowledge management - continuous staff education. The introduction of an effective quality management system into biobank activity warrants the high quality of biological samples, the standardized pre-analytical stage, reliable, regulated long-term storage of biomaterial and related information for use in research purposes today and in future.

Key words: biobank; biobanking; quality; quality management system; quality control.

For citation: Pokrovskaya M.S., Borisova A.L., Sivakova O.V., Metelskaya V.A., Meshkov A.N., Shatalova A.M., Drapkina O.M. Quality management in biobank. World tendencies and experience of biobank of FSI «NMRC for preventive medicine» of the Ministry of healthcare of Russia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64(6): 380-384. (in Russ.) DOI : <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-6-380-384>

Для корреспонденции: Покровская Мария Сергеевна, канд. биол. наук, рук. лаб. «Банк биологического материала»; e-mail: MPokrovskaya@gnicpm.ru

For correspondence: Pokrovskaya M.S., PhD, Head of Biobank FSI; e-mail: MPokrovskaya@gnicpm.ru

Information about authors:

Pokrovskaya M.S. <https://orcid.org/0000-0001-6985-7131>

Borisova A.L. <https://orcid.org/0000-0003-4020-6647>

Shatalova A.M. <https://orcid.org/0000-0002-7672-9557>

Drapkina O.M. <https://orcid.org/0000-0002-4453-8430>

Meshkov A.N. <https://orcid.org/0000-0001-5989-6233>

Metelskaya V.A. <https://orcid.org/0000-0001-8665-9129>

Sivakova O.V. <https://orcid.org/0000-0001-5397-5387>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship. Authors are grateful to the Vladimir E. Belyaev, director of Biobank in the Institute of Regenerative Medicine (I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation) for valuable consulting and advice in writing this article.

Received 11.03.2019

Accepted 28.03.2019

Научные исследования в области биомедицины в последние годы предъявляют все более высокие требования к качеству биоматериала, используемого в научных целях. В связи с этим инсталляция биобанков как структурных подразделений научно-исследовательских и клинических медицинских центров становится общемировой тенденцией. Идея сбора и хранения человеческих тканей и жидкостей для исследовательских и образовательных целей не нова. Ключевым отличием современных биобанков от частных исследовательских коллекций является строгое соблюдение правовых и этических норм при сборе биоматериала, использование стандартизованных процедур обработки и хранения биообразцов, а также наличие структурированного биоинформационного поля, сопровождающего коллекцию хранилища. Разработка и внедрение эффективной системы менеджмента качества является необходимым элементом в организации работы биобанка [1-3].

Существует множество определений понятия «биобанк», предложенных различными авторами, организациями и сообществами. В соответствии с определением Международного общества биологических и экологических репозиториях (International Society for Biological and Environmental Repositories, ISBER) биобанк – это официально сформированное физически существующее или виртуальное учреждение, которое может принимать, обрабатывать, хранить и/или распространять образцы и/или пробы, а также ассоциированные с ними данные для применения в настоящий момент или в будущем [4]. Многими авторами введены в использование собственные определения биобанков. Так, в работе 2008 г. биобанк определяется авторами как организованная коллекция человеческого биологического материала и связанной с ним информации, которые хранятся для использования в исследовательских целях. Группа авторов из Румынии описывает биобанк как структуру, состоящую из двух обязательных частей - биологического материала, который собирается, обрабатывается и длительное время хранится, и базы данных с демографическими и клиническими данными по каждому образцу, обеспечивающую возможность сбора биологических образцов, их обработки, хранения, инвентаризации и распространения [5-7].

Деятельность биобанков во всем мире координируется рядом международных, региональных и национальных организаций. Ведущая роль принадлежит уже упомянутому выше обществу ISBER. Основанная в 1999 г., организация определила свою миссию как «создание возможностей для взаимодействия, обучения, инноваций и гармонизации подходов к решению имеющихся проблем в области деятельности биобанков». Одной из сфер деятельности ISBER является разработка, издание

и регулярная актуализация руководств (передовых практик) для хранилищ и биорепозиториев. Этот сборник (Best practices for Repositories) впервые увидел свет в 2008 г. и уже четырежды переиздавался. Примечательно, что в 2018 г. последнее издание «Передовых практик» впервые было официально переведено на русский язык. Содержание этого обширного документа покрывает все важнейшие аспекты работы в области биобанкирования, касающиеся соответствия этическим требованиям, организационной структуры биобанка и непосредственно процесса биобанкирования. Следование его правилам и рекомендациям обеспечивает способность биобанка эффективно и безопасно организовывать свою деятельность [8], устанавливать четкие стандарты выполнения всех этапов процесса банкирования биообразцов.

Следует отметить, что в России на сегодняшний день отсутствует законодательная база, регламентирующая деятельность биобанков. Вместе с тем, имеется ряд законодательных актов, на которые стоит опираться: № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», ч.3 ст.37; Приказ Минздрава РФ № 842н «Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов» (Зарегистрировано в Минюсте России 28.03.2018 № 50555); № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» (с изменениями и дополнениями); № 152-ФЗ «О персональных данных» (действующая редакция); № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (с изменениями и дополнениями); № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями).

Международной организацией по стандартизации (International Organization for Standardization, ISO) разработан целый ряд стандартов, применимых к деятельности банков биологического материала. Среди них:

- ISO 9001 «Системы менеджмента качества. Требования»;
- ISO 15189 «Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности»;
- ISO 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»;
- ISO 17034 «Общие требования к компетентности производителей стандартных образцов»;
- ISO 20387 «Биотехнологии. Биобанкинг. Общие требования» [9-11].

Вышедший в августе 2018 г. стандарт по биобанкиро-

ванию ISO 20387 объединил в себе знания и опыт специалистов по биобанкированию со всего мира и определил общие требования, обязательные к исполнению биобанками и хранилищами, желающими гарантировать своим потребителям высокое качество преаналитического этапа научных исследований, биологических образцов и ассоциированных с ними данных. В 2019 г. ожидается выход российской версии данного стандарта. Стандарт ISO 20387:2018 применим ко всем организациям, осуществляющим биобанкирование, включая биобанкирование биологического материала из многоклеточных организмов (например, человека, животных, грибов и растений) и микроорганизмов для научных исследований и разработок [12, 13].

В настоящее время в подавляющем большинстве случаев биобанками при организации систем управления качеством отдается предпочтение стандарту ISO 9001, как самому универсальному и подходящему организациям любого уровня и специализации.

Опыт многих зарубежных биобанков подтверждает, что разработка системы менеджмента качества (СМК) в соответствии с требованиями стандарта ISO 9001 в сочетании со стандартизированными методиками, составленными на основе «Передовых практик ISBER» гарантирует потребителям услуг биобанка и всем заинтересованным сторонам стабильно высокое качество биообразцов и ассоциированных с ними данных, а также процессов управления хранилищем, соответствия деятельности биобанка всем правовым, нормативным и этическим требованиям. Грамотно разработанные и применяемые документы СМК являются мощным инструментом управления и позволяют обеспечить:

1. Воспроизводимость деятельности по основным процессам хранения, что облегчает процедуры включения нового сотрудника в рабочий процесс и ежегодную оценку знаний, умений и навыков персонала. С этой целью должностная инструкция обычно содержит перечень стандартных операционных процедур (СОП), которыми должен владеть сотрудник. В приложениях к СОП включается лист ознакомления и оценки знаний по данной СОП. Особенно это актуально для процедур, которые применяются относительно редко.

2. Проведение внутренних и внешних аудитов. На основе СОП и регламента формируется чек-лист для проверки правильности выполнения процедуры или процесса, что является классическим подходом к стандартизации системы.

3. Управление знаниями Биобанка. В процессе разработки собственной документации персонал изучает нормативные требования, рекомендации, лучшие практики и внедряет их в свою деятельность [14].

Примером эффективного внедрения в свою деятельность системы управления качеством может послужить биобанк медицинского университета г. Грац (Австрия). На сегодняшний день этот биобанк является одним из крупнейших клинических биобанков в Европе, в котором хранится более 7,5 млн образцов биологического материала [15,16]. Биобанк Грац, основанный в 2007 г. и впервые сертифицированный по стандарту ISO 9001 в 2009 г., посредством своей СМК гарантирует своим потребителям, что постоянно улучшает качество сбора образцов и данных в соответствии со стандартами и руководящими принципами, опубликованными ВОЗ, МАИР (Международное агентство по изучению рака) и ISBER, а также новыми стандартами ISO для биобанков. Каж-

дый образец в биобанке принимается, обрабатывается и хранится в соответствии с конкретными СОП [17].

В статье М.А.Сорте и соавт. [18,19] приведен опыт биобанка Университета Алькалы (Испания) по внедрению и сертификации СМК по стандарту ISO 9001 версии 2008 г. Результатом внедрения и сертификации системы управления качеством биобанка этого университета явилось существенное сокращение времени выполнения процесса биобанкирования (на 70%), значительное увеличение количества обрабатываемых образцов (на 200%) и оптимизация процессов управления хранилищем (на 25%), что, в конечном итоге, повысило качество биообразцов и удовлетворенность потребителей услуг биобанка.

Национальный биобанк Кореи (NBK), объединенный в единую сеть с 17 региональными корейскими биобанками в рамках проекта the Korea Biobank Project (КВР), содержит более 525 тыс. биообразцов (данные на декабрь 2011 г.). Интеграцию в этот проект биобанку NBK обеспечила разработка СМК, созданной на основе требований стандарта ISO 9001. Принятые стандарты позволили унифицировать процедуры сбора, обработки, хранения и распределения биообразцов, их аннотацию и процесс получения информированных согласий от пациентов и доноров [20].

Особого внимания заслуживает биобанк Великобритании (UK Biobank), созданный в 2003 г. В период с 2006 по 2010 г. в него поступили образцы биоматериала и данные от каждого пятидесятого жителя Великобритании в возрасте от 40 до 69 лет [21, 22]. Его уникальность заключается в том, что база данных биобанка, содержащая порядка 20 терабайт информации о биообразцах от 500 тыс. человек, находится в открытом доступе как для британских ученых, так и для зарубежных исследователей. При такой прозрачности данных требовалась определенная политика качества, реализуемая через созданную биобанком СМК. И в этом случае за основу был взят стандарт ISO 9001.

В 2014 г. на базе коллекции биоматериала, собранной от репрезентативной выборки населения восьми регионов России в рамках крупномасштабного эпидемиологического исследовательского проекта ЭССЕ-РФ, был организован Биобанк Национального медицинского исследовательского Центра профилактической медицины Минздрава России (далее Центр). Пусковым и важнейшим этапом организации функционирования биобанка явилась разработка, утверждение и внедрение «Регламента» его работы. Данный документ был разработан на основе правил по биобанкированию, изложенных в международных рекомендациях «Передовые практики ISBER» [23] и адаптирован к реалиям Центра. Регламент Биобанка описывает основные положения, функции, цели и задачи, правила пользования коллекциями, основные требования к материально-технической базе и персоналу. Основной целью деятельности Биобанка Центра является создание и сохранение масштабной коллекции биологических образцов, полученных от больных различными хроническими неинфекционными заболеваниями на разных стадиях их развития, на разных этапах лечения, а также от лиц, не страдающих указанными заболеваниями, и обеспечение научно-исследовательской работы, проводимой научными подразделениями Центра. С привлечением консалтинговых услуг ООО «Национальный БиоСервис» в соответствии с рекомендациями ISBER «Best Practices» разработаны

и внедрены более двадцати СОП и форм, необходимых для деятельности Биобанка, среди которых: «Журнал допуска посетителей, приема и отпуска биоматериала из биокolleкций», «Сводная таблица состава коллекций биообразцов», «Форма Информированного Согласия», СОП «Инструктаж медперсонала», «Нештатные ситуации», «Режим и сроки транспортировки биообразцов для обработки» и др.

Важное значение в сфере биобанкирования имеет строгое соблюдение всех необходимых этических требований [24]. Вопросы создания Биобанка, а также утверждения и введения в оборот различных регламентирующих его деятельность документов рассмотрены Комитетом по Этике Центра. Также к вопросам, контролируемым Этическим комитетом, относятся:

- соблюдение этических обязательств;
- добровольность предоставления пациентами и донорами биологических образцов;
- безопасность используемых процедур получения биологического материала;
- сохранность персональных данных пациентов и доноров, посредством выполнения алгоритмов деперсонализации данных;
- полнота предоставляемой донорам биологических образцов информации о научных целях биобанкирования.

Наиболее важным вопросом, решенным Этическим комитетом, стало рассмотрение и утверждение форм «Информированного согласия пациента на биобанкирование» и «Информации для пациентов», которые были разработаны на основе рекомендаций ISBER.

Крупномасштабные эпидемиологические исследования ЭССЕ-РФ и ЭССЕ-РФ2, проводимые Центром с 2012 г. предполагают сбор биоматериала в различных, в том числе отдаленных, регионах России, а также сохранение в Центре собранного биоматериала. Для проведения проекта ЭССЕ-РФ2 благодаря структуре Биобанка были разработаны подробные инструкции для обеспечения качества и стандартизации процедур забора крови, пробоподготовки, маркировки и транспортировки биообразцов из регионов [25,26]. По каждому этапу работы проведены тренинги для всех участников данного проекта, от сотрудников научных подразделений Центра до медицинского персонала в регионах. В биобанке Центра подготовлены образцы комплектов для сбора биообразцов; разработаны специальные формы информированного согласия, таблицы для описания образцов, другие сопроводительные документы, транспортируемые вместе с биообразцами; создано программное обеспечение для ввода данных на местах сбора биоматериала и пробоподготовки в регионах. Все это обеспечило стандартизацию преаналитического этапа работы с биообразцами в различных регионах нашей страны [27]. В настоящее время в Биобанке Центра хранится биоматериал из 16-ти регионов России.

В 2018 г. руководством Центра было принято решение о необходимости разработки и внедрения в биобанке системы менеджмента качества в соответствии с требованиями стандарта ISO 9001:2015. Был изучен международный опыт, проведен анализ уже существующей в биобанке документации на предмет ее актуальности и применимости, исходя из возможностей и растущих потребностей Центра. В соответствии с планом-графиком разработки и внедрения СМК по стандарту ISO 9001 издан приказ о назначении ответственных лиц и утверждении политики и целей в области качества биобанка. Представителем

руководства по качеству назначен зам. директора по перспективному развитию медицинской деятельности, определен состав рабочей группы по качеству, включающий руководителя биобанка, руководителя лаборатории молекулярной генетики Центра и ответственного по качеству в биобанке. На следующем этапе был составлен перечень документации СМК, включающий как уже внедренные СОП, инструкции, формы, так и документы, которые были определены, как необходимые в соответствии с требованиями ISO 9001. Несмотря на то что версия стандарта 2015 г. [28], в отличие от ISO 9001:2008 [29], не содержит четких требований к перечню обязательных документов, и организации предоставляется право формировать список документов в соответствии с собственными потребностями, мы сочли необходимым сохранить «Руководство по качеству», «Управление документацией и записями», процедуру «Проведения внутренних аудитов», «Управление рисками».

Процедура управления рисками в банке биологического материала связана преимущественно с обеспечением безопасности и сохранности биообразцов и ассоциированных с ними данных. В соответствии с рекомендациями и передовыми практиками ISBER сотрудниками Биобанка разработан документ, подробно описывающий все возможные варианты аварийных и нестандартных ситуаций и алгоритмы восстановления штатного порядка. С целью обеспечения сохранности всей информации об образцах IT-отделом Центра проводится еженедельное резервное копирование баз данных, содержащих сведения об образцах [30].

В соответствии с политикой в области качества одним из основополагающих принципов деятельности биобанка является постоянное повышение компетенции персонала. Процесс переподготовки и повышения квалификации сотрудников осуществляется на постоянной основе и предполагает как внутреннее, так и внешнее обучение. Систематически проводятся тренинги и семинары непосредственно по процессам биобанкирования и по системе менеджмента качества в целом. Начиная с 2015 г., сотрудники биобанка регулярно проходят обучение в России и за рубежом, участвуют в российских и международных конференциях по биобанкированию, в том числе: Симпозиум по биобанкированию (2017) и Сателлитная конференция по биобанкированию (2018) в рамках всероссийской конференции «Неинфекционные заболевания и здоровье населения России», «Europe Biobank Week 2016» (Вена, Австрия), «Global Biobank Week 2017» (Стокгольм, Швеция), «Europe Biobank Week 2018» (Антверпен, Бельгия).

На сегодняшний день в биобанке Центра продолжается активная работа по построению системы менеджмента качества, разработке недостающей документации и обучению персонала. Эти мероприятия позволят биобанку, как научному подразделению Центра, обеспечить базу для проведения научных проектов, связанных с использованием биоматериала: гарантировать исследователям и всем заинтересованным сторонам высокое качество биообразцов, стандартное проведение преаналитического этапа, надежное долговременное хранение биоматериала в стандартных условиях, а также хранение информационного сопровождения биообразцов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Благодарность. Авторы выражают признательность В.Е. Беляеву, директору биобанка Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова за ценные советы и консультации при написании данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА (1-3, 6, 7, 9-13, 15-25, 28-30 см. REFERENCES)

4. Анисимов С.В., Глотов А.С., Гранстрем О.К., Драпкина О.М. и др. Биобанки и прогресс биомедицины: сборник научных трудов. Анисимов С.В., ред. СПб.: Свое издательство; 2018.
5. Резник О.Н., Кузьмин Д.О., Скворцов А.Е., Резник А.О. Биобанки – неоценимый ресурс трансплантации. История, современное состояние, перспективы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016; 18(4):123-32.
8. Пруцкий В.Ю., Гранстрем О.К., Анисимов С.В. Биобанки как ключевое инфраструктурное звено прогресса биомедицины. Биобанки и прогресс биомедицины: сборник научных трудов. Анисимов С.В., ред. СПб.: Свое издательство. 2018.
14. Эмануэль А., Аверьянов Е., Каленская А., Куликов О., Иванов Г., Швабский О. Разработка и внедрение документов системы менеджмента качества. *Менеджмент качества в медицине*. 2018; 1: 36-41.
26. Покровская М.С., Сивакова О.В., Мешков А.Н., Метельская В.А., Ефимова И.А., Ипатова Ю.Н. и др. Организация биобанкирования биобразцов в рамках второго этапа эпидемиологического исследования сердечно-сосудистых факторов риска и заболеваний в регионах Российской Федерации (ЭССЕ-РФ2). *Профилактическая медицина*. 2018; 21(2-2): 44-5.
27. Покровская М.С., Сивакова О.В., Мешков А.Н., Метельская В.А., Шальнова С.А., Драпкина О.М. Организация популяционно-клинического биобанка в ФГБУ НМИЦ профилактической медицины Минздрава России: современный подход к проведению эпидемиологических и клинических исследований. Биобанки и прогресс биомедицины: сборник научных трудов. Анисимов С.В., ред. СПб.: Свое издательство. 2018.

REFERENCES

1. William E. Grizzle, Elaine W. Gunter, Katherine C. Sexton, Walter C. Bell. Quality Management of Biorepositories. *Biopreservation and biobanking*. 2015; 13 (3): 183–94.
2. Betsou F. Quality Assurance and Quality Control in Biobanking. *Biobanking of Human Biospecimens: Principles and Practice*. Springer. 2017; 23-49.
3. Carter A., Betsou F. Quality assurance in cancer biobanking. *Biopreservation and biobanking*. 2011; 9(2): 157-63.
4. Biobanks and biomedical progress: collection of scientific papers Anisimov S.V., ed. St.Petersburg: Svoe izdatel'stvo. 2018; 86. (in Russian)
5. Reznik O.N., Kuzmin D.O., Skvortsov A.E., Reznik A.O. Biobanks are an essential tool for transplantation. History, current state, perspectives. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2016; 18(4): 123-32. (in Russian)
6. Artene S.A., Ciurea M.E., Purcaru S.O., Tache D.E., Tataranu L.G., Lupu M., Dricu A. (2013). Biobanking in a constantly developing medical world. *The Scientific World Journal*. 2013; 343275: 1-5.
7. Kauffmann F., Cambon-Thomsen A. Tracing biological collections: between books and clinical trials. *JAMA*. 2008; 299(19): 2316-8.
8. Pruckij V., Granstrom O., Anisimov S. The biobanks as a key infrastructural element of the progress of Biomedicine. *Biobanks and biomedical progress*. St.Petersburg: Svoe izdatel'stvo. 2018; 9-24. (in Russian)
9. ISO 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
10. ISO 15189:2012 Medical laboratories - Requirements for quality and competence.
11. ISO 17034:2016 General requirements for the competence of reference material producers.

12. ISO 20387:2018 Biotechnology – Biobanking – General requirements for biobanking.
13. Krieger L. New ISO standards for biobanking in development - ISO objectives and involvement. *Biobanks Europe*. 2017; 6: 20-1.
14. Emanuel A., Averyanova E., Kalenskaya A., Kulikov O., Ivanov G., Shvabsky O. Development and implementation of documents of the quality management system. *Menedzhment kachestva v meditsine*. 2018; 1: 36-41. (in Russian)
15. Sargsyan K., Macheiner T., Story P., Strahlhofer-Augsten M., Plattner K., Riegler et al. Sustainability in Biobanking: Model of Biobank Graz. *Biopreservation and biobanking*. 2015; 13(6): 410-20.
16. Macheiner T., Huppertz B., Sargsyan K. Biobanking : Sustainable use of biological resources on the example of the Biobank Graz. *Pathologe*. 2013; 34:366-9.
17. Biobank Graz Homepage. Available at: <https://biobank.medunigraz.at/>.
18. Cortés M.A., Irrazábal E., García-Jerez A., Bohórquez-Magro L., Luengo A., Ortiz-Arduán A. et al. Impact of implementing ISO 9001:2008 standard on the Spanish Renal Research Network biobank sample transfer process. *Nefrologiya*. 2014; 34(5): 552-60.
19. Betsou F., Luzergues A., Carter A., Geary P., Riegman P., Clark B. et al. Towards norms for accreditation of biobanks for human health and medical research: compilation of existing guidelines into an ISO certification/ accreditation norm-compatible format. *The Quality Assurance Journal*. 2007; 11(3-4): 221-94.
20. Jae-Eun Lee, Ji-Hyun Kim, Eun-Jung Hong, Hye Sook Yoo, Hye-Young Nam, Ok Park. National Biobank of Korea: Quality control Programs of Collected-human Biospecimens. *Osong Public Health Res Perspect*. 2012; 3(3): 185-9.
21. Sudlow C., Gallacher J., Allen N., Beral V., Burton P., Danesh J. et al. UK biobank: an open access resource for identifying the causes of a wide range of complex diseases of middle and old age. *PLoS Med*. 2015; 12(3): e1001779.
22. Elliott P., Peakman T.C. The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *International Journal of Epidemiology*. 2008; 37(2): 234–44.
23. Campbell L.D., Astrin J.J., DeSouza Y., Giri J., Patel A.A., Melissa Rawley-Payne M. et al. The 2018 Revision of the ISBER Best Practices: Summary of Changes and the Editorial Team's Development Process. *Biopreservation and Biobanking*. 2018; 16(1): 3-6.
24. Bledsoe M.J. Ethical Legal and Social Issues of Biobanking: Past, Present, and Future *Biopreservation and Biobanking*. 2017; 15(2): 142-7.
25. Pokrovskaya M.S., Sivakova O.V., Meshkov A.N., Metelskaya V.A., Muromtseva G.A., Shalnova S.A. et al. Biobanking of Biospecimens for the Epidemiology of Cardiovascular Risk Factors and Diseases in Regions of the Russian Federation Study (ESSE-RF), Biospecimen Research Symposium. Luxembourg; 2018.
26. Pokrovskaya M.S., Sivakova O.V., Meshkov A.N., Metelskaya V.A., Efimova I.A., Ipatova Y.N. et al. Organization of biobanking of biological samples within the second stage of epidemiological study of cardiovascular risk factors and diseases in the regions of the Russian Federation (ESSE-RF2). *Profilakticheskaya meditsina*. 2018; 21(2-2): 44-5. (in Russian)
27. Pokrovskaya M.S., Sivakova O.V., Meshkov A.N., Metelskaya V.A., Shalnova S.A., Drapkina O.M. Organization of population-clinical Biobank in FGBU NMIC of preventive medicine of the Ministry of health of Russia: modern approach to epidemiological and clinical studies. *Biobanks and biomedical progress*. St.Petersburg: Svoe izdatel'stvo. 2018; 44-50. (in Russian)
28. ISO 9001:2015 Quality management systems – Requirements.
29. ISO 9001:2008 Quality management systems – Requirements.
30. Henderson M.K., Simeon-Dubach D., Zaayenga A. When Bad Things Happen: Lessons Learned from Effective and not so Effective Disaster and Recovery Planning for Biobanks. *Biopreservation and biobanking*. 2013; 11(4): 193.

Поступила 11.03.19

Принята к печати 28.03.19

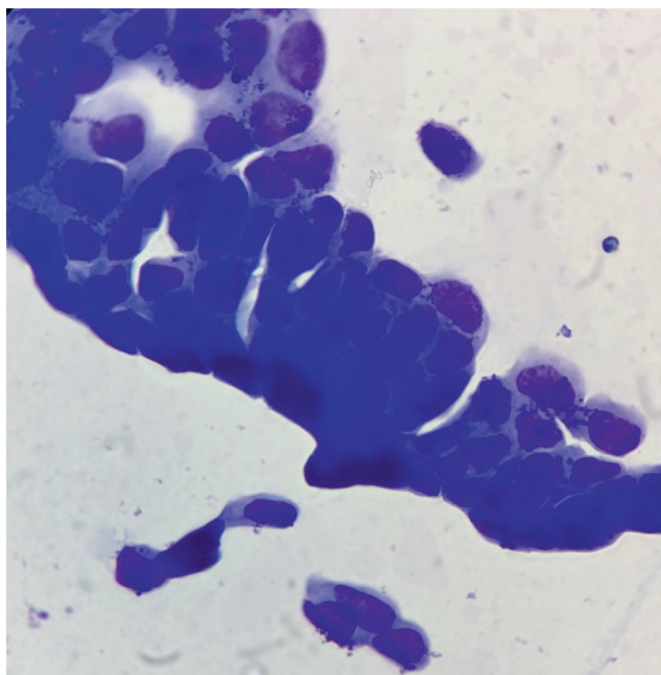


Рис. 1. Отпечаток с конъюнктивы *пациентки Р.*, 43 лет (контрольная группа): незрелые эпителиальные клетки. Окр. азур-эозином, х400.

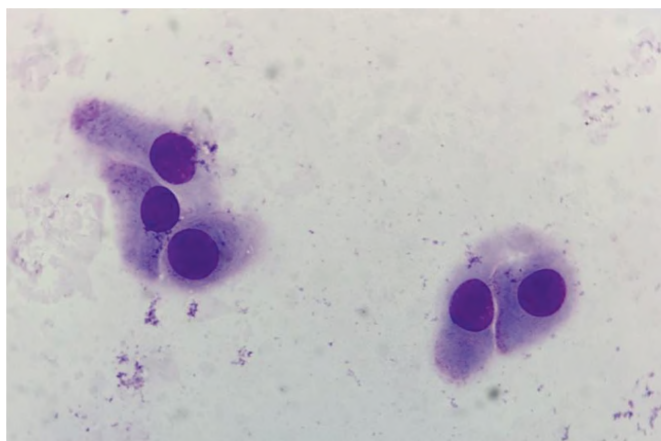


Рис. 2. Отпечаток с конъюнктивы *пациентки С.*, 55 лет (контрольная группа): бокаловидные эпителиальные клетки, ядра расположены эксцентрически, в цитоплазме секрет. Окр. азур-эозином, х400.

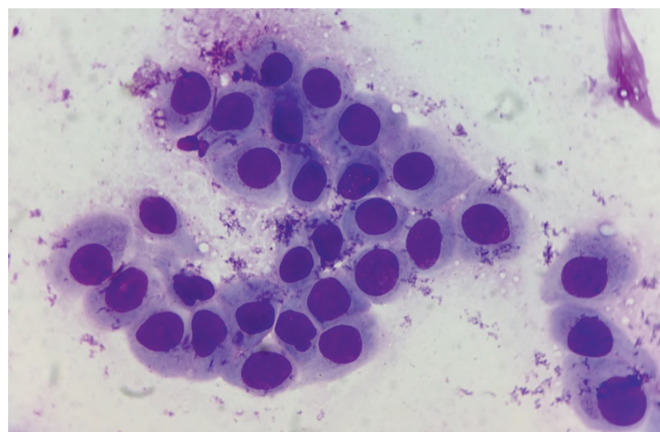


Рис. 3. Отпечаток с конъюнктивы *пациентки А.*, 57 лет с ССГ: скопление уплощенных эпителиальных клеток. Окр. азур-эозином, х400.

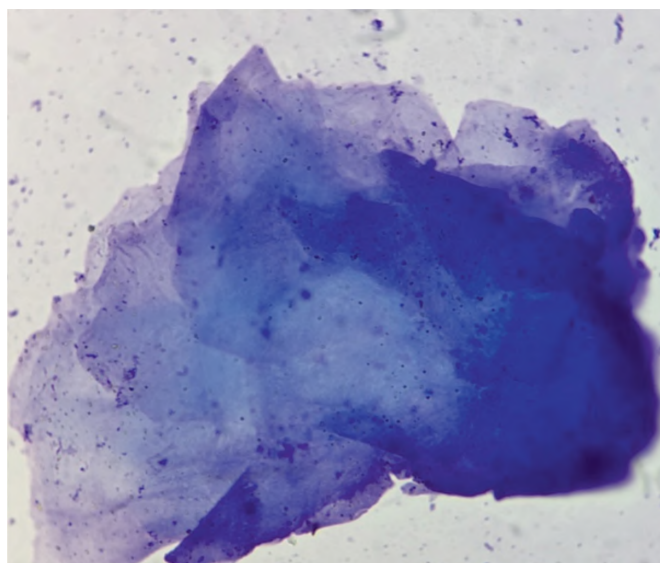


Рис. 4. Отпечаток конъюнктивы *пациента А.*, 64 лет с ССГ: скопление чешуек плоского эпителия. Окр. азур-эозином, х400.

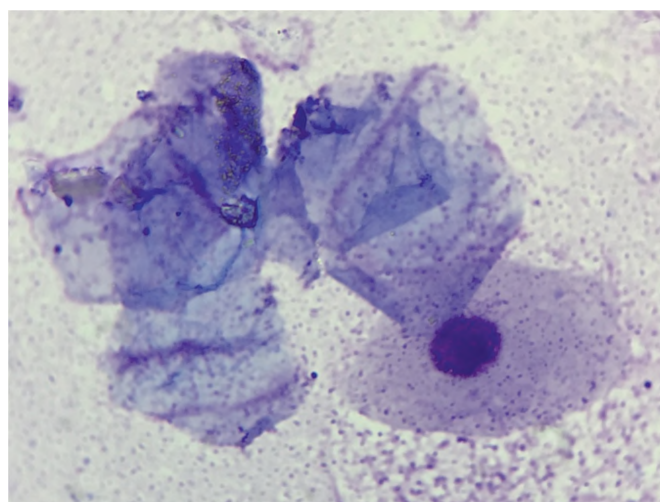
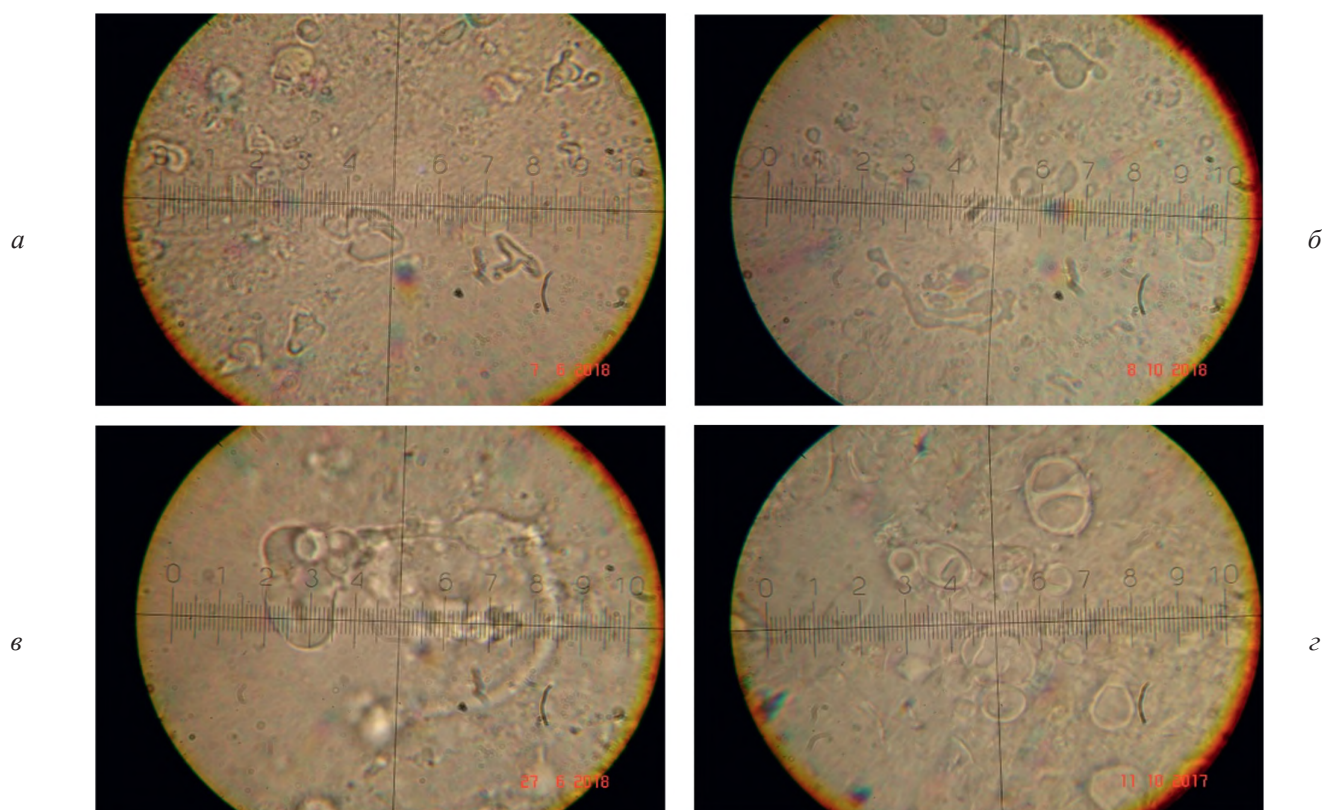


Рис. 5. Отпечаток с конъюнктивы *пациента В.*, 67 лет (контрольная группа): скопление чешуек, поверхностная клетка плоского эпителия. Окр. азур-эозином, х400.

К ст. Арзуманян В.Г. и соавт.

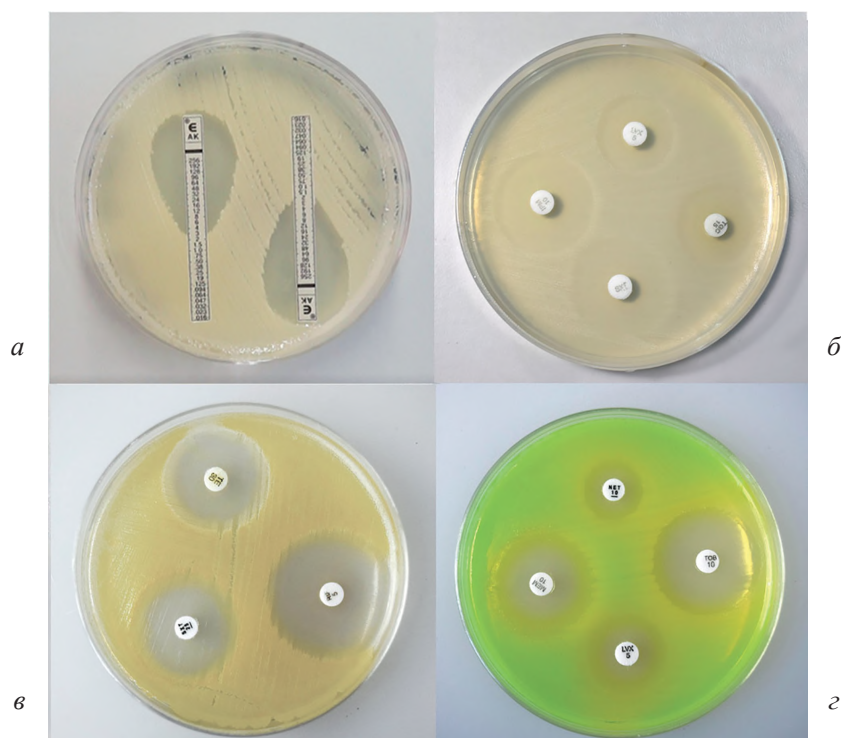


Элементы дерматофитных грибов в препаратах чешуй кожи больных атопическим дерматитом (АД) в стадии обострения.

а - мальчик 5,5 лет (спина); б - мальчик 13 лет (волосистая часть головы);
в - девушка 16 лет (наружная поверхность ступни); г - девушка 18 лет (предплечья).

Увеличение микроскопа 1750 раз. Линейка на фото в микрометрах.

К ст. Косиловой И.С. и соавт.



Е-тест на чувствительность штамма *K. pneumoniae* 409 NDM к амоксициллину (а). Диско-диффузионный метод на чувствительность *E. coli* X 627 к имипенему, левофлоксацину, триметоприм/сульфаметоксазолу и тигециклину (б), *S. aureus* Д 508 к тетрациклину, триметоприм/сульфаметоксазолу и рифампицину (в), *Pseudomonas aeruginosa* X 629 к нетилицину, меропенему, тобрамицину, левофлоксацину на разработанной питательной среде «МХА II-Оболensk» (г).