

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.

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ Том 64 ЛАБОРАТОРНАЯ 10 • 2019 ДИАГНОСТИКА

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

ОКТАБРЬ

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

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

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 03.10.2019.
Подписано в печать 20.10.2019.
Формат 60 × 88%.
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 издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

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

Индекс 71442 — для подписчиков
Подписка через Интернет: www.aks.ru,
www.pressa-rf.ru
Подписка на электронную версию:
eLibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2019. № 10. 585–640.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 64
10 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

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

**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 Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, 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. REZNIKOV
(*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*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

БИОХИМИЯ

- Батырова А.С., Васильева Е.М., Баканов М.И., Сурков А.Н.* Биомаркеры ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции у детей и подростков с хроническими вирусными гепатитами. 588
- Тепленький М.П., Кузнецова Е.И., Чепелева М.В., Спиркина Е.С., Лунева С.Н., Гасанова А.Г., Матвеева Е.Л.* Кислородзависимые механизмы и окислительный стресс у детей при остеохондропатии головки бедренной кости 594

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Петрова О.В., Шабанова Г.Р., Мурыгина О.И., Панова Е.В., Никulina Д.М.* Повышение качества гематологических исследований с помощью сигмометрии 599

ИММУНОЛОГИЯ

- Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Русанова О.А., Зборовская И.А., Емельянов Н.И.* Технологические приемы модификации липидных антигенов для синтеза диагностических и лечебных препаратов в ревматологии 603

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Малов С.И., Малов И.В., Дворниченко В.В., Расулов Р.И., Кувшинов А.Г., Марш П.Н., Декан Т., Мацек-Жилкова З., Ющук Н.Д.* Применение комбинации альфа-фетопротеина и остеопонтина для ранней диагностики гепатоцеллюлярной карциномы, ассоциированной с гепатитом С 607
- Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Пруткин М.Е.* Расширение возможностей в диагностике бактериемии и сепсиса у детей многопрофильного стационара. 613
- Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Забровская А.В., Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Останкова Ю.В., Лихачев И.В., Сатосова Н.В., Кицбабашвили Р.В., Смирнова Е.В., Семченкова Л.И., Быстрая Т.Е., Сокольник С.Е., Уткина Н.П., Сихандо Л.Ю.* Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014–2018 гг. в Санкт-Петербурге, Россия 620
- Бурнашов С. И., Шипицына И. В., Осипова Е. В.* Микрофлора операционных ран и свищей у пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости до реконструктивного лечения, при рецидиве инфекции. 627
- Годовалов А. П., Карпунина Т. И.* Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий 632

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А.* Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке 635

BIOCHEMISTRY

- Batyrova A.S., Vasilieva E.M., Bakanov M.I., Surkov A.N.* Biomarkers of angiogenesis and endothelial dysfunction in children and adolescents with chronic viral hepatitis 588
- Teplen'kiy M.P., Kuznetsova E.I., Chepeleva M.V., Spirkina E.S., Luneva S.N., Gasanova A.G., Matveeva E.L.* Oxygen-dependent mechanisms and oxidative stress in children for femoral head osteochondropathy 594

HEMATOLOGY

- Petrova O.V., Shabanova G.R., Murygina O.I., Nikulina D.M.* Improving the quality of hematological studies using sigmametry 599

IMMUNOLOGY

- Gontar I.P., Emelyanova O.I., Rusanova O.A., Zborovskay I.A., Emelyanov N.I.* Techniques of modifying lipid antigens for synthesis of diagnostic and therapeutic preparations in rheumatology 603

MICROBIOLOGY

- Malov S.I., Malov I.V., Dvornichenko V.V., Rasulov R.I., Kuvshinov A.G., Marche P.N., Decaens T., Macek-Jilkova Z., Yushchuk N.D.* Application of alpha-fetoprotein and osteopontin combination for early diagnosis of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C 607
- Boronina L.G., Samatova E.V., Prutkin M.E.* Expansion of opportunities in diagnostics of bacteremia and sepsis in children of a multi-profile hospital 613
- Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Zabrovskaya A.V., Voitenkova E.V., Matveeva Z.N., Ostankova Y.V., Likhachev I.V., Satosova N.V., Kitsbabashvili R.V., Smirnova E.V., Semchenkova L.I., Bystraya T.E., Sokol'nik S.E., Utkina N.P., Sikhando L.Y.* Antimicrobial resistance and clinical significant resistance mechanisms of *Salmonella* isolated in 2014–2018 in St.Petersburg, Russia 620
- Burnashov S. I., Shipitsyna I. V., Osipova E. V.* Microflora of surgical wounds and fistulas in patients with chronic osteomyelitis of the tibia before reconstructive treatment, in case of recurrence of infection 627
- Godovalov A.P., Karpunina T.I.* The determination of biofilm composition of gram-positive bacteria 632

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A.* Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load 635

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Батырова А.С., Васильева Е.М., Баканов М.И., Сурков А.Н.

БИОМАРКЕРЫ АНГИОГЕНЕЗА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ХРОНИЧЕСКИМИ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава РФ. 119991, Москва, Россия

В ряде работ показано, что при хронических вирусных гепатитах (ХВГ) и циррозе печени вирусной этиологии имеются признаки повреждения и дисфункции эндотелия, выраженность которых зависит от тяжести патологического процесса. Цель исследования: оценка роли факторов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции при персистирующих ХВГ у детей и подростков. Обследовано 35 пациентов с ХВГ, из них с ХГВ – 11 детей, с ХГС – 24 ребенка. Референсную группу составили 120 условно здоровых детей. У всех детей в сыворотке крови определяли концентрации VEGF-A, ангиотензина (ANG), растворимых рецепторов sVEGF-R1 и sVEGF-R2, тромбомодулина (ТМ) в сыворотке крови иммуноферментным методом с помощью специальных наборов реагентов. Содержание фактора Виллебранда (vWf) определяли в плазме крови методом имунотурбидиметрии, плазминогена (PLG) – при проведении расширенной коагулограммы. У детей с ХВГ независимо от этиологии концентрация VEGF-A была значимо ниже, а содержание sVEGF-R2, sVEGF-R1 и ТМ – выше, по сравнению с детьми без патологии печени ($p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ соответственно). Концентрация ТМ и уровень активности PLG у больных с ХГС были несколько выше, чем при ХГВ. Пониженный уровень VEGF-A и повышенная экспрессия его растворимых рецепторов свидетельствуют об усилении процессов торможения ангиогенеза при ХВГ, что может указывать на патогенетическую роль этого феномена в развитии повреждений печени при ХГС.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит; ангиогенез печени; эндотелиальная дисфункция; фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A; растворимые рецепторы VEGF-A – sVEGF-R1, sVEGF-R2; тромбомодулин.

Для цитирования: Батырова А.С., Васильева Е.М., Баканов М.И., Сурков А.Н. Биомаркеры ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции у детей и подростков с хроническими вирусными гепатитами. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 588-593. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-588-593>

Batyrova A. S., Vasilyeva E.M., Bakanov M. I., Surkov A. N.

BIOMARKERS OF ANGIOGENESIS AND ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS

FSAI «National Medical Research Center for Childrens Health» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russia

At some works, it has been shown there are signs of damage and endothelium dysfunction in patients with chronic viral hepatitis (CVH) and liver cirrhosis of viral etiology the severity of these conditions depends on the severity of the pathological process. Evaluation of the role of angiogenic factors and endothelial dysfunction in persistent of CVH in children and adolescents. 35 patients were examined: of which 11 with chronic hepatitis B (CHB) and 24 with chronic hepatitis C (CHC). The reference group consisted of 120 practically healthy persons of the corresponding age and sex. VEGF-A, angiotensin (ANG), soluble receptors of VEGF-A (sVEGF-R1 and sVEGF-R2) and trombomodulin (TM) have been investigated in serum by enzyme immunoassay using special kits (BCM Diagnostics, USA). Other endothelial dysfunction markers as von Willebrand factor (vWf) was determined in blood plasma by immunoturbidimetry (Siemens, Germany), plasminogen (PLG) was investigated due to extended coagulation. In children with CVH, regardless of etiology, the concentration of VEGF-A was significantly lower, and sVEGF-R2, sVEGF-R1 and TM was higher than in children without liver disease ($p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively). The concentration of TM and the level of PLG activity in patients with CHC were slightly higher than in CHB. Decreased level of VEGF-A and increased expression of its soluble receptors indicate enhanced inhibition of angiogenesis in CVH, which may indicate the pathogenetic role of this phenomenon in the development of liver damage in CHC.

Keywords: chronic viral hepatitis; hepatic angiogenesis; endothelial dysfunction; vascular endothelial growth factor (VEGF-A); soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, 2; trombomodulin.

For citation: Batyrova A.S., Vasilyeva E.M., Bakanov M.I., Surkov A.N. Biomarkers of angiogenesis and endothelial dysfunction in children and adolescents with chronic viral hepatitis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (10): 588-593. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-588-593>

For correspondence: Batyrova A. S., doctor of clinical laboratory diagnostics centralized clinical diagnostic laboratory with express diagnostics group; e-mail: annbatyrova@yandex.ru

Information about authors:

Batyrova A. S., <https://orcid.org/0000-0002-9809-6922>

Vasilieva E.M., <http://orcid.org/0000-0002-4712-8664>

Bakanov M. I., <http://orcid.org/0000-0002-0053-8965>

Surkov A. N., <https://orcid.org/0000-0002-4679-0533>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 30.09.2019

Accepted 01.10.2019

Введение. В настоящее время установлено, что основным индуктором ангиогенеза, как в физиологических условиях, так и при различных патологических состояниях является гипоксия [1]. При вирусных гепатитах происходят нарушения в системе эритронов, что влечет за собой гипоксию, которая, в свою очередь, инициирует ремоделирование сосудов, развивающееся под влиянием индуцированных гипоксией факторов (hypoxia-induced factors – HIFs) [2,3]. В последние годы ангиогенез печени стали рассматривать в контексте различных воспалительных, фиброзных и ишемических состояний, хотя ранее его связывали только с опухолевыми процессами [4]. Известно, что вирус гепатита С обладает тропностью к клеткам сосудистой стенки, что свойственно инфекционным агентам [5, 6]. Связанные с этим сосудистое воспаление и изменения в ангиогенезе способствуют также повышению риска развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [7].

Среди ангиогенных факторов следует, прежде всего, выделить васкулоэндотелиальный фактор роста типа А (VEGF-A) – гомодимерный высокогликозилированный сигнальный белок, индуцирующий пролиферацию эндотелия путем связывания со своими тирозинкиназными рецепторами VEGF-R1 (Flt1) и VEGF-R2 (KDR) [8]. VEGF является самой важной молекулой, участвующей в формировании размера и количества фенестр в синусоидальных эндотелиальных клетках печени. В эксперименте с клеточными культурами удаление данного фактора из питательной среды приводило к потере фенестр, а повторное внесение VEGF в среду – к их восстановлению [9, 10].

К числу важных регуляторов процесса ангиогенеза относят также белок ангиогенин (ANG) – полипептид из суперсемейства рибонуклеаз (RNase), активирующий клеточно-ассоциированные протеазы, стимулирующий синтез ДНК и пролиферацию в культурах тканей с низкой плотностью эндотелиальных клеток [11]. Взаимодействие между ANG, плазминогеном, активатором плазминогена, эластазой и ангиостатином, очевидно, представляет собой регуляторную систему, обеспечивающую равновесие между ангиогенезом и антиангиогенезом [12]. Усиление синтеза ANG в печени при ее повреждении связано с быстрой пролиферацией сосудистого эндотелия, неизбежной при регенерации пораженного органа [11].

Известно, что к стимуляторам неоангиогенеза, кроме отмеченных выше VEGF и ANG, относят фактор роста фибробластов (FGF), эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующие факторы роста α и β (TGF- α , TGF- β), инсулинподобный фактор роста-1 (IGF-1), оксид азо-

та (NO), интерлейкин-8 и неспецифические факторы, такие как матриксные металлопротеиназы (MMPs). К ингибиторам неоангиогенеза относятся эндостатин, растворимые рецепторы VEGF (sVEGF-R), тромбоспондин, ангиостатин (фрагмент плазминогена), вазостатин, рестин, ингибиторы MMP (TIMP-1, TIMP-2) [3].

Установлено, что при хронических вирусных гепатитах (ХВГ) и циррозах печени (ЦП) вирусной этиологии имеются признаки повреждения и дисфункции эндотелия, выраженность которых зависит от тяжести патологического процесса [13, 14]. Полагают, что тромбомодулин (ТМ) и фактор Виллебранда (vWf) могут быть предикторами нарушений функции эндотелиальных клеток при повреждении печени, вызываемом вирусами гепатита В и С [15]. Ключевую роль при данных заболеваниях играет патологический ангиогенез – формирование новых кровеносных сосудов из уже существующих, при этом общая ангиоархитектоника оказывается нарушенной [16]. Фиброз и воспаление способствуют образованию новых сосудистых структур в печени. В последнее десятилетие, несмотря на успехи в лечении хронических заболеваний печени (ХЗП), все еще остается проблемой объективно оценить эволюцию регенерационного процесса в печени на фоне терапии, так как обычный клинико-лабораторный анализ сывороточных показателей функции печени и маркеров фиброза является недостаточным. По этой причине весьма актуален поиск значимых биомаркеров, отражающих прогрессирование болезни печени. Полагают, что уровни VEGF и других факторов ангиогенеза и состояние эндотелиальной дисфункции могут служить прогностическими маркерами хронического гепатита С (ХВГ С) и отражать реакцию организма больного на проводимую терапию [17].

Цель исследования – оценка роли факторов ангиогенеза и эндотелиальной дисфункции при персистирующих хронических вирусных гепатитах у детей и подростков.

Материал и методы. Было обследовано 35 детей (23 мальчика, 12 девочек) с ХВГ, которые составили основную группу. Возраст пациентов колебался от 3 до 18 лет ($11,8 \pm 0,7$ лет). В зависимости от этиологии гепатита пациентов распределили в две подгруппы: I – с ХВГ В ($n=11$), II – с ХВГ С ($n=24$). Референсную группу составили 120 условно здоровых детей, не имевших изменений со стороны желудочно-кишечного тракта и желчевыводящих путей, и без поражения иных органов и/или систем, патология которых влечет за собой изменение печеночной ткани и ремоделирование стенок сосудов, проходивших плановое обследование в консультативном отделении НИИ педиатрии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Пациентам основной группы

Таблица 1

Изменение уровня ангиогенных факторов у детей и подростков с хроническими вирусными гепатитами

Показатели	Основная группа (1) (n = 35)	Подгруппа I (2) (n = 11)	Подгруппа II (3) (n = 24)	Референсная группа (4) (n = 122)
ANG нг/мл	277,1±28,5 (n=30)	264,9±61,4	281,2±32,2	289,3±4,5 (n=118)
VEGF-A пг/мл	195,1±35,9 (n=29)	238,0±79,0	178,7±37,7 $p_{3/4} < 0,001$	354,0±17,6 (n=122) $p_{1/4} < 0,001$
sVEGF-R1 пг/мл	222,9±33,0 $p_{1/4} < 0,05$	198,8±38,2	192,1±27,1	151,5±10,0 (n=70)
sVEGF-R2 пг/мл	18267±919 $p_{1/4} < 0,01$	17173±1238	18683±1184 $p_{3/4} < 0,01$	14829±262 (n=50)
Тромбомодулин нг/мл	38,4±3,9 (n=34) $p_{1/4} < 0,001$	32,3±6,8 $p_{2/4} < 0,05$	41,2±4,7 $p_{3/4} < 0,001$	14,4±0,8 (n=50)
PLG %	96,8±3,8	90,2±6,5	99,6±4,6	92,2±2,3 (n=20)
vWf %	125,1±13,0 (n=34)	127,3±17,6	108,7±7,4	95,8±12,2 (n=20)
VIII %	77,2±4,2 (n=32) $p_{1/4} < 0,01$	70,0±4,0	79,6±5,6 $p_{3/4} < 0,01$	65,4±6,0 (n=20)
VEGF-A+ANG/ sVEGF-R1+ sVEGF-R2	16,2±2,2 $p_{1/4} < 0,05$	15,4±3,8	16,5±2,4 $p_{3/4} < 0,05$	23,0±1,6
sVEGF-R1/ VEGF-A	1,19±0,24 $p_{1/4} < 0,05$	1,0±0,18 $p_{2/4} < 0,05$	1,29±0,33 $p_{3/4} < 0,05$	0,51±0,07
sVEGF-R2/ sVEGF-R1	106,6±11,1 $p_{1/4} < 0,01$	118,0±22,8 $p_{2/4} < 0,05$	94,4±7,5	62,6±3,0 $p_{3/4} < 0,01$

Примечание. $p_{1/4}$ – достоверность различий между 1-й и 4-й группой; $p_{2/4}$ – достоверность различий между 2-й и 4-й группой; $p_{3/4}$ – достоверность различий между 3-й и 4-й группой.

с целью оценки стадии фиброза была выполнена транзитная эластография печени. Для проведения корреляционного анализа вводили баллы: фиброза нет – 0, слабый фиброз-1, умеренный фиброз – 2, выраженный фиброз – 3, цирроз – 4. Концентрации ключевых факторов ангиогенеза – VEGF-A, ангиогенина (ANG), растворимых рецепторов sVEGF-R1 и sVEGF-R2, а также маркера эндотелиальной дисфункции – тромбомодулина (ТМ) определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом с помощью специальных наборов реагентов (BCM Diagnostics, США). Содержание фактора Виллебранда vWf определяли в плазме крови методом иммунотурбидиметрии (Siemens, Германия). Плазминоген (PLG) определяли при проведении расширенной коагулограммы. Проводили сравнение изменений соотношения содержания про- и антиангиогенных факторов. Для этого изучаемые параметры приводили к единой размерности в пкг/мл.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием персонального компьютера и программы Statistica. Различия между группами считали статистически значимыми при вероятности прогноза ($p < 0,05$). Коэффициент корреляции определяли по Пирсону.

Результаты. Концентрации биомаркеров ангиогенеза и дисфункции эндотелия (ДЭ), определенные у пациентов с ХГВ и С, а также у условно здоровых детей представлены в табл. 1.

Как видно из представленных данных, в основной группе больных уровень ANG (277,1±28,5 нг/мл) статистически достоверно не отличался от такового в референсной группе (см.табл.1), однако отмечены значительные колебания этого показателя. Так, у 24 больных содержание ANG составило 384,1±20,2 нг/мл, а у 11 больных – 84,5±5,9 нг/мл ($p < 0,001$). В зависимости от типа вируса различий в уровне ANG выявлено не было.

Содержание VEGF-A колебалось в значительных

пределах – от 0 до 843,4 пг/мл, среднее значение составило 195,1±35,9 пг/мл, что было значимо ниже ($p < 0,01$) данного показателя в референсной группе (n=122), у которых колебания были менее выраженными: 14,5-742 пг/мл, а средняя его концентрация составила 354,0±17,6 пг/мл. Содержание VEGF-A во II подгруппе было ниже, чем в I, и достоверно ниже, чем в группе условно здоровых детей ($p < 0,001$).

Уровень sVEGF-R1 ($p < 0,05$) и sVEGF-R2 ($p < 0,01$) у больных основной группы был выше, чем в референсной группе. Нам представилось интересным сравнить величину соотношения проангиогенных к антиангиогенным факторам (VEGF-A+ANG/ sVEGF-R1+ sVEGF-R2). Оказалось, что в основной группе количество антиангиогенных факторов преобладало над проангиогенными, при этом во II подгруппе эта разница была статистически значимой по сравнению с референсной группой ($p < 0,05$). Далее мы сравнили величину соотношения sVEGF-R1/VEGF-A. В референсной группе это соотношение составило 0,51, в то время как в основной группе больных – 1,19 ($p < 0,05$). Таким образом, в I подгруппе детей оно было несколько ниже ($p < 0,05$), чем во II, но превышало данный показатель референсной группы.

Также если в группе условно здоровых детей соотношение sVEGF-R2/sVEGF-R1 составило 62,6, то в основной группе – 106,6 ($p < 0,01$), в I подгруппе – 118,0 ($p < 0,05$) и во II подгруппе – 94,4 ($p < 0,01$).

Изменения маркеров эндотелиальной дисфункции. Как видно из представленных данных, у пациентов основной группы отмечается значимое увеличение в крови концентрации ТМ и активности фактора VIII по сравнению с группой условно здоровых детей ($p < 0,001$ и $p < 0,01$, соответственно).

Уровень vWf в основной группе хотя и имел тенденцию к повышению, но статистически не отличался от такового у здоровых детей, что мы связываем с малой

Изменение уровня ангиогенных факторов в зависимости от содержания VEGF-A у больных с хроническими гепатитами В и С

Показатели	Повышенный уровень VEGF-A 275,8±28,7 пг/мл; (n = 16)	Значительно сниженный уровень VEGF-A 33,5±9,5 пг/мл; (n = 12)	Референсная группа (p) 354,0±17,6 пг/л
ANG нг/мл	265,0±36,7	293,3±44,2	289,3±4,5 (n=118)
sVEGF-R1 пг/мл	186,0±19,1	254,6±46,6 $p_p < 0,05$	151,5±10,0 (n=70)
sVEGF-R2 пг/мл	18316±5430	18197±1587 $p_p < 0,05$	14829±262 (n=50)
Тромбомодулин пг/мл	36,7±3,6 $P_p < 0,001$	41,5±7,8 $p_p < 0,001$	14,4±0,8 (n=50)
PLG, %	101,5±3,6 $P_p < 0,05$	88,3±6,4	92,2±2,3 (n=20)
vWf, %	112,7±8,3	115,7±11,7	95,8±12,2 (n=20)
VIII, %	73,4±3,9	90,4±9,6 $p_p < 0,05$	65,4±6,0 (n=20)
VEGF-A+ANG/ sVEGFR1+sVEGF-R2	15,3±3,1 $P_p < 0,05$	17,2±3,4	23,0±1,6
sVEGF-R1/ VEGF-A	0,81±0,11	5,91±0,92	0,51±0,07
sVEGF-R2/ sVEGF-R1	88,8±8,4	95,3±17,3	62,6±3,0

Примечание. p_p – достоверность различий с референсной группой.

выборкой пациентов. Аналогичные изменения выявлены и для PLG.

Особенности взаимосвязей ангиогенных и антиангиогенных факторов с биохимическими показателями сыворотки крови. В общей группе взаимосвязи ANG с другими показателями не выявлено. У детей подгруппы I выявлялась положительная корреляция уровня ANG с содержанием ГГТ ($r=0,89$), количеством тромбоцитов ($r=0,68$). Во II подгруппе выявлялись только корреляции между ANG и vWf ($r=0,58$).

Уровень VEGF-A у больных I подгруппы коррелировал с содержанием vWf ($r=0,88$), содержанием sVEGF-R2 ($r=0,55$) и наличием фиброза печени по данным транзитной эластографии ($r=-0,52$). В то же время у больных II подгруппы корреляций уровня VEGF-A с лабораторными и инструментальными показателями не выявлено. В общей группе уровень VEGF-A коррелировал с vWf ($r=0,47$).

Не обнаружено различий в содержании sVEGF-R1 у больных I и II подгрупп. Во II подгруппе выявлялась корреляционная связь sVEGF-R1 с содержанием АЛТ ($r=0,65$) и АСТ ($r=0,51$). В I подгруппе выявлялась корреляционная связь sVEGF-R1 с содержанием ТМ ($r=0,64$), PLG ($r=0,66$), vWf ($r=-0,53$).

Содержание sVEGF-R2 у больных основной группы было значительно выше, чем в группе условно здоровых детей ($p < 0,01$), выявлены корреляции sVEGF-R2 с уровнем ТМ ($r=0,49$); содержанием тромбоцитов ($r=0,53$). Содержание sVEGF-R2 у больных II подгруппы было выше, чем у детей I подгруппы. У детей в подгруппе II данный показатель коррелировал с содержанием ТМ ($r=0,51$).

В основной группе уровень PLG отрицательно коррелировал с фиброзом ($r=-0,50$), выявляемым у больных. В I подгруппе выявлялись корреляционные связи ТМ с PLG ($r=0,94$), АЛТ ($r=0,73$) и АСТ ($r=0,58$), vWf коррелировал с АЛТ ($r=-0,62$) и АСТ ($r=-0,83$). Также в подгруппе II выявлялись корреляционные связи PLG с АСТ ($r=-0,48$) и фиброзом печени, выявляемым у больных ($r=-0,59$).

Как указывалось, ранее, по содержанию VEGF-A основная группа обследованных больных была очень неоднородной. Почти у половины пациентов ($n=12$) уровень VEGF-A был очень низким ($33,5 \pm 9,5$ пг/мл), у остальных – относительно повышенным. Интересно отметить, что при низком содержании VEGF-A выявлялась взаимосвязь этого показателя с вирусоносительством больного: отрицательная – с ХГС ($r=-0,48$) и положительная – с ХГВ ($r=0,48$). В то же время значимых различий в содержании ANG в разных подгруппах выявлено не было. Выявлялись взаимосвязи ANG с sVEGF-R1 ($r=-0,55$), vWf ($r=0,54$), VIII ($r=0,62$). На фоне сниженного уровня VEGF-A отмечалось значительное повышение содержания в сыворотке крови растворимого рецептора sVEGF-R1 (табл.2). Уровень sVEGF-R2 в сыворотке не зависел от содержания VEGF-A. При низком уровне VEGF-A выявлены корреляционные связи sVEGF-R2 с ТМ ($r=0,46$), тромбоцитами ($r=0,49$); у больных с более высоким содержанием VEGF-A корреляционные связи были более сильными: с ТМ ($r=0,57$), с тромбоцитами ($r=0,59$).

Отношение sVEGF-R2/sVEGF-R1 в группе с низким содержанием VEGF-A положительно коррелировало с vWf ($r=0,64$); отношение sVEGF-R1/VEGF-A в этой же группе пациентов положительно коррелировало с PLG ($r=0,63$).

Содержание ТМ у пациентов с низким VEGF-A было выше, чем у больных с более высоким содержанием VEGF-A, у последних уровень ТМ коррелировал с PLG ($r=0,69$). При низких значениях VEGF-A выявлялись положительные корреляционные связи ТМ с фиброзом ($r=0,52$), vWf ($r=0,44$). Процентное содержание PLG у больных с низким уровнем VEGF-A было сниженным по сравнению с референсной группой, и еще значительно ниже, чем у больных с относительно повышенным содержанием VEGF-A, у последних эта разница была статистически значимой. Выявлены взаимосвязи PLG с содержанием тромбоцитов ($r=-0,58$) и наличием фиброза печени ($r=-0,48$).

Отношение VEGF-A+ANG/ sVEGFR1+sVEGF-R2 у больных с уровнем VEGF-A, близким к референсным данным, было самым низким, достоверно ниже, чем в группе условно здоровых детей. У больных с низким содержанием VEGF-A это коррелировало с содержанием тромбоцитов ($r=-0,63$).

Обсуждение. В патогенезе хронических вирусных заболеваний печени большое значение имеет нарушение внутripеченочной гемодинамики, что может быть непосредственно связано с повреждением эндотелиальной выстилки синусоидальных клеток печени вирусом. Процессы прогрессирования поражения печени, в частности, неоангиогенез и фиброз в печени, в свою очередь, связаны с функциональной состоятельностью эндотелия [18].

Имеются данные о том, что для поражений печени вирусного генеза характерно повышение показателей ангиогенеза в сыворотке крови [19]. В ходе нашего исследования было установлено, что у детей основной группы уровень VEGF-A был значимо ниже, а содержание sVEGF-R2, sVEGF-R1 – выше, чем в референсной группе.

Также оказалось, что в основной группе количество ангиогенных факторов преобладало над проангиогенными. Таким образом можно предположить, что растворимые рецепторы VEGF-R1, – R2 связали большую часть VEGFA, что в свою очередь может свидетельствовать о торможении неоангиогенеза в печени на фоне повреждения эндотелия вирусом.

В литературе имеются сведения, что сывороточные уровни VEGF положительно коррелируют с количеством тромбоцитов у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, что объясняется тем, что в присутствии опухоли тромбоциты могут переносить большое количество VEGF в своих гранулах, но при этом не сказываться на его уровне в сыворотке крови. Высказано мнение о том, что количественная оценка VEGF по отношению к количеству тромбоцитов может использоваться в качестве прогностического маркера при гепатоцеллюлярной карциноме, так как при этом заболевании наблюдались более высокие показатели VEGF и тромбоцитов по сравнению со здоровыми людьми и пациентами с ЦП [9].

В нашем исследовании выявлено изменение соотношения sVEGF-R1/VEGF-A у пациентов с ХГВ – оно было несколько ниже, чем у детей с ХГС, но превышало данный показатель референсной группы, что подтверждало недостаточность сигнальной системы VEGF-A при ХГ, а соответственно подтверждало нашу гипотезу о нарушении нормальной васкуляризации печени у пациентов с ХЗП за счет дисбаланса про- и антиангиогенных факторов.

Известно, что VEGF-R1 существует в двух формах: полноразмерного мембрансвязанного рецептора, способного передавать сигнал, и усеченного растворимого рецептора sVEGF-R1, способного связывать лиганд VEGF-A или образовывать димеры с полноразмерным рецептором и блокировать передачу сигнала. Растворимая форма sVEGF-R1 может образовывать неактивные гетеродимеры с sVEGF-R2 [20].

Полученные нами высокие уровни ТМ и vWf свидетельствуют о повреждении эндотелия сосудов, при этом у детей с ХГС концентрация ТМ выше, чем у детей с ХГВ что согласуется с данными исследователей М. Osada и соавт.[21], которые обнаружили у пациентов с ХГС высокий уровень ТМ. По мнению авторов, это по-

вышение положительно коррелировало с интенсивностью прогрессирования фиброза печени.

При ХГС и ЦП, помимо механического повышения vWf (происходящего в результате выхода данного фактора при нарушении целостности сосудистой стенки), также возможно увеличение содержания этого фактора за счет усиленного потребления тромбоцитов, возникающих за счет воспалительных изменений, индуцированных действием вирусов и фиброзом печеночной ткани [22].

При ХЗП, особенно на терминальных стадиях, концентрации VIII фактора и фактора vWf в плазме крови повышаются, хотя большинство прокоагулянтных факторов оказывается сниженным [23, 24]. Такое повышение содержания VIII фактора, на примере ЦП, объясняется снижением клиренса данного фактора из плазмы крови посредством механического повышения содержания vWf (высвобождение крупных мультимеров vWf при повреждении сосудов), способствующего стабилизации его прокоагулянтной активности [25]; либо за счет недостаточной экспрессии рецепторов липопротеинов низкой плотности (мультифункционального лиганда), в норме обеспечивающих клеточный захват и разрушение VIII фактора [26].

Как установлено, основной синтез VIII фактора происходит, главным образом, в синусоидальных эндотелиальных клетках печени [27]. В плазме данный фактор практически весь связан с vWf, который защищает его от протеолитической инактивации в плазме, за счет блокирования сайтов связывания VIII фактора с фосфолипидной матрицей и протеином С [23].

Заключение. Повышенная экспрессия растворимых рецепторов VEGF-A – sVEGF-R1 и sVEGF-R2 и пониженный уровень VEGF-A свидетельствуют об усилении процессов торможения ангиогенеза при ХГ, что может указывать на патогенетическую роль этого феномена в развитии повреждений печени при данной патологии у детей, особенно при ХГС. Обнаруженные изменения показателей эндотелиальной дисфункции у обследуемых больных могут быть использованы в качестве дополнительных маркеров повреждения эндотелия сосудов печени при ХГ у детей.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 5-7, 9-12, 15-17, 19, 21,22, 24-27 см. REFERENCES)

2. Вольнец Г.В., Потапов А.С., Скворцова Т.А. Хронический вирусный гепатит у детей: Проблемы и перспективы. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2014; 69 (11-12): 46-53.
4. Сурков А.Н., Смирнов И.Е., Кучеренко А.Г., Потапов А.С., Герасимова Н.П., Зиновьева А.Е. Взаимосвязи сывороточных маркеров фиброзирования с изменениями структурно-функционального состояния печени у детей. *Российский педиатрический журнал.* 2010; 2: 28-31.
8. Гарбузенко Д.В. Морфофункциональная перестройка печеночного сосудистого русла в патогенезе портальной гипертензии при циррозе печени. *Терапевтический архив.* 2014; 2: 90-5.
13. Щекотова А.П. Клинико-лабораторные показатели и эндотелиальная дисфункция при заболеваниях печени, их диагностическая, прогностическая значимость и возможности использования для оценки эффективности терапии: Дис. ... канд. мед. наук. Пермь; 2012.

14. Булатова И.А., Щекотова А.П., Третьякова Ю.И. Дисфункции эндотелия при хронических диффузных заболеваниях печени. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90(1): 46-8.
18. Булатова И.А. Динамика гепатофиброза и ангиогенеза у больных хроническим гепатитом С на фоне противовирусной терапии. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; 4: 249-54.
20. Тырси́на Е.Г., Никулицкий С.И. Роль регуляторной VEGF/VEGF-R1-системы в опухолевом ангиогенезе (обзор литературы). *Онкогинекология*. 2015; 4: 4-12.
23. Долгов В.В., Сви́рин П.В. Лабораторная диагностика нарушенного гемостаза. М.: Триада; 2005.
13. Shchekotova A.P. Clinical and laboratory parameters, endothelial dysfunction in liver diseases, their diagnostic, prognostic significance, and the possibility of using in evaluation the effectiveness of therapy. Diss. Perm'; 2012. (in Russian)
14. Bulatova I.A., Shchekotova A.P., Tret'yakova Ju.I. Endothelial dysfunction in chronic diffuse liver disease. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 90(1): 46-8. (in Russian)
15. Sieber C. C., Sumanovski L.T., Stumm M., van der Kooij M., Battegay E. In vivo angiogenesis in normal and portal hypertensive rats: role of basic fibroblast growth factor and nitric oxide. *J. Hepatol*. 2001; 34: 644-50.
16. Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 380 (9859): 2095-2128.

REFERENCES

1. Thabut D., Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: New targets for the treatment of portal hypertension? *J. Hepatol*. 2010; 53(5): 976-80. .
2. Volynets G.V., Potapov A.S., Skvortsova T.A. Chronic hepatitis C in children: problems and prospects. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2014; 69 (11-12):46-5. (in Russian)
3. Kukla M. Angiogenesis a phenomenon which aggravates chronic liver disease progression. *Hepatol. Int*. 2013; 7 (1):4-12.
4. Surkov A.N., Smirnov I. Ye., Kucherenko A.G., Potapov A.S., Gerasimova N.P., Zinov'yeva A. Ye. Relationships of serum fibrosis markers to hepatic structural and functional changes in children. *Rossiyskiy pediatricheskiy zhurnal*. 2010; 2: 28-31. (in Russian)
5. Shah P.K. Link between infection and atherosclerosis: who are the culprits: viruses, bacteria, both, or neither? *Circulation*. 2001; 103: 5-6.
6. Ishizaka N., Ishizaka Y., Takahashi E. et al. Association between hepatitis C virus seropositivity, carotid-artery plaque, and intimamedia thickening. *Lancet*. 2002; 359: 133-5.
7. Nielsen N.S, Jespersen S., Gaardbo J.C., Arnbjerg C.J., Clausen M.R. et. al. Impaired Platelet Aggregation and Rebalanced Hemostasis in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18(5). doi: 10.3390/ijms18051016.
8. Garbuzenko D.V. Morphofunctional rearrangement of the hepatic vasculature in the pathogenesis of portal hypertension in liver cirrhosis. *Terapevticheskij arkhiv*. 2014; 86 (2): 90-5. (in Russian)
9. Kim S.J., Choi I K., Park K.H., Yoon S.Y., Oh S. C. Serum vascular endothelial growth factor per platelet Count in hepatocellular carcinoma: correlations with clinical parameters and survival. *Jpn J Clin Oncol*. 2004; 34(4): 184-190.
10. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473: 298-307.
11. Tello-Montoliu A., Patel J.V., Lip J.Y.H. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 4(9): 1864-74.
12. Barcena C., Stefanovic M., Tutusaus A., Martinez-Nieto G.A. et al. Angiogenin secretion from hepatoma cells activates hepatic stellate cells to amplify a self-sustained cycle promoting liver cancer. *Sci. Rep*. 2015; 5:7916.
17. Srivastava A., Shukla V., Tiwari D., Gupta J., Kumar S. et. al. Targeted therapy of chronic liver diseases with the inhibitors of angiogenesis. *Biomed. Pharmacother*. 2018; 105: 256-66.
18. Bulatova I.A. The dynamics of hepatofibrosis and angiogenesis in patients with chronic hepatitis C on the background of antiviral therapy. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 4: 249-54. (in Russian)
19. Wynn A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol*. 2008. 21(4): 199-207.
20. Tyrsina E.G., Nikulitskiy S.I. The Role of regulatory VEGF/VRGF-R1-System in Tumor Angiogenesis (A literature review). *Onkologiya*. 2015; 4: 4-12. (in Russian)
21. Osada M., Kaneko M., Sakamoto M., Endoh M., Takigawa K., Suzuki-Inoue K. et al. Causes of thrombocytopenia in chronic hepatitis C viral infections. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2013; 18 (3): 272-80.
22. Nielsen N.S, Jespersen S., Gaardbo J.C., Arnbjerg C.J., Clausen M.R. et. al. Impaired Platelet Aggregation and Rebalanced Hemostasis in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18(5). doi: 10.3390/ijms18051016.
23. Dolgov V.V., Svirin P.V. Laboratory diagnostics of hemostatic abnormalities [Laboratornaya diagnostika narusheniy gemostaza]. Moscow: Triada; 2005. (in Russian)
24. Tripodi A., Mannuccio Mannucci P. The coagulopathy of chronic liver disease. *The New England Journal of Medicine*. 2011; 365: 147-56.
25. Hollestelle M. J., Geertzen H.G., Straatsburg I.H., van Gulik T.M., van Mourik J.A. Factor VIII expression in liver disease. *Thromb Haemost*. 2004; 91: 267-75.
26. Younossi Z. M., Stepanova M., Afendy M. et al. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver disease in the United States from 1988 to 2008. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2011; 9 (6): 524-30.
27. Pluta A., Gutkowski K., Hartleb M. Coagulopathy in liver diseases. *Advances in Medical Sciences*. 2010; 55 (1): 16-21.

Поступила 30.09.19

Принята к печати 01.10.19

Тепленький М.П., Кузнецова Е.И., Чепелева М.В., Спиркина Е.С., Лунева С.Н., Гасанова А.Г., Матвеева Е.Л.

КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У ДЕТЕЙ ПРИ ОСТЕОХОНДРОПАТИИ ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г. А. Илизарова», Минздрава РФ, 640014, Курган, Россия

Дегенеративно-дистрофические процессы в суставных тканях сопровождаются изменениями показателей врожденного иммунитета, что является следствием иммунных реакций на асептическое воспаление. Цель настоящего исследования – изучить кислородзависимые механизмы фагоцитарной активности нейтрофилов (НСТ-тест, активности миелопероксидазы), биохимические показатели перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков и активности ферментов антиоксидантной защиты у детей (в возрасте 12 – 16 лет) с остеохондропатией головки бедренной кости. В обследованной группе было выявлено повышение спонтанного НСТ-теста и содержание миелопероксидазы в нейтрофилах, снижение индекса стимуляции НСТ, а также статистически значимое повышение активности супероксиддисмутазы, основного продуцента гидропероксида. При этом, не обнаружено увеличение активности каталазы и содержания продуктов липопероксидации, однако, выявлено перераспределение продуктов окислительной модификации белков с преобладанием кетонов. При развитии у детей остеохондропатии наблюдается активация кислородзависимых механизмов фагоцитарной активности нейтрофилов, возрастает количество вторичных продуктов пероксидации белков – кетонов. Увеличение активности СОД, при одновременном и достоверном снижении активности каталазы свидетельствует о накоплении гидропероксида вызывающей активизацию и хемотаксис нейтрофилов. Данные исследования можно использовать для прогнозирования развития остеонекроза в качестве дополнительных критериев при принятии решения о целесообразности выполнения реконструктивных операций на суставе.

Ключевые слова: остеохондропатия головки бедренной кости; фагоцитарная активность нейтрофилов; НСТ-тест; миелопероксидаза; малоновый диальдегид; диеновые конъюгаты; каталаза; супероксиддисмутаза.

Для цитирования: Тепленький М.П., Кузнецова Е.И., Чепелева М.В., Спиркина Е.С., Лунева С.Н., Гасанова А.Г., Матвеева Е.Л. Кислородзависимые механизмы и окислительный стресс у детей при остеохондропатии головки бедренной кости. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 594-598. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-594-598>

Teplen'kiy M.P., Kuznetsova E.I., Chepeleva M.V., Spirkina E.S., Luneva S.N., Gasanova A.G., Matveeva E.L.

OXYGEN-DEPENDENT MECHANISMS AND OXIDATIVE STRESS IN CHILDREN FOR FEMORAL HEAD OSTEOCHONDROPATHY

FSBI Russian Ilizarov Scientific Centre "Restorative Traumatology and Orthopaedics" of the RF Ministry of Health, 640014, Kurgan, Russian Federation

Degenerative-dystrophic processes in the articular tissues are accompanied by the changes in the values of congenital immunity, being a result of immune responses to aseptic inflammation. The purpose of this study – to investigate the oxygen-dependent mechanisms of neutrophil phagocytic activity (NBT-test, myeloperoxidase activity), the biochemical values of lipid peroxidation, the oxidative modification of proteins and the activity of enzyme antioxidant protection in children (at the age of 12-16 years) with osteochondropathy of the femoral head. The increase in spontaneous NBT-test and myeloperoxidase content in neutrophils, the decrease in NBT stimulation index, as well as the statistically significant increase in the activity of superoxide dismutase, the main producer of hydroperoxide, was revealed in the group examined. At the same time, no increase in catalase activity and in the content of lipoperoxidation products was observed, however, redistribution of the products of oxidative modification of proteins with ketone predominance was found. In case of osteochondropathy development in children the activation of the oxygen-dependent mechanisms of neutrophil phagocytic activity is observed, as well as the increase in the number of the secondary products of protein peroxidation – ketones. An increase in SOD activity, with a simultaneous and significant decrease in catalase activity evidence of accumulation of hydroperoxide causing neutrophil activation and chemotaxis. The study data can be used for predicting osteonecrosis development as additional criteria when decision-making of the advisability of performing reconstructive surgeries of the joint.

Key words: osteochondropathy of the femoral head; neutrophil phagocytic activity; NCT – test; myeloperoxidase; malondialdehyde; diene conjugates; catalase; superoxide dismutase.

For citation: *Teplen'kiy M.P., Kuznetsova E.I., Chepeleva M.V., Spirkina E.S., Luneva S.N., Gasanova A.G., Matveeva E.L. Oxygen-dependent mechanisms and oxidative stress in children for femoral head osteochondropathy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (10): 594-598. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-594-598>*

For correspondence: *Kuznetsova E.I., Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics; e-mail: citoz@mail.ru*

Information about authors:

Teplenkiy M.P., ORCID iD <https://orcid.org/0000-0002-1973-5192>

Kuznetsova E. I., ORCID iD <https://orcid.org/0000-0001-8022-5696>

Chepeleva M. V., ORCID iD <https://orcid.org/0000-0002-9731-115X>

Spirkina E.S., ORCID iD <https://orcid.org/0000-0003-2506-2657>

Luneva S.N., ORCID iD <https://orcid.org/0000-0002-0578-1964>

Gasanova A.G., ORCID iD <https://orcid.org/0000-0001-7734-2808>

Matveeva E.L., ORCID iD <https://orcid.org/0000-0002-7444-2077>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 05.07.2019

Accepted 20.07.2019

Введение. Несмотря на полиэтиологичный характер, ключевым моментом развития патологии признается нарушение кровоснабжения в головке бедра, ведущее к прогрессированию ишемического некроза [1]. Травмы, инфекции микробной и вирусной этиологии, гормональные перестройки в переходном возрасте могут служить пусковым механизмом для развития у детей остеохондропатии головки бедренной кости (ОГБК) [2, 3]. Установлено, что дегенеративно – дистрофические процессы в суставных тканях сопровождаются изменениями показателей иммунитета, что является следствием иммунных реакций на асептическое воспаление [4-6]. Ключевую роль в первую фазу иммунного ответа при воспалительных процессах как инфекционного, так и неинфекционного генеза играют нейтрофилы, одной из главных функций которых является уничтожение и элиминация опсонированных клеток при помощи высокоактивных ферментов и кислородных радикалов. На окружающие ткани лизосомальные продукты активированных нейтрофилов оказывают повреждающее воздействие [7]. Возможно, развивающаяся при этом гипоксия вызывает дисбаланс в реализации свободнорадикальных реакций и системе перекисного окисления липидов (ПОЛ) – антиоксидантная система (АОС). По мнению ряда авторов, определенную роль в развитии болезни играет оксидантный стресс и снижение защитной функции АОС.

Целью исследования являлось исследование показателей перекисидации, НСТ-теста, активности миелопероксидазы и ферментов антиоксидантной защиты у детей с остеохондропатией головки бедренной кости.

Материал и методы. Основу исследования составили результаты, полученные при предоперационном иммунологическом обследовании 18 пациентов с ОГБК. Критерии включения: 12 - 16 лет (13,5 (12,0;14,5), мужской пол, IV стадия по Waldenstrom, коксартроз 0-I степени по Tonnis, отсутствие острых и хронических заболеваний, которые могли бы оказать влияние на результаты исследования. Критерии исключения: I - III стадия по Waldenstrom, коксартроз II-III степени. Для всех пациентов был характерен болевой синдром, умеренно выраженный, связанный с нагрузкой. В 5 случаях наблюдалось нарушение походки в виде прихрамывания, в 13 случаях - хромота без использования дополнительных средств опоры. Во всех наблюдениях отмечен положительный симптом Тренделенбурга III типа, положительный RIM синдром. Во всех суставах диагностировано ограничение внутренней ротации и отведения, которые в 7 случаях сочетались с дефицитом сгибания до 90 - 100°. Величина относительного укорочения составляла 1 - 3 см. Объектом исследования послужила кровь из локтевой вены, взятая натощак. Контрольную группу составили

12 практически здоровых подростков аналогичного возраста и пола.

Метаболическую активность нейтрофилов оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) по методу Park, в двух вариантах: спонтанном и стимулированном. В качестве стимулятора использовали микробную тест - культуру *Staphylococcus epidermidis* штамм № 9198 «НИИЭМ» СЗО РАМН. Активность миелопероксидазы (МП) определялась по Грехему – Кнолю. Уровень МП выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Окраску препаратов осуществляли по Романовскому – Гимзе. Учет результатов проводился при помощи светового микроскопа Axio Lab.A 1 (Karl Zeiss MicroImaging GmbH; объектив 100 (МИ), окуляр 12,5x) с использованием иммерсии.

Общее количество белка (ОБ) измеряли методом количественного определения белков с помощью биуретовой реакции. Метод определения окислительной модификации белков в сыворотке крови основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином, путем осаждения белка с последующим растворением осадка. Концентрацию альдегидов (ОМБ₂₇₀ первичные продукты) и кетонов (ОМБ₃₆₃₊₃₇₀ вторичные продукты) выражали в единицах оптической плотности на мг белка [8]. Среди первичных механизмов повреждения клеток при окислительном стрессе исследованы промежуточные вещества продуктов липопероксидации - первичные продукты - диеновые конъюгаты (ДК). Расчет содержания первичных продуктов ПОЛ проводили спектрофотометрическим методом, который представлен разностью оптической плотности между опытной и контрольной пробами [9]. Определение концентрации вторичных продуктов липопероксидации - малоновый диальдегид (МДА) основан на реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре образует окрашенный триметиповый комплекс и имеет максимум поглощения при 532 нм. Концентрацию первичных и вторичных продуктов перекисного окисления рассчитывали на мг общих липидов, которые определяли колориметрическим методом с использованием ортофосфорной кислоты. Основной функцией фермента каталазы является освобождение клетки от избытка перекиси водорода, которая образуется при многих окислительно-восстановительных процессах. Активность фермента каталазы определяли по скорости разрушения перекиси водорода [10]. Определение активности фермента антиоксидантной системы супероксиддисмутазы (СОД) проводилось в супернатантах гемолизатов эритроцитов, приготовленных по методу Nishikimi N. et al. (1972) [11]. Данный метод определения активности СОД основан на способности фермента, тормозить

автоокисление адреналина. Результаты определения липопероксидации и окислительной модификации белков были представлены в виде расчетного коэффициента суммы и отношений. Показателями нормы служили данные, полученные при исследовании крови у 10 здоровых детей в возрасте 13,0 лет. Лечение и обследования пациентов проводились квалифицированным персоналом при использовании сертифицированного оборудования в соответствии с принятыми на территории Российской Федерации стандартами. Все исследования проведены в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской

декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками. Всеми пациентами и их законными представителями было подписано информированное согласие на публикацию данных, полученных в результате исследований, без идентификации личности.

Результаты исследования представлены в виде медианы 1 – го и 3 – го квартилей (Me [Q1;Q3]). Межгрупповые сравнения проводили с использованием рангового метода Манна – Уитни. Исходный уровень альфа для принятия или отклонения нулевой гипотезы в настоящем исследовании был принят равным 0,05.

Результаты. Исследование количества нейтрофилов показало тенденцию к их увеличению в группе с ОГБК в сравнении с контрольной группой. Между тем статистически достоверных межгрупповых отличий мы не выявили (рис. 1).

В сравнении с показателями контрольной группы, у подростков с ОГБК отмечалось статистически значимое повышение спонтанного НСТ - теста, позволяющего оценить состояние кислородзависимого механизма бактерицидности фагоцитов крови *in vitro* (рис. 2).

Исследование стимулированного НСТ-теста, который позволяет получить информацию о функциональном резерве фагоцитов, достоверных отличий между контрольной и опытной группами не выявило (рис. 3).

Вследствие повышенных значений спонтанного НСТ - теста, индекс стимуляции НСТ в группе с ОГБК оказался статистически значимо ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствовало о сниженном кислородзависимом потенциале нейтрофильных фагоцитов при данной патологии (рис. 4).

Важную роль в образовании АФК (активных форм кислорода) играет миелопероксидаза (МП), являющаяся катализатором реакций, продуктами которых становятся гипохлорит, реактивные производные азота, свободные радикалы, и т. д., участвующие в процессах перекисного окисления липидов.

Главной функцией МП является противомикробная защита, при этом МП способна оказывать повреждающее влияние на собственные ткани организма [12]. Согласно результатам наших исследований, активность МП у пациентов с ОГБК достоверно превышала значения контрольной группы (рис. 5).

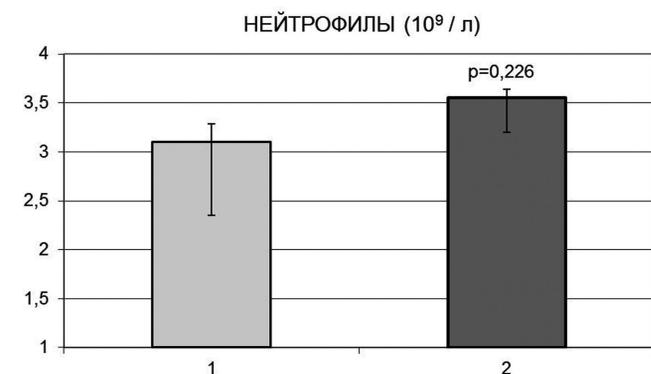


Рис. 1 Содержание нейтрофилов в периферической крови у пациентов с ОГБК (10⁹/л).

Здесь и на рис. 2-5: 1 – контрольная группа; 2 – ОГБК.

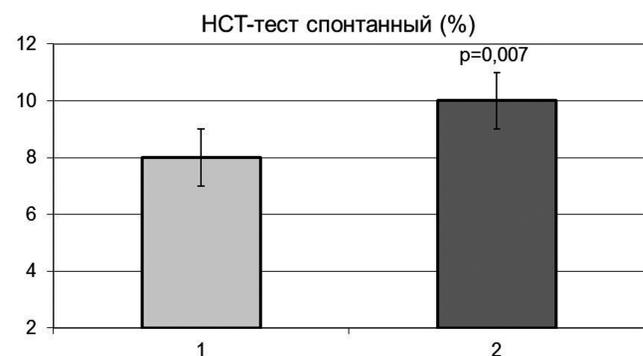


Рис. 2 Кислородзависимая активность нейтрофилов крови (НСТ-тест спонтанный) (в %).

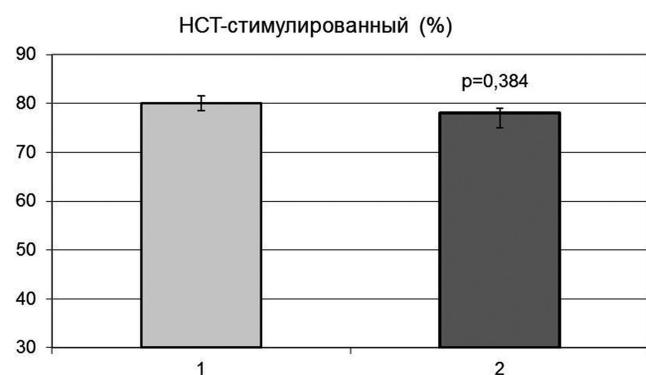


Рис. 3 Кислородзависимая активность нейтрофилов крови (НСТ-тест стимулированный) (в %).

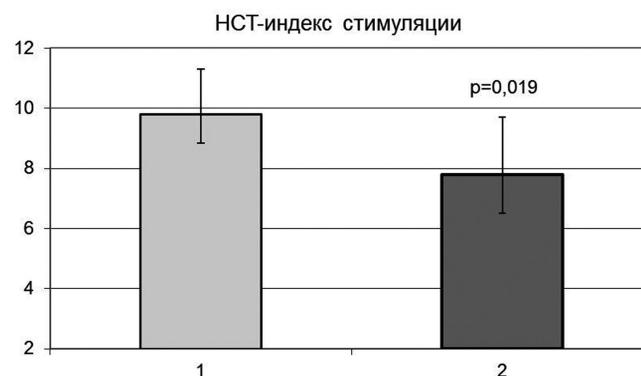


Рис. 4 Индекс стимуляции НСТ-теста.

Сравнительный анализ результатов определения показателей ПОЛ, ОМБ и активности ферментов антиоксидантной защиты проводили, сопоставляя данные полученные в группе пациентов с ОГБК и показателями группы здоровых детей. Изменения в сыворотке крови, связанные с показателями перекисидации и активностью антиоксидантных ферментов, оценивали, представив данные в таблице.

По сравнению с группой контроля у детей с ОГБК не выявлено накопления продуктов ПОЛ [ДК+МДА] или ОМБ [Альдегиды+Кетоны]. Однако, отношения между первичными и вторичными продуктами перекисидации [ДК/МДА и Альдегиды/Кетоны] изменены. Если в отношении ПОЛ доля первичных продуктов изменяется не достоверно, то в ОМБ отношение альдегидов к кетонам уменьшается статистически значимо, что говорит о преобладании вторичных продуктов ОМБ. Соответственно, концентрация кетонов – вторичных продуктов ОМБ – возрастает. Наиболее существенные изменения нами обнаружены в отношении активности ключевых ферментов антиоксидантов. Активность каталазы оказалась снижена более чем в 4 раза, но активность супероксиддисмутазы повышена в 1,7 раза.

Известно, что окислительно - восстановительные процессы являются физиологической основой жизнедеятельности клетки. В результате влияния многочисленных раздражителей на мембраны фагоцитов происходит развитие метаболических реакций, в результате которых образуются первичные и вторичные метаболиты активированного кислорода, обладающие высокой цитотоксической активностью в отношении не только микробных клеток, но и собственных тканей организма, включая костную [13]. Итогом воспаления любой этиологии, включая асептическое, становится повышение показателей кислородзависимой фагоцитарной активности нейтрофилов.

Обсуждение. Дистрофические, воспалительные и некротические изменения при ОГБК описаны во всех элементах тазобедренного сустава: в структуре кости, в артикулярных и параартикулярных тканях. Существует мнение о наличии связи этих нарушений с патологией системы перекисидации и антиоксидантной защиты [14]. Как правило, при ОГБК, параметры метаболитов перекисидации оказываются повышенными, однако, связь с определенным звеном развития патологии пока не установлена. Продукты перекисидации вовлечены в ши-

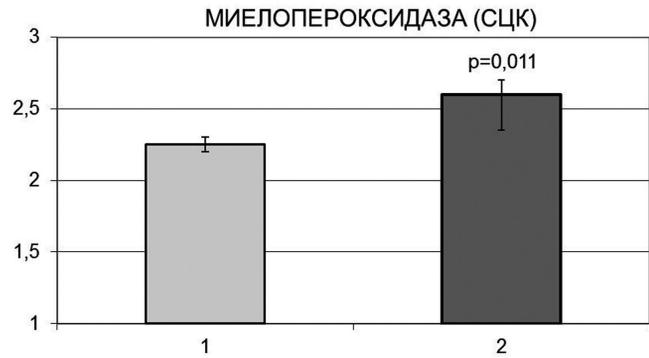


Рис. 5. Активность миелопероксидазы в нейтрофилах (СЦК).

рокий диапазон патологических процессов: их избыток способствует нарушению проницаемости мембран и меняет каталитическую активность ферментов. По данным ряда авторов при остеонекрозе наблюдается увеличение концентрации продуктов перекисидации, что не противоречит полученным нами данным, но дополняется данными об увеличении концентрации продуктов окислительной модификации белков. Оценка активности ферментов АОС показала изменения в активности ферментативного ансамбля СОД - каталаза. СОД катализирует превращение супероксидного анионрадикала с образованием пероксида водорода и кислорода, каталаза катализирует разложение пероксида водорода до воды. Снижение степени мобилизации гидроперикиси в условиях интенсивности свободнорадикальных процессов свидетельствует о ее накоплении в тканях, что способствует активации кислородзависимых механизмов фагоцитарной активности нейтрофилов [15].

Несмотря на отсутствие активного воспаления в тканях пораженного сустава и отсутствие сопутствующей соматической патологии, которая смогла бы оказать влияние на механизмы бактерицидности фагоцитов, у пациентов с ОГБК отмечается усиление кислородзависимой фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови. По нашему мнению, активация кислородзависимого метаболизма в тканях тазобедренного сустава при данной патологии является вторичной и, возможно,

Перекисное окисление липидов и карбонилирование белков под действием окислительного стресса (медиана и интерквартильные размахи)

Показатель	Норма (n=10)	Патология (n=8)
Общие липиды, г/л	7,75 (7,17;8,28)	7,29 (6,52;8,01)
Диеновые конъюгаты нмоль/г ол	5,37 (4,62;6,39)	4,92 (4,34;6,34)
Малоновый диальдегид нмоль/г ол	2,88 (2,39;3,26)	2,65 (2,48;3,06)
ДК+МДА	8,88 (7,17;11,24)	8,61 (7,08;9,28)
ДК/МДА	2,06 (1,15;2,36)	1,58 (1,45;2,18)
Общий белок г/л	72,40 (70,18;75,75)	71,20 (65,30;73,25)
Альдегиды ОМБ ед.опт.пл./ г ОБ	0,22 (0,18;0,23)	0,16 (0,13;0,19)
Кетоны ОМБ ед.опт.пл./ г ОБ	0,014 (0,012;0,015)	0,016 (0,015;0,023) ^{0,01}
Альдегиды+Кетоны	0,23 (0,20;0,24)	0,19 (0,14;0,21)
Альдегиды/Кетоны	15,69 (14,01;16,57)	7,14 (6,69;11,50) ^{0,001}
Каталаза мкатал/ г ОБ	6,92 (4,64;9,15)	1,58 (0,27;1,79) ^{0,01}
СОД мкМ НСТ 10 ⁹ эр/мин	30,95 (28,07;34,29)	52,21(35,99;52,99) ^{0,05}

Примечание: * - статистически значимые различия между группами на 0,01, 0,05, 0,001.

обусловлена вызванными асептическим воспалением, развившимся в результате остеонекроза свободнорадикальными процессами в системе ПОЛ-АОЗ, и накоплением в результате этих процессов гидропероксида [16].

В свою очередь повышение образования кислородных метаболитов нейтрофилами, избыточное их выделение во внеклеточное пространство может способствовать дальнейшему разрушению костного матрикса и эндотелия сосудов в суставных тканях, создавая тем самым, порочный круг, негативно влияющий на течение заболевания.

Заключение. Следовательно, определение показателей НСТ - теста и активности миелопероксидазы (оба теста являются унифицированными и доступными), можно использовать в качестве дополнительных критериев при принятии решения о целесообразности выполнения реконструктивных операций у пациентов с остеохондропатией тазобедренного сустава. Поиск новых эффективных средств и подходов к лечению ОГБК требует также оценки роли изменений системы перекисидации - антиоксидантной защиты для коррекции свободнорадикального гомеостаза при развитии этой патологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kim H.K.W. Pathophysiology and New Strategies for the Treatment of Legg-Calve-Perthes Disease. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2012; 94: 659-69.
2. Бородин С.В., Волков Е.Е., Гордеев М.В., Голощапов А.П. Факторный анализ биохимических и клинических показателей асептического некроза головки бедренной кости. *Гений ортопедии.* 2018; 24 (4): 487-91.
3. Захарова Н.В., Доронских В.А., Борозда И.В., Штарберг М.А. Динамика показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у пациентов с болезнью Легга – Кальве – Пертеса на фоне антиоксидантной терапии. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2010; 38: 66-70.
4. Кузнецова Е.И., Чегуров О.К., Камшилов Б.В., Чепелева М.В. Функционально-метаболический статус нейтрофильных фагоцитов у пациентов с заболеваниями суставов перед первичным и ревизионным эндопротезированием. *Гений ортопедии.* 2012; 4: 79-82.
5. Гайко Г.В., Гончарова Л.Д., Донченко Л.И., Золотухин С.Е. О механизме ранних нарушений обмена и иммунологической реактивности у детей с болезнью Пертеса. *Врачебное дело.* 2001; 1: 56-61.
6. Балабанова Р.М. Роль иммунного воспаления в патогенезе остеоартроза, возможности коррекции иммунных нарушений. *Современная ревматология.* 2011; 4: 47-78.
7. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге: Новосибирск: Наука; 1989.
8. Вьюшин А.В., Вайдо А.И., Герасимова И.А. Процессы перекисного окисления белков у крыс, селективных по порогу возбудимости нервной системы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2002; 133(3): 292 – 6.
9. Орехович В. Н. Современные методы в биохимии: Москва: Медицина; 1977.
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело.* 1988; 1: 16-9.
11. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide dismutase anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1972; 46: 849-53.
12. Рулёва Н. Ю., Звягинцева Н. А., Дугин С. Ф. Миелопероксидаза: биологические функции и клиническое значение. *Современные наукоёмкие технологии.* 2007; 8: 11-4.
13. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты: М.: Слово; 2006.
14. Захарова Н.В., Доронских В.А., Борозда И.В. Роль оксидантного стресса в возникновении болезни Легга-Кальве-Пертеса. Основные концепции патогенеза, диагностики и лечения (обзор литературы). *Якутский медицинский журнал.* 2011; 4(36): 95-9.
15. Марквичева, К.Н., Гороховатский, А.Ю., Мишина, Н.М., Мудрик, Н.Н., Винокуров, Л.М., Лукьянов, С.А., Белоусов, В.В. Сигнальная функция фагоцитарной NADPHоксидазы: активация MAP-киназных каскадов при фагоцитозе. *Биоорганическая химия.* 2010; 36 (1): 133-8.
16. Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воронников А.В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. *Биологические мембраны.* 2012; 29 (1–2): 1-17.

REFERENCES

1. Kim H.K.W. Pathophysiology and New Strategies for the Treatment of Legg-Calve-Perthes Disease. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2012; 94: 659-69.
2. Borodin S.V., Volkov E.E., Gordееv M.V., Golosshapov A.P. Factor analysis of biochemical and clinical indicators of aseptic necrosis of the femoral head. *Geniy ortopedii.* 2018; 24 (4): 487-91. (in Russian)
3. Zakharova N.V., Doronskikh V.A., Borozda I.V., Shtarberg M.A. Factor analysis of biochemical and clinical indicators of aseptic necrosis of the femoral head. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya.* 2010; 38: 66-70. (in Russian)
4. Kuznetsova E.I., Chegurov O.K., Kamshilov B.V., Chepeleva M.V. The functional metabolic status of neutrophilic phagocytes in patients with joint diseases prior to primary and revision arthroplasty. *Geniy ortopedii.* 2012; 4: 79-82. (in Russian)
5. Gayko G.V., Goncharova L.D., Donchenko L.I., Zolotukhin S.E. On the mechanism of early metabolic disorders and immunological reactivity in children with Perthes disease. *Vrachebnoe delo.* 2001; 1: 56-61.
6. Balabanova R.M. The role of immune inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis, the possibility of correcting immune disorders. *Sovremennaya revmatologiya.* 2011; 5 (4): 74-8. (in Russian)
7. Mayanskiy A.N., Mayanskiy D.N. Essays on the neutrophil and macrophage: Novosibirsk: Nauka; 1989. (in Russian)
8. Vyushin A.V., Vaido A.I., Gerasimova I.A. Protein peroxidation processes in rats selective for the excitability threshold of the nervous system. *Bul. experiment. biology and medicine.* 2002; 133 (3): 292-6. (in Russian)
9. Orekhovich V.N. Modern methods in biochemistry. Moscow: Meditsina; 1977. (in Russian)
10. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Tokarev V.E. Method for the determination of catalase activity. *Laboratornoe delo.* 1988; 1: 16-9. (in Russian)
11. Nishikimi M., Rao N.A., Yagi K. The occurrence of superoxide dismutase anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1972; 46: 849-53.
12. Ruleva N. Yu., Zvyagintseva N. A., Dugin S. F. Myeloperoxidase: biological functions and clinical significance. Modern high technology. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii.* 2007; 8: 11-4. (in Russian)
13. Men'shikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. et al. Oxidative stress. Prooxidants and Antioxidants [Oksislitel'nyi stress. Prooksidanty i antioksidanty]. Moscow: Slovo; 2006. (in Russian)
14. Zakharova N.V., Doronskikh V.A., Borozda I.V. The role of oxidative stress in the occurrence of Legg-Calve-Perthes disease. The main concepts of pathogenesis, diagnosis and treatment (literature review). *Yakutskiy Meditsinskiy zhurnal.* 2011; 4(36): 95-9. (in Russian)
15. Markvicheva K.H., Gorohovatskiy A.Yu., Mishina H.M., Mudrik N.N., Vinokurov L.M., Luk'yanov, S.A., Belousov V.V. Phagocytic NADPH oxidase signaling function: activation of MAP kinase cascades during phagocytosis. *Bioorganicheskaya khimiya.* 2010; 36 (1): 133-8. (in Russian)
16. Tkachuk V.A., Tyurin-Kuz'min P.A., Belousov V.V., Voronnikov A.V. Hydrogen peroxide as a new secondary mediator. *Biologicheskie membrany.* 2012; 29 (1–2): 1-17. (in Russian)

Поступила 05.07.19

Принята к печати 20.07.19

ГЕМАТОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Петрова О.В.^{1,2}, Шабанова Г.Р.¹, Мурыгина О.И.¹, Панова Е.В.¹, Никулина Д.М.²

ПОВЫШЕНИЕ КАЧЕСТВА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ СИГМОМЕТРИИ

¹ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» Минздрава РФ, 414011, Астрахань, Россия;

²ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 414000, Астрахань, Россия

Оценивали качество выполнения гематологических исследований с помощью сигмометрии. Исследование проводили в ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии». Данные собирали в период 2017 г. Ежедневно контролировались следующие гематологические показатели: лейкоциты, эритроциты, тромбоциты, гемоглобин. Для проведения внутрилабораторного контроля качества использовали сертифицированный аттестованный 3-х уровневый (Level 1 (Low), Level 2 (Norma), Level 3 (High)) контрольный материал «CBC-XE Hematology control» (фирмы «R and D Systems», USA). Исследование гематологических показателей крови проводили на автоматических гематологических анализаторах «Sysmex XT- 2000i» и «Sysmex XT- 1800i» («Sysmex Corporation», Япония). Значения сигмометрии были рассчитаны с использованием CV (коэффициента вариации), систематической погрешности (Bias) и общей допустимой аналитической ошибки (TE_{max}).

На анализаторе «Sysmex XT – 2000i» значения Sigma тромбоцитов были в пределах от 3 до 4, а у лейкоцитов, эритроцитов и гемоглобина значения Sigma больше 4. На анализаторе «Sysmex XT – 1800i» значения Sigma у лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и гемоглобина значения Sigma были больше 4.

На основании полученных результатов сделали выводы по выбору контрольного материала, частоте и кратности проведения внутрилабораторного контроля качества. Внедрение сигмометрии в повседневную деятельность клинической лаборатории позволит улучшить качество определения тромбоцитов, что требует дальнейших наблюдений.

Ключевые слова: сигмометрия; внутрилабораторный контроль качества; гематологические показатели; кровь.

Для цитирования: Петрова О.В., Шабанова Г.Р., Мурыгина О.И., Панова Е.В., Никулина Д.М. Повышение качества гематологических исследований с помощью сигмометрии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 599-602. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-599-602>

Petrova O.V.^{1,2}, Shabanova G.R.¹, Murygina O.I.¹, Panova E.V.¹, Nikulina D.M.²

IMPROVING THE QUALITY OF HEMATOLOGICAL STUDIES USING SIGMAMETRY

¹Federal state budgetary establishment «Federal center cardiovascular surgery» (Astrakhan) Russia, 414011, Astrakhan, Russia;

²Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414000, Russia

The purpose – evaluated the quality of the implementation of hematology studies using sigmametry. Studies were performed at the Federal state budgetary establishment “Federal center cardiovascular surgery”. The data were collected in the period for 2017 y. The following hematology parameters were monitored daily: white cells, red blood cell, platelet, hemoglobin. For conducting laboratory quality control we used certified three-level (Level 1 (low) , Level 2 (normal)and Level 3 (High)) control material “CBC-XE Hematology control” (“R and D Systems”, USA). The study of blood hematology parameters was carried out on an automatic hematology analyzer “Sysmex XT- 2000i” and “Sysmex XT- 1800i” (“Sysmex Corporation”, Japan). Sigmametry values were calculated the CV (coefficient of variation), the systematic error (Bias) and the total allowable analytical error (TE_{max}). On the analyzer «Sysmex XT- 2000i» sigma values for platelet were between 3 and 4. For white blood cells, red blood cells, hemoglobin the value of the sigma was greater than 4.

On the analyzer «Sysmex XT- 1800i» for platelet, white blood cells, red blood cells, hemoglobin the value of the sigma was greater than 4. Based on the results obtained, we drew conclusions on the choice of control material and the frequency of the internal laboratory quality control. The introduction of sigmametry in the daily activities of clinic laboratory will improve the quality of the determination of platelet, which requires further observation.

Key words: sigmametry; internal laboratory quality control; hematology parameters; blood.

For citation: Petrova O.V., Shabanova G.R., Murygina O.I., Panova E.V., Nikulina D.M. Improving the quality of hematological studies using sigmametry. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (10): 599-602 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-599-602>

For correspondence: Petrova O.V., Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory, e-mail: students_asma@mail.ru

Information about authors

Петрова О.В. <http://orcid.org/0000-0003-3544-2266>

Шабанова Г.Р. <http://orcid.org/0000-0003-2233-7002>

Мурыгина О.И. <http://orcid.org/0000-0002-0359-8664>

Панова Е.В. <http://orcid.org/0000-0001-5357-7311>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 07.06.2019

Accepted 17.08.2019

Результаты гематологических исследований имеют важное значение для диагностики заболеваний, оценки тяжести патологических процессов, оценки эффективности проводимого лечения и прогноза исхода заболевания [1-7].

В связи с чем качеством лабораторных исследований, в том числе и гематологическим исследованиям, предъявляются особые требования: результаты лабораторных исследований должны быть точны и надежны.

Контроль качества лабораторных исследований осуществляется на всех этапах лабораторного анализа. На аналитическом этапе контроль качества осуществляется с помощью внутрилабораторного контроля качества (ВЛКК) и участием клинических лабораторий в программах внешней оценки качества (ВОК) лабораторных исследований [1].

Однако результаты ВЛКК и ВОК не всегда дают объективную информацию о наличии ошибок (погрешностей) в работе клинических лабораторий.

В зарубежной литературе имеются данные о возможности использования концепции 6 сигм для оценки качества лабораторных исследований. Концепция 6 сигм направлена на улучшение качества лабораторных исследований. Данная концепция была разработана в 80-х годах прошлого века компанией «Motorola». В основу были положены статистические методы расчёта значения сигмы на основании биологической вариации [8-10].

В отечественной литературе имеются единичные данные по использованию концепции 6 сигм для оценки качества лабораторных исследований.

Цель – оценить качество выполнения гематологических исследований с помощью расчета.

Материал и методы. Исследование проводили в ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии» (г. Астрахань).

Проведен ретроспективный анализ данных третьей стадии ВЛКК за 2017 год. Ежедневно контролировались следующие гематологические показатели: лейкоциты (White blood cells (WBC)), тромбоциты (Platelet (PLT)), эритроциты (Red blood cells (RBC)), гемоглобин (Hemoglobin (Hb)).

Для проведения ВЛКК использовали сертифицированный аттестованный 3-х уровневый (Level 1 (Low), Level 2 (Norma), Level 3 (High)) контрольный материал «CBC-XE Hematology control» (фирмы «Research and Diagnostics Systems», Inc., USA).

Исследование гематологических показателей крови проводили на автоматических гематологических анализаторах «Sysmex XT- 2000i» и «Sysmex XT- 1800i» («Sysmex Corporation», Япония).

Основные параметры, используемые для расчета:

Коэффициент вариации (CV%) – отражает внутрилабораторную прецизионность, вычисляли по формуле: $CV = (SD / X \times 100\%)$, где SD – стандартное отклонение, X – среднее значение измерений величины [1].

Систематическая погрешность (Bias) – это разность между математически ожидаемым результатом измерений и истинным значением. $Bias = (X_{ср.} - ИЗ / ИЗ) \times 100\%$, где $X_{ср.}$ – среднее значение, ИЗ – значение группы сравнения [1].

Основным источником информации о систематической погрешности являются данные внешней оценки качества лабораторных исследований. В нашем исследовании мы использовали данные представленные в External Quality Assessment Schemes (EQAS).

Общая допустимая аналитическая ошибка $TE_{макс}$ – «интервал значений аналита в распределении результатов его измерения (90%, 95% или 99%-вероятность), установленный при использовании результатов определенного метода измерения, включающий систематические и случайные погрешности». Выражается в процентах и вычисляется по формуле: $TE(\%) = B + Z \times CV$, где B – смещение (систематическая погрешность); CV – долгосрочный коэффициент вариации; Z – квантиль нормального распределения для определенного уровня значимости, используется значение $Z = 1,96$, соответствующее двустороннему распределению с вероятностью 95% [12].

Различают: общую ошибку (TE) определения аналита на конкретной аналитической системе; максимально допустимую аналитическую ошибку ($TE_{макс}$ или TE_a), являющуюся интегральной характеристикой требований к качеству, установленных в данной лаборатории для каждого лабораторного показателя.

Количество сигм (Sigma-metric) – универсальная количественная характеристика качества аналитической системы вычисляется по формуле: $Sigma (SM) = (TE_{макс} - Bias) / CV$, где $TE_{макс}$ – общая допустимая ошибка; Bias – систематическая погрешность; CV – коэффициент вариации [12].

Результаты. Значения $TE_{макс}$, B, CV контрольных измерений гематологических показателей крови представлены в табл. 1 и 2.

Значения B и CV являются показателями качества лабораторных исследований, используются для оценки правильности и воспроизводимости лабораторных исследований на всех стадиях ВЛКК.

Значения B и CV при исследовании гематологических показателей на автоматических гематологических анализаторах, соответствовали значениям, указанным в ГОСТе [1], и указывали на правильность и воспроизводимость гематологических исследований.

При анализе полученных данных обнаружены разные значения CV в исследуемых показателях (см. табл.1,2).

При использовании контрольного материала 1 уровня (Level 1) максимальные значения SM отмечаются при исследовании количества WBC (6,6; 8,4) и Hb (6,3; 7,1) (табл. 3).

При использовании 2 уровня контрольного материала (Level 2) максимальные значения SM выявлены при ис-

Таблица 1

Значения TEmax, B, CV контрольных измерений на Sysmex XT- 2000i

Исследуемый показатель	Уровень контрольного материала								
	Level 1			Level 2			Level 3		
	TEmax	B	CV	TEmax	B	CV	TEmax	B	CV
WBC	19,4	1,7	2,7	19,4	1,7	2,1	19,4	1,7	1,3
RBC	5,6	1,5	0,7	5,6	1,5	0,3	5,6	1,5	0,6
PLT	16,5	6,1	3,3	16,5	6,1	2,8	16,5	6,1	2,7
Hb	5,2	0,2	0,8	5,2	0,2	0,5	5,2	0,2	0,5

Таблица 2

Значения TE max, B, CV контрольных измерений на Sysmex XT- 1800i

Исследуемый показатель	Уровень контрольного материала								
	Level 1			Level 2			Level 3		
	TEmax	B	CV	TEmax	B	CV	TEmax	B	CV
WBC	19,4	1,7	2,1	19,4	1,7	0,9	19,4	1,7	1,6
RBC	5,6	1,5	0,6	5,6	1,5	0,4	5,6	1,5	0,7
PLT	16,5	6,1	2,6	16,5	6,1	2,1	16,5	6,1	1,6
Hb	5,2	0,2	0,7	5,2	0,2	0,7	5,2	0,2	0,3

Таблица 3

Значения SM контрольных измерений на Sysmex XT-2000i Sysmex XT- 1800i

Показатель	Контрольный материал					
	Level 1		Level 2		Level 3	
	SM		SM		SM	
	Sysmex XT-2000i	Sysmex XT-1800i	Sysmex XT-2000i	Sysmex XT-1800i	Sysmex XT-2000i	Sysmex XT-1800i
WBC	6,6	8,4	8,4	20,3	13,3	11,4
RBC	6,2	6,4	12,1	10,0	7,5	5,7
PLT	3,1	4,1	3,7	5,1	3,9	6,5
Hb	6,3	7,1	9,3	7,4	10,6	15,6

следовании количества WBC (8,4; 20,3), RBC (12,1;10,0) и Hb (9,3;7,4).

При использовании 3 уровня контрольного материала (Level 3) максимальные значения SM рассчитаны при исследовании количества WBC (13,3; 11,4) и Hb (10,6;15,6).

Значения SM при определении количества PLT на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex XT-2000i» были самые минимальные и меньше 4 SM (см.табл.3). В тоже время при исследовании этого показателя на автоматическом гематологическом анализаторе «Sysmex XT-1800i» значения SM были больше 4 во всех уровнях контрольного материала.

Из представленных данных видно, что значение SM зависит от CV (см. табл.1,2,3).

Обсуждение. Сигмометрия позволяет рассчитать значения Sigma (SM) на основании данных о биологической вариации и оценить качество аналитической системы. Аналитическая система – понятие собирательное, которое включает в себя прибор, реактивы, тест-системы, наборы реагентов. SM – количественная характеристика аналитической системы [8-10].

Считается, что значения SM меньше 1 указывает на неприемлемое качество лабораторных исследований, от 1 до 3 – технологический процесс нестабилен, от 3 до 4 – необходимо менять методику определения лабораторного показателя, от 4 до 5 – качество лабораторных

исследований удовлетворительное [11-13].

В тоже время зарубежные авторы, использующие концепцию 6 сигм для оценки качества биохимических исследований показали, что значения сигмы равное 4 указывает на хорошее качество лабораторных исследований. И авторы считают, что клинические лаборатории должны стремиться к значению сигмы равному 4 [14-17].

Результаты проведенного нами статистического анализа выявили следующие особенности:

Значения SM при исследовании эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина во всех уровнях контрольного материала были больше 4, что указывало на хорошее качество проведения данных исследований на автоматических гематологических анализаторах.

Значения SM при исследовании тромбоцитов были в диапазоне от 3 до 4, несмотря на то, что в своей работе мы используем три уровня контрольного материала и значения CV были в допустимых ГОСТу значениях для данного показателя.

В литературе показана возможность использования сигмометрии для интерпретации результатов внутрилабораторного контроля качества, для организации мероприятий, направленных на повышение качества исследований на основании значений SM.

При значениях SM меньше 3 авторы [12,15,17] предлагают улучшить методику проведения исследования за счет использования контрольного материала 3 уровней,

проводить контроль качества два раза в день с правилом Westgard $1_{3S}/2_{2S}/R_{4S}/4_{1S}$.

При значениях SM от 3 до 4 для повышения качества проведения исследований необходимо использовать контрольный материал 2 уровней, контроль необходимо проводить два раза в день с правилом Westgard $1_{3S}/2_{2S}/R_{4S}/4_{1S}$ [12,15,17].

При значениях SM больше 4 для проведения внутрилабораторного контроля качества необходимо использовать контрольный материал 2 уровней, контроль проводить один раз в день [12,15,17].

При значениях SM от 4 до 6 – правилами Westgard пренебрегают, кроме тех случаев, когда одно значение ВЛКК выходит за $1_{2.5S}$ [12,15,17].

При значениях SM больше 6 – правилами Westgard пренебрегают, кроме тех случаев, когда одно значение ВЛКК выходит за 1_{3S} [12,15,17].

Таким образом, с помощью определения значения сигмы для каждого показателя периферической крови мы оценили качество гематологических исследований. Качество гематологических исследований – хорошее. Для улучшения качества исследования количества тромбоцитов в периферической крови необходимо проводить ВЛКК 2 раза в день, что в дальнейшем планируем сделать.

Надеемся, что внедрение концепции 6 сигм в повседневную деятельность клинической лаборатории позволит улучшить качество определения тромбоцитов, что требует дальнейших наблюдений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 8-17 см. REFERENCES)

1. Мошкин А.В., Долгов В.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. М.: «Медиздат»; 2004.
2. Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г. Маркеры системного воспалительного ответа у больных, оперированных по поводу осложненных инфекционного эндокардита. *Клиническая медицина*. 2015; 93 (7): 26-30.
3. Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г. Значение незрелых гранулоцитов в диагностике инфекционно-воспалительных процессов у кардиохирургических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (5): 25-40.
4. Петрова О.В., Шабанова Г.Р., Егорова Т.Г. Референтные интервалы количества лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формулы у взрослого населения при применении автоматического гематологического анализатора Sysmex XT 2000i. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61 (3): 153-6.
5. Касьянова Т.Р., Левитан Б.Н., Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М., Титаренко Ю.Б. Этиологические особенности изменения фетального гемоглобина у больных хроническим гепатитом и циррозом печени. *Астраханский медицинский журнал*. 2012; 7 (4): 138-40.
6. Кчибеков Э.А., Никулина Д.М., Зурнаджянц В.А. Комплексная программа прогнозирования осложнений острых воспалительных заболеваний органов брюшной полости. *Астраханский медицинский журнал*. 2011; 6 (2): 182-4.
7. Степанов Б.Г., Никулина Д.М., Багдасарян И.О. Влияние лабо-

раторного обследования и иммунореабилитация детей с лимфоаденопатией. *International Journal on Immunorehabilitation*. 1996; 2: 94.

REFERENCES

1. Moshkin A.V., Dolgov V.V. Quality assurance in clinical laboratory diagnostics [Obespechenie kachestva v klinicheskoy laboratornoy diagnostike]. Moscow: «Medizdat»; 2004. (in Russian)
2. Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G. Markers of systemic inflammatory response in patients operated for complications of infectious endocarditis. *Klinicheskaya meditsina*. 2015; 93 (7): 26-30. (in Russian)
3. Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G. The significance of immature granulocytes in diagnostic of infectious inflammatory processes in cardiosurgery patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (5): 25-40. (in Russian)
4. Petrova O.V., Shabanova G.R., Egorova T.G. Reference intervals for the white blood cell and differential white blood cell count in the adult population the at the use of the automatic hematology analyzer Sysmex XT 2000i. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2016; 61 (3): 153-6. (in Russian)
5. Kas'yanova T.R., Levitan B.N., Kriventsev Yu.A., Nikulina D.M., Titarenko Yu.B. The etiologic peculiarities of fetal hemoglobin in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Astrahanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 7 (4): 138-40. (in Russian)
6. Khibekov E.A., Nikulina D.M., Zurnadzh'yants V.A. The complex program of forecasting of complications of sharp inflammatory diseases of organs of a belly cavity. *Astrahanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 6 (2):182-4. (in Russian)
7. Stepanov B.G., Nikulina D.M., Bagdasaryan I.O. Influence, laboratory examination and immunorehabilitation of children with lymphadenopathy. *International Journal on Immunorehabilitation*. 1996; 2: 94 (in Russian)
8. Forsman R.W. Why is the laboratory an afterthought for managed care organizations? *Clin chem*. 1996;42: 813-6.
9. Shah S., Saini R., Singh S.B., Aggarwal O., Goel A.K. Six Sigma Metrics and Quality Control in Clinical Laboratory. *Int. J. Med. Res. Rev*. 2014;2:140-9.
10. Nanda S.K., Ray L. Quantitative application of sigma metrics in medical biochemistry. *J. Clin. Diagn. Res*. 2013;7:2689-91.
11. Nevalainen D, Berte L, Kraft C, Leigh E, Picaso L, Morgan T. Evaluating laboratory performance on quality indicators with the six sigma scale. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2000;124: 516-9.
12. Westgard JO. Six sigma quality design and control: Desirable precision and requisite QC for laboratory measurement processes. Madison, Wis.: Westgard QC; 2001.
13. Hens K, Berth M, Armbruster D, Westgard S. Sigma metrics used to assess analytical quality of clinical chemistry assays: importance of the allowable total error (TEa) target. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2014;52: 973-80.
14. U.S. Department of health and human services. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988. Final rules and notice. 42 CFR Part 493. Federal Register 1992;57:7188-7288.
15. Singh B, Goswami B, Gupta VK, Chawla R, Mallika V. Application of sigma metrics for the assessment of quality assurance in clinical biochemistry laboratory in India: a pilot study. *Ind. J. Clin. Biochem*. 2011; 26:131-5.
16. Harry M, Schroeder R, eds. Six sigma: the breakthrough management strategy revolutionizing the world's top corporations. Bantam Doubleday Dell Audio; 2000.
17. Adiga US, Preethika A, Swathi K. Sigma metrics in clinical chemistry laboratory – A guide to quality control. *Al. Ameen J. Med. Sci*. 2015;8:281-7.

Поступила 07.06.19

Принята к печати 17.08.19

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Гонтарь И.П.¹, Емельянова О.И.¹, Русанова О.А.¹, Зборовская И.А.¹, Емельянов Н.И.²

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ МОДИФИКАЦИИ ЛИПИДНЫХ АНТИГЕНОВ ДЛЯ СИНТЕЗА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ В РЕВМАТОЛОГИИ

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», 400138, Волгоград, Россия;

² Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, Россия

*Цель исследования – повышение сорбционной емкости диагностикумов на основе кардиолипинового антигена при антифосфолипидном синдроме у больных системной красной волчанкой методом эмульсионной полимеризации. На основе интеграции антигенных нанообъектов, нами были созданы и апробированы иммобилизованные магнитоуправляемые антигенные наносистемы (АНС). Они представляют собой полиакриламидные гранулы с включенным в их структуру биополимером. Для получения стабильных иммобилизованных биопрепаратов многократного применения с заданными свойствами (формой, диаметром частиц, размером пор, плотностью), в качестве диагностикумов, мы применяли в качестве носителя полиакриламидный гель. Этот способ позволил существенно увеличить сорбционную емкость, сохранить антиген в максимально нативном состоянии и открыл возможности контролируемого модифицирования и синтеза нанообъектов. По описанной выше методике была произведена сорбция антикардиолипиновых антител из плазмы крови больных СКВ с клиническими проявлениями антифосфолипидного синдрома. В качестве контроля использовались сыворотки крови 10 практически здоровых лиц. Уровень антител к кардиолипину (АТ к КЛ) определяли до и после сорбции непрямым твердофазным иммуноферментным методом с использованием иммобилизованных гранулированных препаратов. Было отмечено достоверное влияние на степень повышения антикардиолипиновых антител (АКА) наличия основных клинических критериев АФС (акушерская патология, венозный тромбоз), которые и были использованы в качестве диагностических критериев АФС у больных СКВ. У всех больных СКВ с признаками АФС уровень антител к кардиолипину был достоверно выше по сравнению с группой больных СКВ без признаков АФС и составил в среднем $(0,365 \pm 0,026$ и $0,075 \pm 0,003$, соответствии $p < 0,001$). Полученные нами АНС на основе иммобилизованного кардиолипина в условиях *in vitro* эффективно удаляли АТ к КЛ из цельной крови больных СКВ с клиническими проявлениями АФС до уровня здоровых лиц (до сорбции АТ к КЛ- $0,328 \pm 0,0289$; после сорбции- $0,059 \pm 0,0170$, $p < 0,001$; сорбционная емкость- $8,00 \pm 0,390$ мг/мл). Метод эмульсионной полимеризации с учетом гидрофобных и гидрофильных свойств молекул липидов позволяет контролируемым образом синтезировать и модифицировать биомолекулы с последующим получением новых диагностических и лечебных препаратов.*

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром; кардиолипин; магнитосорбент.

Для цитирования: Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Русанова О.А., Зборовская И.А., Емельянов Н.И. Технологические приемы модификации липидных антигенов для синтеза диагностических и лечебных препаратов в ревматологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 603-606. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-603-606>

Gontar I.P.¹, Emelyanova O.I.¹, Rusanova O.A.¹, Zborovskaya I.A.¹, Emelyanov N.I.²

TECHNIQUES OF MODIFYING LIPID ANTIGENS FOR SYNTHESIS OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC PREPARATIONS IN RHEUMATOLOGY

¹FSBI «RICER named after A.B. Zborovskiy» Russia;

²FSBEI HE VolgSMU MOH Russia

The objective of the study is to enhance sorption capacity of diagnostic agents by using cardiolipin antigens for antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). A technique of emulsion polymerization was used. Having integrated antigen nanoobjects we developed immobilized magnetocontrollable antigen nanosystems and put them to an evaluation test. The nanosystems are polyacrylamide granules with a built in antigen. To obtain stable immobilized multi-use biopharmaceuticals with targeted properties (shape, particle diameter, pore size, density) we used a modified version of emulsion polymerization method using polyacrylamide carrier gel. This method permitted a greater sorptive capacity, preserving the antigen in maximum native state, and opened up the possibility of controllable modification of nanoobjects. Cardiolipin was used as the antigen in question. Following the method described above we performed sorption of anticardiolipin antibodies from blood plasma of SLE patients who showed clinical presentations of antiphospholipid syndrome. All SLE patients with signs of antiphospholipid syndrome showed reliably higher levels of cardiolipin antibodies compared with SLE patients without antiphospholipid syndrome signs; the antibody level was 0.365 ± 0.026 and 0.075 ± 0.003 on average, correspondingly ($p < 0.001$). Blood serum from 10 apparently healthy individuals served as control. The level of cardiolipin antibodies was determined before and after sorption by indirect solid phase immunoenzyme method. In the eluate we estimated total protein by Lowry method. In vitro testing showed that the obtained antigen nanosystems based on immobilized cardiolipin could effectively remove cardiolipin antibodies from whole blood of SLE patients with clinical presentations of APS to achieve the values of healthy individuals (before sorption cardiolipin antibodies $0.328 \pm$

0.0289; after sorption 0.059 ± 0.0170 ; $p < 0,001$; sorption capacity 8.00 ± 0.390 mg/ml). The method of emulsion polymerization with consideration to hydrophobic and hydrophilic properties of lipid molecules permits obtaining and modifying biomolecules with certain properties, in a controlled fashion.

Key words: antiphospholipid syndrome; cardiolipin; magnetocontrolable sorbent.

For citation: Gontar I.P., Emelyanova O.I., Rusanova O.A., Zborovskay I.A., Emelyanov N.I. Techniques of modifying lipid antigens for synthesis of diagnostic and therapeutic preparations in rheumatology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (10): 603-606. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-603-606>

For correspondence: Emelyanova Oiga Ivanovna, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher); e-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Information about authors:

Gontar I.P., <http://orcid.org/0000-0001-9920-1360>

Emelyanova O.I. <http://orcid.org/0000-0003-3951-8985>

Rusanova O.A. <http://orcid.org/0000-0002-7080-2442>

Zborovskay I.A. <http://orcid.org/0000-0002-8824-0409>

Emelyanov N.I. <https://orcid.org/0000-0001-5940-9140>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.01.2019
Accepted 22.04.2019

Введение. Современный этап развития науки характеризуется высоким темпом роста нанотехнологий с использованием веществ и материалов размером от нескольких десятков до сотен нанометров. Правительством Российской Федерации были утверждены требования к продуктам nanoиндустрии (распоряжение от 7 июля 2011 г. № 1192-р). Одной из таких сфер применения нанотехнологической продукции и является создание медицинских препаратов, предназначенных для диагностики и лечения ревматических заболеваний.

Ревматические заболевания представляют собой хронический вялотекущий процесс, для которых характерно большое разнообразие форм и вариабельность темпов прогрессирования. По социально-экономическим последствиям системная красная волчанка занимает первое место в группе системных поражений соединительной ткани ввиду ее широкого распространения среди населения разных стран, преимущественного поражения лиц трудоспособного возраста и с высокой инвалидизацией. Наиболее частой причиной летальности и развития стойкой нетрудоспособности при данной патологии являются Lupus-нефрит и Lupus-ЦНС, сопровождающиеся множественными поражениями внутренних органов. Антитела к нативной ДНК и фосфолипидным антигенам обуславливают развитие соответственно волчаночного гломерулонефрита и антифосфолипидного синдрома (АФС), включающего рецидивирующие артериальные и венозные тромбозы, эмболии, поражение нервной системы, акушерскую патологию. Данные проявления часто выходят на ведущее место в клинической картине заболевания, определяя его тяжесть и неблагоприятный прогноз. Так, антитела к кардиолипину обуславливают развитие субтипа системной волчанки с признаками АФС, при котором часто невозможно подавить активность заболевания традиционными средствами базисной терапии, в связи с чем и возникает необходимость изучения этих патогенетических иммунологических процессов. Обнаружение в сыворотке крови различных аутоантител может иметь большое диагностическое значение. Кроме того, такие антитела обладают значительным патогенным действием, их уда-

ление из организма оказывает благоприятное лечебное воздействие на течение основного заболевания [1].

На основе интеграции антигенных нанообъектов, нами были созданы и апробированы иммобилизованные магнитоуправляемые антигенные наносистемы (АНС). Они представляют собой полиакриламидные гранулы с включенным в их структуру антигеном.

Нанообъектами мы называем химические группы, которые формируют активные центры ферментов, антигенные детерминанты, клеточные рецепторы и т.д. Наиболее интересным в этом отношении нам представляется, как модель, антигенный препарат – кардиолипин, который относится к фосфолипидам.

Данные рентгеноструктурного анализа показывают, что молекулы фосфолипидов имеют форму сплюснутого с боков цилиндра, а по длине как бы делятся на две неравные части, небольшую «головку», состоящую из полярных групп, и длинный «хвост», образованный углеводородными цепями жирных кислот, входящих в состав фосфолипида. Именно такое строение молекулы приводит к тому, что в водных растворах фосфолипидные молекулы самособираются в бислойную мембрану. В мембране «липидные хвосты» (гидрофобные участки) упрятаны внутрь, а снаружи в контакте с водным окружением оказываются полярные «головы» (гидрофильные участки) этих молекул.

Основные фосфолипиды мембран – фосфотидилсерин, фосфотидилинозитол, фосфотидилэтаноламин, фосфотидилхолин, кардиолипин.

Кардиолипин – фосфолипид, структурный компонент внутренней мембраны клетки и митохондрий, построенный на основе глицерола и остатков фосфотидной кислоты. Кардиолипин может обладать антигенными свойствами, они заключены в гидрофильной части молекулы, а не в гидрофобной его части.

Размер молекулы кардиолипина равен $0,4414$ нм³, примерно такой же размер и выше перечисленных фосфолипидов, что соответствует определению нанообъектов как частиц менее 100 нм.

Для получения стабильных иммобилизованных биопрепаратов многократного применения с заданными

Таблица 1

Потери кардиолипина при иммобилизации

Концентрация кардиолипина в растворе, мг	Иммобилизованный кардиолипин, мг M±m	Потери кардиолипина, мг M±m	Эффективность иммобилизации, %
28	23,6±0,63	4,4±0,67	84,2%
24	20,6±0,83	3,4±0,78	85,8%
20	17,4±0,68	2,6±0,86	87,1%
16	13,6±0,69	2,4±0,83	85%
12	10,2±0,67	1,8±0,86	85%

Таблица 2

Контроль специфичности сорбента

Время, мин	Общий белок, мг/мл	IgG, мг/мл	IgA, мг/мл	IgM, мг/мл
Исходный фон	73	10,5	1,3	1,25
15	75	11,8	1,2	1,25
30	72	9,90	1,36	1,25
45	71	10,9	1,28	1,04
60	75	11,9	1,27	1,02

свойствами (формой, диаметром частиц, размером пор, плотностью), мы использовали метод эмульсионной полимеризации в нашей модификации с использованием полиакриламидного геля в качестве носителя. Этот метод позволил существенно увеличить сорбционную емкость, сохранить антиген в максимально нативном состоянии и открыл возможности контролируемого модифицирования нанообъектов [6].

Цель исследования - повышение сорбционной емкости диагностикумов на основе кардиолипинового антигена при АФС у больных системной красной волчанкой методом эмульсионной полимеризации.

Материал и методы. Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинской декларации Международной медицинской ассоциации, что подтверждено результатами экспертизы Регионального этического комитета. Исследования осуществляли при наличии информированного согласия пациентов. Диагноз АФС был подтвержден с помощью критериев Hughes и Harris [8], верификация диагноза красная волчанка выполнялась с помощью критериев ACR [9].

Кардиолипиновый иммуносорбент получали путем связывания полиакриламидного носителя с антигеном, смешанным с раствором полиметилметакрилата в хлороформе в соотношении 1:1 и выделения целевого продукта, в качестве носителя использовали гранулированный полиакриламидный гель с концентрацией поперечносшивающего агента 25% и с включением в него 10%-ным оксидом железа [3,4] (табл. 1).

Используя различия гидрофобных и гидрофильных частей молекулы кардиолипина и наш метод иммобилизации с использованием полиакриламидного геля в качестве носителя, можно получать стабильные, пространственно-ориентированные, гранулированные с магнитными свойствами нанообъекты, с последующим применением их в диагностике и лечении больных ревматическими заболеваниями [2,5-7].

Результаты и обсуждение. Нами был проведен сравнительный анализ классического ИФА и ИФА с ис-

пользованием иммобилизованных гранулированных препаратов, полученных нашим способом. Использование иммобилизованного гранулированного кардиолипина, в предложенном нами варианте ИФА, и раствора кардиолипина в традиционном твердофазном ИФА для фосфолипидов показало, что максимальное значение экстинкции с одинаковым рабочим разведением пула сывороток было 0,280±0,033 мг в классическом варианте и 0,342±0,027 мг в нашей модификации. Минимальные положительные значения экстинкции в традиционном методе соответствовали разведению пула сывороток 1,800, а с использованием иммобилизованных препаратов – 1,6400. Применение иммобилизованной формы кардиолипина в предлагаемом методе позволило увеличить чувствительность ИФА в восемь раз, по сравнению с традиционным методом на полистероловых планшетах.

Было выявлено, что у всех больных СКВ с признаками АФС уровень антител к кардиолипину был достоверно выше по сравнению с группой больных СКВ без признаков АФС и составил в среднем (0,365±0,026 и 0,075±0,003, $p<0,001$) при использовании нашей модификации.

Особый интерес представляют данные о зависимости уровня антител к кардиолипину от наличия поражения центральной нервной системы. У больных с синдромом Снеддона уровень антикардиолипиновых антител был достоверно выше, чем у больных без данного синдрома (0,489±0,094 и 0,171±0,049, $p<0,001$).

По описанной выше методике была произведена и сорбция антикардиолипиновых антител из плазмы крови больных СКВ с клиническими проявлениями антифосфолипидного синдрома. В качестве контроля использовались сыворотки крови 10 практически здоровых лиц. Уровень антител к кардиолипину определяли до и после сорбции непрямым твердофазным иммуноферментным методом. В элюате измеряли концентрацию общего белка по Лоури. Полученные нами АНС на основе иммобилизованного кардиолипина в условиях *in vitro* эффективно удаляли АТ к КЛ из цельной крови больных

СКВ с клиническими проявлениями АФС до уровня здоровых лиц (до сорбции АТ к КЛ-0,328±0,028; после сорбции-0,059±0,017, $p < 0,001$; сорбционная емкость-8,00±0,390 мг/мл).

Контроль специфичности сорбента определяли путем смешивания 1 г гранул с 4 мл сыворотки крови донора на магнитной мешалке с интервалом 15 мин, в ней определяли концентрацию белка по Лоури, иммуноглобулинов по Манчини классов G, A, M. Результаты приведены в табл. 2.

Заключение. Метод эмульсионной полимеризации с учетом гидрофобных и гидрофильных свойств молекул липидов позволяет контролируемым образом получать и модифицировать биомолекулы с характерными свойствами. Этот метод дает возможность придать химическим группам нанообъектов, входящим в активные центры ферментов, антигенных детерминант, клеточных рецепторов и токсинов, принципиально новые качества и осуществлять их интеграцию в полноценно функционирующие системы большего масштаба, коими и являются иммобилизованные гранулированные антигенные препараты (ИГАП). Поэтому такие биологические структуры можно считать полноценными нанообъектами и использовать их и в диагностике, и в лечении ревматологических больных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров А.В., Шилова Л.Н., Емельянов Н.Н., Алехина И.Ю., Парамонова О.В., Новикова О.В., Макарова Т.С., Емельянов Н.И., Курбанова Р.Д., Емельянова О.И. Иммунопатогенетические аспекты современной лабораторной диагностики системной красной волчанки, системной склеродермии и ювенильного ревматоидного артрита. *Международный журнал по иммунореабилитации*. 2010; 12(2): 150.
2. Зборовский А.Б., Гонтарь И.П., Александров А.В., Алехина И.Ю., Трофименко А.С. Возможности исследования иммобилизованных наносистем в ревматологии. *Доктор Ру* 2009; (3): 53-4.
3. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В. Способ получения иммобилизованного кардиолипинового антигена для определения специфических антител. Патент на изобретение РФ № 1649807; 1993.
4. Гонтарь И.П., Зборовский А.Б., Левкин С.В., Сычева Г.Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул. Патент на изобретение РФ № 1582657; 1993.
5. Гонтарь И.П., Емельянова О.И., Парамонова О.В., Маслакова Л.А., Трофименко А.С. Магнитные сорбенты в экстракорпоральной терапии у больных системной красной волчанкой с антифосфолипидным синдромом. *Патогенез*. 2016; 14(3): 42-3.
6. Александров А.В., Гонтарь И.П., Алехина И.Ю., Зборовский А.Б. Перспективы применения антигенных наносистем в диагностике и лечении воспалительных ревматических заболеваний. *Терапевтический архив* 2009; (12): 48-4.
7. Зборовский А.Б., Гонтарь И.П., Александров А.В. Иммобилизованные нанообъектные системы на основе кардиолипина в диагностике и лечении воспалительных ревматических заболеваний. Материалы III национального конгресса терапевтов «Новый курс консолидации усилий по охране здоровья нации» Москва 5-7 ноября 2008. М.: «Бионика» 2008; 94-1.
8. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E. The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheum.* 1986; 13: 486-9.
9. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1728.

REFERENCES

1. Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Emel'janov N.N., Alehina I.Ju., Paramonova O.V., Novikova O.V., Makarova T.S., Emel'janov N.I., Kurbanova R.D., Emel'janova O.I. Immunopathogenetic aspects of modern laboratory diagnosis of systemic lupus erythematosus, systemic scleroderma and juvenile rheumatoid arthritis. *Mezhdunarodnyi zhurnal po immunoreabilitatsii*. 2010; 12 (2): 150. (in Russian)
2. Zborovskij A.B., Gontar' I.P., Aleksandrov A.V., Alehina I.Ju., Trofimenko A.S. Opportunities for the study of immobilized nanosystems in rheumatology. *Doctor Ru*. 2009; (3): 53-4. (in Russian)
3. Gontar' I.P., Zborovskij A.B., Levkin S.V. The method of obtaining immobilized cardiolipin antigen for the determination of specific antibodies. Patent RF No 1649807; 1993. (in Russian)
4. Gontar' I.P., Zborovskij A.B., Levkin S.V., Sycheva G.F. The method of obtaining magnetic polyacrylamide granules. Patent RF No. 1582657; 1993. (in Russian)
5. Gontar' I.P., Emel'janova O.I., Paramonova O.V., Maslakova L.A., Trofimenko A.S. Magnetic sorbents in extracorporeal therapy in patients with systemic lupus erythematosus with antiphospholipid syndrome. *Patogenez*. 2016; 14 (3): 42-3. (in Russian)
6. Aleksandrov A.V., Gontar' I.P., Alehina I.Ju., Zborovskij A.B. Prospects for the use of antigen nanosystems in the diagnosis and treatment of inflammatory rheumatic diseases. *Tерапевтический архив*. 2009; (12): 48-4. (in Russian)
7. Zborovskij A.B., Gontar' I.P., Aleksandrov A.V. Immobilized nano-object systems based on cardiolipin in the diagnosis and treatment of inflammatory rheumatic diseases. Proceedings of the III National Congress of Therapists "New Course in the Consolidation of Efforts to Protect the Health of the Nation" Moscow November 5-7, 2008. Moscow: Bionika; 2008; 94-1. (in Russian)
8. Hughes G.R.V., Harris E.N., Gharavi A.E. The Anticardiolipin Syndrome. *J. Rheum.* 1986; 13: 486-9.
9. Hochberg M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1728.

Поступила 19.01.19

Принята к печати 22.04.19

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Малов С.И.^{1,2}, Малов И.В.¹, Дворниченко В.В.^{1,2}, Расулов Р.И.², Кувшинов А.Г.¹, Марш П.Н.³, Декан Т.³,
Мацек-Жилкова З.³, Ющук Н.Д.⁴.

ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНАЦИИ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА И ОСТЕОПОНТИНА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ГЕПАТИТОМ С

¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 664003, Иркутск, Россия;

²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО
«Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 664049,
Иркутск, Россия;

³Институт передовых биологических наук Университета Гренобль-Альпы, 38700, Ля Тронш, Франция;

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Минздрава
РФ, 127473, Москва, Россия

Цирроз печени в исходе гепатита С является одной из основных причин гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) в мире. Ранняя диагностика и своевременное лечение этого заболевания имеют важное значение для снижения смертности и увеличения продолжительности жизни больных. Для оценки риска развития ГЦК наиболее широко используется определение альфа-фетопротейна (АФП) в крови, но низкая чувствительность ограничивает его диагностическое значение. В 2012 г. предложен новый биомаркер ГЦК – остеопонтин (ОПН), который представляет собой секретируемый фосфопротеин, обладающий высокой аффинностью к интегринам. Уровень ОПН начинает повышаться на ранних стадиях малигнизации, до периода выявления ГЦК методами визуализации, и обладает значительно лучшей чувствительностью, чем АФП. Цель данного исследования - оценить диагностическую эффективность комбинированного определения альфа-фетопротейна и остеопонтин в проспективном наблюдении за больными хроническим гепатитом С в продвинутой фазе фиброза печени. Наблюдение за 588 больными гепатитом С осуществлялось с февраля 2013 по февраль 2019 гг. ГЦК было выявлено у 55 из них (2,6% в год). Комбинация 2-х биомаркеров показала лучшую диагностическую эффективность, чем альфа-фетопротейн и остеопонтин в отдельности: AUC 0,85 (95% CI 0,80-0,90) против AUC 0,63 (95% CI 0,57-0,70) и AUC 0,82 (95% CI 0,77-0,88) соответственно. Данная комбинация показала чувствительность 85,5% и позволяла диагностировать ГЦК с прогностическим уровнем положительного результата 72,3% в среднем на 19,4±0,8 нед раньше подтверждения диагноза инструментальными методами визуализации (УЗИ, МРТ, КТ). В комбинированном варианте наибольший вклад в повышение диагностической эффективности (AUC) вносил ОПН. На ранней и очень ранней стадии развития ГЦК изолированное повышение АФП установлено только у 5,4% больных. Комбинированное использование альфа-фетопротейна и остеопонтин в качестве диагностической панели может быть рекомендовано для мониторинга больных циррозом печени в исходе гепатита С и прогнозирования ГЦК на ранней стадии развития.

Ключевые слова: гепатоцеллюлярная карцинома; прогнозирование; биомаркеры; альфа-фетопротейн; остеопонтин; гепатит С.

Для цитирования: Малов С.И., Малов И.В., Дворниченко В.В., Расулов Р.И., Кувшинов А.Г., Марш П.Н., Декан Т., Мацек-Жилкова З., Ющук Н.Д. Применение комбинации альфа-фетопротейна и остеопонтин для ранней диагностики гепатоцеллюлярной карциномы, ассоциированной с гепатитом С. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 607-612. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-607-612>

Malov S.I.^{1,2}, Malov I.V.¹, Dvornichenko V.V.^{1,2}, Rasulov R.I.², Kuvshinov A.G.¹, Marche P.N.³, Decaens T.³, Macek-Jilkova Z.³, Yushchuk N.D.⁴.

APPLICATION OF ALPHA-FETOPROTEIN AND OSTEOPONTIN COMBINATION FOR EARLY DIAGNOSIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA ASSOCIATED WITH HEPATITIS C

¹Irkutsk State Medical University, 664003, Irkutsk, Russia;

²Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, 664049, Irkutsk, Russia;

³Institute for Advanced Biosciences, Research Center Inserm U1209, CNRS 5309, Univ. Grenoble-Alpes, 38700 La Tronche, France;

⁴Moscow State University of Medicine and Dentistry Named After A.I. Evdokimov, 127473, Moscow, Russia

Liver cirrhosis in the outcome of hepatitis C is the leading cause of hepatocellular carcinoma (HCC) in the world. Early diagnosis and timely treatment of HCC are important for reducing mortality and increasing life expectancy of patients with hepatocellular carcinoma. To assess the risk of HCC, the definition of alpha-fetoprotein (AFP) in the blood is most widely used, but low sensitivity limits its diagnostic value. In 2012, a new HCC biomarker – osteopontin (OPN), which is a secreted phosphoprotein that has a high affinity for integrins was proposed.

Для корреспонденции: Малов Сергей Игоревич, канд. мед. наук, асс. каф. инф. болезней; lynx2000@mail.ru

The level of acute renal failure begins to rise in the early stages of malignancy, before the period of HCC detection by imaging methods, and has significantly better sensitivity than AFP. The purpose of this study is to evaluate the diagnostic efficacy of the combined determination of alpha-fetoprotein and osteopontin in prospective monitoring of patients with chronic hepatitis C in the advanced phase of liver fibrosis.

Monitoring of 588 patients with hepatitis C was carried out from February 2013 to February 2019. HCC was detected in 55 of them (2.6% per year). The combination of 2 biomarkers showed better diagnostic efficacy than alpha-fetoprotein and osteopontin separately: AUC 0.85 (95% CI 0.80-0.90) versus AUC 0.63 (95% CI 0.57-0.70) and AUC 0.82 (95% CI 0.77-0.88), respectively. This combination showed a sensitivity of 85.5% and made it possible to diagnose HCC with a prognostic level of a positive result of 72.3% at 19,4±0,8 weeks before the diagnosis was confirmed by instrumental imaging methods (ultrasound, MRI, CT). In the combined variant, ARF made the greatest contribution to the increase in diagnostic efficacy (AUC). At an early and very early stage of HCC development, isolated HCC elevations were found in only 5.4% of patients. Conclusion: the combined use of alpha-fetoprotein and osteopontin as a diagnostic panel can be recommended for monitoring patients with liver cirrhosis in the outcome of hepatitis C and predicting HCC at an early stage of development.

Key words: *hepatocellular carcinoma; prognostication; biomarkers; alpha-fetoprotein; osteopontin; hepatitis C.*

For citation: *Malov S.I., Malov I.V., Dvornichenko V.V., Rasulov R.I., Kuvshinov A.G., Marche P.N., Decaens T., Macek-Jilkova Z., Yushchuk N.D. Application of alpha-fetoprotein and osteopontin combination for early diagnosis of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (10): 607-612. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-607-612>*

For correspondence: *Malov Sergey Igorevich, Assistant Professor, Department of Infectious Diseases; e-mail: lynx2000@mail.ru*

Information about authors:

Malov S.I. orcid.org/0000-0002-3135-4616

Malov I.V. orcid.org/0000-0002-097-4929

Dvornichenko V.V. orcid.org/0000-0002-1777-5449

Rasulov R.I. orcid.org/0000-0002-3671-1459

Kuvshinov A.G. orcid.org/0000-0003-3325-9433

Marche P.N. orcid.org/0000-0002-8930-9340

Decaens T. orcid.org/0000-0003-0928-0048

Macek-Jilkova Z. orcid.org/0000-0002-2553-5971

Yushchuk N.D. orcid.org/0000-0003-1928-4747

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

Acknowledgment. *The study was carried out under financial support of the federal target program to support research in priority development directions of Russia's scientific and technological complex; contract № 14.616.21.0098; unique identification number of the project RFMEF161618X0098.*

Received 27.07.2019
Accepted 20.09.2019

Введение. Ежегодно в мире регистрируется более 800 тысяч вновь выявленных случаев гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [1], а по распространенности рак печени занимает 5 место среди онкологических заболеваний [2]. Заболеваемость ГЦК колеблется от 1,6-2,5 на 100 тыс. населения в Европе и Северной Америке до 75-90 в Египте и Монголии [1]. В Российской Федерации ежегодно регистрируется 6-8 тысяч вновь выявленных случаев ГЦК при показателе заболеваемости 4,0-5,0 на 100 тыс. населения [3].

На основании многочисленных исследований установлено, что среди факторов риска наиболее значимыми для развития ГЦК являются вирусы гепатитов В (HBV) и С (HCV) [1, 4]. Несмотря на известные успехи в лечении вирусных гепатитов достижение стойкого вирусологического ответа не сопровождается снижением риска развития ГЦК [5, 6]. Так у больных ВГС на фоне элиминации вируса при циррозе печени класса А по шкале Чайлд-Пью ГЦК ежегодно развивается у 2,1 % больных, а при классе В – у 7,8% [7].

Ранняя диагностика способствует увеличению продолжительности и улучшению качества жизни пациентов [3, 8]. В Российской Федерации более половины больных ГЦК выявляются на IV стадии болезни, поэтому в течение года с момента установления диагноза

умирают 70-80% [3]. В то же время в некоторых развитых странах благодаря программам скрининга ГЦК выявляется на ранней стадии в 20-60%, когда еще возможно проведение радикального хирургического лечения [3, 9]. В случае ранней диагностики и проведения соответствующего лечения 5-летняя выживаемость достигает 70% [10].

В основе диагностики лежит визуализация опухолевого узла с использованием ультразвукового исследования (УЗИ) печени, компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ) и оценка его васкуляризации [8]. Однако при размере опухоли менее 1 см чувствительность диагностики составляет 55,1% [8]. Поэтому во всем мире большое внимание уделяется поиску биомаркеров ГЦК, которые позволили бы с высокой специфичностью (Sp) и чувствительностью (Se) выявлять наличие опухоли на ранних стадиях, когда общепринятые методы визуализации еще малоэффективны. К настоящему времени описано около 50 протеомных, геномных и метаболомных биомаркеров, ассоциированных с ГЦК, но большинство из них не применяются в клинической практике [10, 11].

Альфа-фетопротеин (АФП) является наиболее широко используемым биомаркером для мониторинга эффективности лечения и прогноза развития ГЦК [12,

13]. АФП как белок желточного мешка зародыша был открыт в 1957 г. [14]. Для диагностики ГЦК его предложили использовать Г.И. Абелев и Ю.С. Татаринев в 1963 г. [15, 16]. АФП достигает максимальной концентрации на 12-16 неделе эмбрионального развития и быстро снижается, после рождения ребенка. У взрослых людей повышение уровня АФП в сыворотке крови наблюдается при дегенеративных процессах в печеночной ткани и при различных онкологических заболеваниях. Содержание АФП в крови увеличивается у 60-80% больных ГЦК, 24% больных раком поджелудочной железы, 15% - раком желудка [13, 17]. Уровень АФП превышающий 20 нг/мл является основанием для подозрения и углубленного обследования на ГЦК, а превышение более 400 нг/мл позволяет с высокой степенью вероятности поставить соответствующий диагноз [12]. Однако при высокой специфичности чувствительность определения АФП при пороговом уровне 400 нг/мл не превышает 45% [18, 19]. В связи с низкой Se и совершенствованием методов инструментальной диагностики необходимость определения АФП при скрининге больных с подозрением на ГЦК ставится под сомнение [8, 20].

Остеопонтин (ОПН) как секретируемый фосфопротеин был открыт в 1979 г. D.R. Senger [21] и описан как большой сиалопротеин костей. ОПН относится к семейству SIBLING-протеинов (small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) [22]. В настоящее время ОПН рассматривается как мультифункциональный белок, вовлеченный в большое число физиологических и патологических реакций, включая воспаление, иммунитет, ангиогенез, фиброгенез, карциногенез [21-23]. Повышение уровня ОПН описано при многих заболеваниях печени, таких как острая печеночная недостаточность, алкогольная и неалкогольная жировая болезнь печени, фиброз печени на фоне хронического течения гепатита В и С [23, 24]. В 2012 г. S. Shang [25] установил, что ОПН может быть прогностическим маркером ГЦК. Уровень ОПН в плазме больных ГЦК значительно выше, чем у практически здоровых людей и больных хроническими гепатитами различной этиологии [26, 27]. ОПН коррелирует с размером опухоли, стадией процесса, инвазией в сосуды, метастазированием [22, 28].

Цель работы: на основании проспективного исследования установить эффективность ранней диагностики гепатоцеллюлярной карциномы при комбинированном определении альфа-фетопротейна и остеопонтина в крови больных хроническим гепатитом С.

Материал и методы. В период с февраля 2013 г. по февраль 2019 г. осуществлялось диспансерное наблюдение за 588 больными хроническим гепатитом С (ХГС) на базе Областной клинической инфекционной больницы (г. Иркутск) и Областного клинического консультативно-диагностического центра (г. Иркутск). Диагноз ХГС устанавливали на основании данных анамнеза, клинического обследования, определения активности печеночных трансаминаз, выявления анти-НСV IgG и РНК вируса гепатита С. Степень фиброза печени определяли с помощью аппарата FibroScan-502. Первый генотип вируса был выявлен у 300 (51%) больных, второй – у 40 (6,8%), третий – у 248 (42,2%). Из 588 человек 455 (77,4%) завершили полный курс противовирусного лечения препаратами интерферона и рибавирина, 97 (16,5%) – препаратами прямого противовирусного действия, 36 (6,1%) противовирусную терапию никогда не получали. Шестнадцать пациентов получали препараты

прямого противовирусного действия в связи с неэффективностью предшествующей терапии препаратами интерферона. Цирроз был диагностирован на основании клинико-лабораторных данных, эластометрии печени, результатов УЗИ, КТ, МРТ.

Диспансерное наблюдение за пациентами осуществлялось в среднем 1 раз в 6 месяцев и включало клинический осмотр, общеклинические и биохимические анализы, определение АФП и ОПН в крови, эластометрию печени, УЗИ органов брюшной полости. При необходимости выполнялась КТ или МРТ печени. Через 1-5 лет после постановки диагноза 127 человек по разным причинам выбыли из наблюдения и потеряли связь с лечащими врачами. Средний период диспансерного наблюдения составил за больными ХГС составил 2,7 года. ГЦК была диагностирована у 55 пациентов (2,6% в год).

Диагноз ГЦК устанавливался с учетом критериев европейской ассоциации по изучению болезней печени (EASL) [8]. Больные наблюдались и лечились в ГБУЗ «Областной онкологический диспансер» (г. Иркутск). У всех больных диагноз был верифицирован морфологически. Для лабораторных исследований использовались пробы крови, полученные во время диспансерного наблюдения за 10-38 нед до верификации диагноза ГЦК. Группу сравнения составили 70 больных ХГС у которых через 12-24 недели после взятия крови на ОПН и АФП была выполнена мультифазная контрастная КТ и/или динамическая контрастная МРТ и не было обнаружено объемного образования печени и изменений сосудистой васкуляризации характерной для ГЦК. Образцы сывороток пациентов ХГС были собраны во время диспансерного наблюдения. Все образцы сыворотки центрифугировали и хранили при -80 С. Информированное согласие было получено от каждого участника исследования, а проведение настоящей работы было одобрено комитетом по этике Иркутского государственного медицинского университета.

Уровень АФП в сыворотке крови определяли на иммуноферментном анализаторе PerkinElmer Victor3™ Plate Reader с использованием DuoSet® ELISA Human Alpha fetoproteine Development Systems (США). Количественное содержание ОПН оценивали в иммуноферментном анализе с использованием коммерческого набора DuoSet® ELISA Human osteopontine Human Development Systems (США). Анализы на содержание биомаркеров в крови проводились в лаборатории аналитической иммунологии Института передовых биологических наук Университета Гренобль-Альпы (Франция) в соответствии с инструкциями к наборам.

Статистическую обработку материалов проводили с использованием программы Meta Disc 1.4 Software, которая находится в открытом доступе по ссылке: <https://meta-disc.software.informer.com/1.4/>. Оценивали такие показатели как диагностическая Se, Sp, положительное прогностическое значение (PPV), отрицательное прогностическое значение (NPV), площадь под кривой зависимости Se и Sp (AUC), 95% доверительный интервал (CI), рассчитанный на основе углового преобразования Фишера. Для выявления достоверности различий показателей в сравниваемых группах применяли критерий хи-квадрат (χ^2), рассчитанный с использованием программы STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., США). Уровень статистической значимости был принят при $p \leq 0,05$.

Таблица 1

Основные клинико-лабораторные показатели в группах больных ГЦК и ХГС

Показатель	Больные ГЦК (n=55)	Больные ХГС (n=70)
Средний возраст, годы	59,9±4,5	57,7±10,5
Пол мужской, %	38 (69,1±6,2)	45 (64,3±5,7)
Боли в животе, n (%)	10(18,2±5,2)	12(17,1±4,5)
Потеря веса, n (%)	45(81,8±5,2)	54(77,1±5,0)
Слабость, n (%)	52(94,5±3,1)	57(81,4±4,7)
Переливание крови в анамнезе, n (%)	7(12,7±4,5)	8(11,4±3,8)
Наличие желтухи в анамнезе, n (%)	3(5,4±3,1)	2(2,9±2,0)
Цирроз печени, n (%)	50(90,9±3,9)	59(84,3±4,4)
Класс А по Чайлд-Пью, n (%)	8(16,0±5,2)	11(18,6±5,1)
Класс В по Чайлд-Пью, n (%)	13(26,0±6,2)	24(40,7±6,4)
Класс С по Чайлд-Пью, n (%)	29(58,0±7,0)	24(40,7±6,4)
Злоупотребление алкоголем (>16 баллов по шкале Audit) n (%)	7(12,7±4,5)	12(17,1±4,5)
Общий билирубин (мкмоль/л), среднее значение	47,9±18,7	27,2±8,6
Альбумин (г/л), среднее значение	28,9±1,3	32,0±4,0
АЛТ (Ед/л), среднее значение	76,6±33,8	65,5±10,9
АСТ (Ед/л), среднее значение	98,5±40,1	88,0±9,8
TNM стадия I, n (%)	29 (52,7±6,7)	-
TNM стадия II, n (%)	18(32,7±6,3)	-
TNM стадия IIIA, n (%)	8(14,6±4,8)	-

Таблица 2

Прогностическое значение определения АФП, ОПН и их комбинации для ранней диагностики ГЦК в исходе ГС

Биомаркер	Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)	AUC	95% CI
1.АФП	45,5	95,7	89,3	69,1	0,63	0,57-0,70
2.ОПН	80,0	78,6	74,6	83,3	0,82	0,77-0,88
3.АФП+ОПН	85,5	74,3	72,3	86,6	0,85	0,80-0,90
P_{1-2}	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05	<0,01	
P_{1-3}	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	<0,001	
P_{2-3}	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	

Примечание. p – уровень статистической значимости различий.

Результаты и обсуждение. В последние годы в связи с недостаточной эффективностью определения отдельных биомаркеров предпочтение отдается поиску комбинации двух и более белковых молекул, экспрессия которых обусловлена различными звеньями патогенеза ГЦК, т.е. их выявление носит взаимодополняющий характер. Такие попытки описаны в отношении сочетанного определения АФП, ОПН, гликированной L3-изоформы АФП, дис- γ -карбокситротромбина, белка Гольджи-73, глипикана-3, гликопротеина DKK1 [29-35]. В Японии клинические рекомендации по диагностике и лечению ГЦК включают одновременное определение АФП, дис- γ -карбокситротромбина и гликированной L3-изоформы АФП и эта комбинация внедрена в практику учреждений здравоохранения страны с 2011 г. [36].

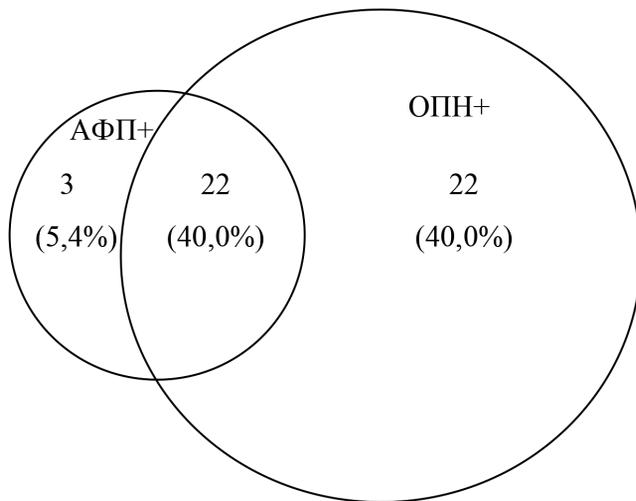
В настоящем исследовании проведена оценка диагностического значения комбинации АФП и ОПН. Клинико-лабораторная характеристика обследуемых больных представлена в табл. 1. Опытная и контрольная группа были сопоставимы по половозрастной структуре, стадии цирроза печени, степени активности печеночных трансаминаз.

Уровни АФП и ОПН в сыворотке крови были значительно выше у пациентов с ГЦК по сравнению с боль-

ными ХГС. Средняя концентрация АФП в сыворотке пациентов ГЦК составила 113,5 нг/мл, у больных ХГС – 4,6 нг/мл ($p < 0,0001$). Средний уровень ОПН составил 206,3 нг/мл и 117,1 нг/мл, соответственно ($p < 0,01$).

Чтобы определить оптимальное пороговое значение (cut off) для АФП и ОПН были построены графики зависимости показателей Sp и Se и рассчитана AUC. Для построения графиков использовали фиксированные значения уровня АФП 10-20-40-80 нг/мл и ОПН 25-50-75-100 нг/мл. Оптимальное пороговое значение было установлено при уровне АФП - 20 нг/мл (AUC 0,63; 95% CI 0,57-0,70), при уровне ОПН - 75 нг/мл (AUC 0,82; 95% CI 0,77-0,88). Эти пороговые значения были использованы для оценки диагностической эффективности комбинированного определения АФП и ОПН (табл. 2).

АФП характеризовался низким уровнем Se, но высоким уровнем Sp. ОПН в сравнении с АФП показал достаточно высокую Se ($p < 0,001$), но более низкую Sp ($p < 0,01$). Использование комбинации обоих биомаркеров ГЦК позволило повысить Se до 85,5%, при этом Sp снизилась и по отношению к АФП, и по отношению к ОПН. Вместе с тем интегральный показатель AUC достиг максимальных значений. У 47 больных с подтвержденным



Частота положительных результатов обнаружения АФП и ОПН у 55 больных ХГС с исходом в ГЦК. Отрицательны оба маркера – 8 (14,6%).

диагнозом ГЦК повышенные уровни одного или обоих маркеров регистрировались в среднем за $19,4 \pm 0,8$ нед до выявления опухолевого узла методами визуализации. При сравнении показателей Se, Sp и AUC при использовании только ОПН и комбинации ОПН+АФП значимых отличий установлено не было. Изолированное повышение только АФП было выявлено только в 5,4%; оба маркера оказались отрицательными у 14,6% больных с ГЦК (см. рисунок).

Диагностическое значение АФП ограничено тем, что в 20-30% случаев опухолевые клетки печени не синтезируют АФП [18, 19]. Кроме этого, необходимо учитывать, что уровень АФП имеет линейную зависимость от размера опухоли и при маленьких узлах (до 2 см) он существенно не повышается. Уровень АФП значительно возрастает только при сосудистой инвазии опухоли, но это происходит уже на поздних стадиях онкологического роста [13].

Анализ эффективности совместного определения АФП и ОПН для ранней диагностики ГЦК предпринимался и ранее [30, 37, 38]. Было установлено, что ОПН, как онкомаркер ГЦК, не отличается высокой Sp. Его уровень повышается не только при раке печени, но и при раке легких, груди, кишечника, желудка, поджелудочной железы, почек, желчного пузыря простаты, яичников [22, 24]. Вместе с тем высокая Se ОПН проявляется в возможности выявить повышение концентрации биомаркера в крови за несколько месяцев и даже лет до клинического подтверждения диагноза [25, 39]. В мета-анализе J. Li и соавт. [37] приводит результаты 15 исследований диагностической значимости определения АФП и ОПН и указывает на явные преимущества использования такой комбинации. К недостаткам анализируемых в обзоре работ следует отнести то, что все они носили характер ретроспективного исследования по типу случай-контроль, при этом в качестве контрольной группы выступали не только больные хроническими заболеваниями печени, но и практически здоровые лю-

ди. Вместе с тем известно, что основной группой риска ГЦК являются пациенты с поражением печени в стадии цирроза. Поэтому именно эта группа нуждается в постоянном мониторинге на ГЦК. Кроме этого, только в 2-х работах исследования проведены на этнической группе европеоидов, а в остальных случаях выполнены в различных популяциях странах Азии. В целом, мета-анализ по данным вышеприведенных ретроспективных работ показал высокую Sp (77%) и Se (82%) комбинированного использования биомаркеров АФП и ОПН [37].

В настоящем исследовании в условиях проспективного наблюдения за больными ХГС с продвинутой стадией фиброза печени получены обнадеживающие результаты диагностической эффективности комбинации АФП и ОПН. К сожалению, определение указанных белков не обеспечивает целевой уровень эффективности, который по мнению N. Tsuchiya и соавт. [10] должен достигать 90% как по Se, так и по Sp. Тем не менее, высокий уровень Se при умеренном уровне Sp позволяет рекомендовать данную комбинацию биомаркеров для скрининга пациентов, определения группы высокого риска и персонализированного ведения пациентов.

Заключение. Сочетанное определение АФП и ОПН при пороговых значениях 20 нг/мл и 75 нг/мл позволяет у больных ХГС выявить ГЦК на ранней стадии заболевания у 85,5% больных на $19,4 \pm 0,8$ недель раньше подтверждения диагноза инструментальными методами визуализации (УЗИ, МРТ, КТ). При этом следует учитывать, что добавление АФП к ОПН вносит незначительный вклад в повышение Se и AUC, поэтому поиск комбинации ОПН и других биомаркеров остается актуальным.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы проведения исследований по приоритетным направлениям с участием научно-исследовательских организаций и университетов в рамках российско-французской Партнерской программы Юбера Кюрьена «Колмогоров» (контракт № 14.616.21.0098; уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI61618X0098).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1,2, 4, 5, 7-39 см. REFERENCES)

3. Бредер В.В., Косырев В.Ю., Кудашкин Н.Е., Лактионов К.К. Гепатоцеллюлярный рак в Российской Федерации как социальная и медицинская проблема. *Медицинский совет*. 2016; 10: 10-8.
6. Морозов В.Г., Тихомолова Е.Г., Малов С.И., Малова Е.С., Топорнина Л.М., Жаркова Е.В. и др. Риск развития гепатоцеллюлярной карциномы у больных с хроническим гепатитом С после противовирусной терапии препаратами прямого противовирусного действия: собственные наблюдения. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(4): 38-47.
16. Татарин Ю.С. Присутствие эмбрионального альфа-глобулина в сыворотке больных с первичным раком печени. *Вопросы медицинской химии*. 1964; 10: 90-1.

REFERENCES

1. Ozakyol A. Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma (HCC Epidemiology). *J. Gastrointest. Cancer*. 2017; 48(3): 238-40.
2. Bertuccio P., Turati F., Carioli G., Rodriguez T., La Vecchia C., Malvezzi M., et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *J. Hepatol*. 2017; 67(2): 302-9.

3. Breder V.V., Kosyrev V.Y., Kudashkin N.E., Laktionov K.K. Hepatocellular carcinoma as a social and medical problem in the Russian Federation. *Meditsinskiy sovet*. 2016; 10: 10-8. (in Russian)
4. Trad D., Bibani N., Sabbah M., Elloumi H., Gargouri D., Ouakaa A., et al. Known new and emerging risk factors of hepatocellular carcinoma (review). *Presse Med*. 2017; 46(11): 1000-7.
5. Liu X, Gao Y, Niu J. Hepatitis C Virus - Related Hepatocellular Carcinoma in the Era of Direct - Acting Antiviral Agents. *Hepat Mon*. 2018; 18(6): e66007.
6. Morozov V.G., Tikhomolova E.G., Malov S.I., Malova E.S., Topornina L.M., Zharkova E.V. et al. Risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C after antiviral therapy with direct antiviral agents: own observations. *Infektsionnye bolezni*. 2018; 16(4): 38-47. (in Russian)
7. Calvaruso V., Cabibbo G., Cacciola I., Petta S., Madonia S., Bellia A., et al. Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Patients With HCV-Associated Cirrhosis Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. *Gastroenterology*. 2018; 155(2): 411-21.
8. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol*. 2018; 69(1): 182-236.
9. Izumi N. Diagnostic and treatment algorithm of the Japanese society of hepatology: a consensus-based practice guideline. *Oncology*. 2010; 78 Suppl. 1: 78-86.
10. Tsuchiya N., Sawada Y., Endo I., Saito K., Uemura Y., Nakatsura T. Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol*. 2015; 21(37): 10573-83.
11. Sengupta S., Parikh N.D. Biomarker development for hepatocellular carcinoma early detection: current and future perspectives. *Hepat. Oncol*. 2017; 4(4): 111-22.
12. Sauzay C., Petit A., Bourgeois A.M., Barbare J.C., Chauffert B., Galmiche A., et al. Alpha-fetoprotein (AFP): A multi-purpose marker in hepatocellular carcinoma. *Clin. Chim Acta*. 2016; 463: 39-44.
13. Bai D.S., Zhang C., Chen P., Jin S.J., Jiang G.Q. The prognostic correlation of AFP level at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep*. 2017; 7(1): 12870.
14. Bergstrand C.G., Czar B. Paper electrophoretic study of human fetal serum proteins with demonstration of a new protein fraction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 1957; 9(3): 277-86.
15. Abelev G.I., Perova S.D., Khramkova N.I., Postnikova Z.A., Irin I.S. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*. 1963; 1: 174-80.
16. Tatarinov Yu.S. Detection of embryo-specific alpha-globulin in the blood serum of a patient with primary liver cancer. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1964; 10: 90-91. (in Russian)
17. Chávez-López M.G., Zúñiga-García V., Pérez-Carreón J.I., Avalos-Fuentes A., Escobar Y., Camacho J. Eag1 channels as potential early-stage biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Biologics*. 2016; 10: 139-48.
18. Bent S., Kohlwes J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann. Intern. Med*. 2003; 139(1): 46-50.
19. Yang J.D., Dai J., Singal A.G., Gopal P., Addissie B.D., Nguyen M.H., et al. Improved performance of serum alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma diagnosis in HCV cirrhosis with normal alanine transaminase. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2017; 26(7): 1085-92.
20. Aubé C., Oberti F., Lonjon J., Pageaux G., Seror O., N'Kontchou G., et al. EASL and AASLD recommendations for the diagnosis of HCC to the test of daily practice. *Liver Int*. 2017; 37(10): 1515-25.
21. Senger D.R., Wirth D.F., Hynes R.O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 1979; 16: 885-93.
22. Hao C., Cui Y., Owen S., Li W., Cheng S., Jiang W.G. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *Int J Mol Med*. 2017; 39(6): 1327-37.
23. Wen Y., Jeong S., Xia Q., Kong X. Role of Osteopontin in Liver Diseases. *Int J Biol Sci*. 2016; 12(9): 1121-8.
24. Zhao H., Chen Q., Alam A., Cui J., Suen K.C., Soo A.P., et al. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death Dis*. 2018; 9(3): 356.
25. Shang S., Plymoth A., Ge S., Feng Z., Rosen H.R., Sangrajrang S., et al. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012; 55(2): 483-90.
26. Duarte-Salles T., Misra S., Stepien M., Plymoth A., Muller D., Overvad K., et al. Circulating Osteopontin and Prediction of Hepatocellular Carcinoma Development in a Large European Population. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016; 9(9): 758-65.
27. Karpinsky G., Fatyga A., Krawczyk M.A., Chamera M., Sande N., Szmyd D., et al. Osteopontin: its potential role in cancer of children and young adults. *Biomark Med*. 2017; 11(4): 389-402.
28. Cabiati M., Gaggini M., Cesare M.M., Caselli C., De Simone P., Filippini F., et al. Osteopontin in hepatocellular carcinoma: A possible biomarker for diagnosis and follow-up. *Cytokine*. 2017; 99: 59-65.
29. Ette A.I., Ndububa D.A., Adekanle O., Ekrikpo U. Diagnostic utility of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin in Nigerians with hepatocellular carcinoma. *Niger J. Clin Pract*. 2017; 20(10): 1267-72.
30. Jang E.S., Jeong S-H., Kim J-W., Choi Y.S., Leissner P., Brechot C. Diagnostic performance of alpha-fetoprotein, protein induced by vitamin K absence, osteopontin, Dickkopf-1 and its combinations for hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*. 2016; 11(3): e0151069.
31. Gao J., Song P. Combination of triple biomarkers AFP, AFP-L3, and PIVAKII for early detection of hepatocellular carcinoma in China: Expectation. *Drug Discov Ther*. 2017; 11(3): 168-9.
32. Qin Q.F., Weng J., Xu G.X., Chen C.M., Jia C.K. Combination of serum tumor markers dickkopf-1, DCP and AFP for the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma. *Asian Pac. J. Trop. Med*. 2017; 10(4): 409-13.
33. Xu W.J., Guo B.L., Han Y.G., Shi L., Ma W.S. Diagnostic value of alpha-fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 in hepatocellular carcinomas with low AFP levels. *Tumour Biol*. 2014; 35: 12069-74.
34. Qiao S.S., Cui Z.Q., Gong L., Han H., Chen P.C., Guo L.M., et al. Simultaneous measurements of serum AFP, GPC-3 and HCCR for diagnosing hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2011; 58(110-111): 1718-24.
35. Junna Z., Gongde C., Jinying X., Xiu Z. Serum AFU, 5'-NT and AFP as Biomarkers for Primary Hepatocellular Carcinoma Diagnosis. *Open Med (Wars)*. 2017; 12: 354-8.
36. Best J., Bilgi H., Heider D., Schotten C., Manka P., Bedreli S., et al. The GALAD scoring algorithm based on AFP, AFP-L3, and DCP significantly improves detection of BCLC early stage hepatocellular carcinoma. *Z Gastroenterol*. 2016; 54 (12): 1296-1305.
37. Li J., Chen X., Dai M., Huang S., Chen J., Dai S. Diagnostic accuracy of osteopontin plus alpha-fetoprotein in the hepatocellular carcinoma: A meta-analysis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol*. 2017; 41(5): 543-53.
38. Ge T., Shen Q., Wang N., Zhang Y., Ge Z., Chu W., et al. Diagnostic values of alpha-fetoprotein, dickkopf-1, and osteopontin for hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol*. 2015; 32(3): 59.
39. Kim J., Ki S.S., Lee S.D., Han C.J., Kim Y.C., Park S.H., et al. Elevated plasma osteopontin levels in patients with hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol*. 2006; 101(9): 2051-9.

Поступила 20.07.19

Принята к печати 20.09.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Боронина Л.Г.^{1,2}, Саматова Е.В.², Пруткин М.Е.²

РАСШИРЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИЕМИИ И СЕПСИСА У ДЕТЕЙ МНОГОПРОФИЛЬНОГО СТАЦИОНАРА

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 620028, Екатеринбург, Россия;

²ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», 620049, Екатеринбург, Россия

Преимущественно при исследовании bacteremia обнаружены коагулазоотрицательные стафилококки и представители порядка Enterobacterales. Для установления этиологической роли коагулазоотрицательного стафилококка при постановке диагноза сепсис в каждом конкретном случае необходимо учитывать состояние и возраст ребёнка, показатели маркеров системного воспаления. В 1/3 случаев коагулазоотрицательные стафилококки свидетельствуют о колонизации катетера. Доля Staphylococcus aureus при bacteremia и сепсисе – 6,5%, Haemophilus influenzae – 0,6%, Escherichia coli – 7,8%, Streptococcus agalactiae – 2%. Для диагностики сепсиса необходимо проведение неоднократного (не менее двух раз) культурального исследования крови с применением качественных питательных сред содержащих все необходимые факторы роста, с последующим обязательным определением чувствительности выделенных штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам. Bacteremia в целом у детей многопрофильного стационара составила 5,8%. У недоношенных детей bacteremia выявлена в 4,4% случаев, из них сепсис подтвержден в 41,2%.

Ключевые слова: bacteremia; sepsis; дети; диагностика.

Для цитирования: Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Пруткин М.Е. Расширение возможностей в диагностике bacteremia и сепсиса у детей многопрофильного стационара. Клиническая лабораторная диагностика, 2019; 64 (10):613-619

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-613-619>

Boronina L.G.^{1,2}, Samatova E.V.², Prutkin M.E.²

EXPANSION OF OPPORTUNITIES IN DIAGNOSTICS OF BACTEREMIA AND SEPSIS IN CHILDREN OF A MULTI-PROFILE HOSPITAL

¹Urals State Medical University, chair of clinical laboratory diagnostics and bacteriology, 620028, Ekaterinburg, Russian Federation;

²Regional Children's Clinical Hospital, clinical microbiology laboratory, 620149, Ekaterinburg, Russian Federation

Primarily in the study of bacteremia, coagulase-negative staphylococci and representatives of the order Enterobacterales were found. To establish the etiological role of coagulase-negative staphylococcus in making a diagnosis of sepsis in each particular case, it is necessary to consider the condition and age of the child, as well as indicators of markers of systemic inflammation. In 1/3 cases of coagulase-negative staphylococcus indicate colonization of the catheter. Staphylococcus aureus in bacteremia and sepsis - 6.5%, Haemophilus influenzae - 0.6%, Escherichia coli - 7.8%, Streptococcus agalactiae - 2%. For the diagnosis of sepsis, it is necessary to conduct repeated (at least two times) blood culture studies using high-quality nutrient media containing all the necessary growth factors, followed by a mandatory determination of the susceptibility of the isolated strains of microorganisms to antimicrobial agents. Bacteremia as a whole in children of a multidisciplinary hospital amounted to 5.8%. In premature babies, bacteremia was detected in 4.4% of cases, of which sepsis was confirmed in 41.2%.

Key words: bacteremia; sepsis; children; diagnostics.

For citation: Boronina L.G., Samatova E.V., Prutkin M.E. Expansion of opportunities in diagnostics of bacteremia and sepsis in children of a multi-profile hospital. (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).2019; 64(10): 613-619 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-613-619>

For correspondence: Boronina Lyubov Grigorievna, Doctor of Medical Sciences, Professor of chair of clinical laboratory diagnostics and bacteriology; e-mail: boroninalg@mail.ru

Information about authors:

Boronina L.G., <http://orcid.org/0000-0003-0152-962X>

Samatova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3154-6201>

Prutkin M.E., <https://orcid.org/0000-0001-6965-2961>

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 18.09.2019

Accepted 20.09.2019

Для корреспонденции: Боронина Любовь Григорьевна, д-р мед. наук, проф. каф. клинической лабораторной диагностики и бактериологии; e-mail: boroninalg@mail.ru

Введение. Сепсис остается одной из актуальных проблем медицины в силу высокой летальности, значительных экономических затрат, причиняемого этим заболеванием. За последние 50 лет частота сепсиса в большинстве стран мира возросла более чем в 10 раз, в индустриально-развитых странах годовая заболеваемость сепсисом увеличивается в среднем на 1,5-8% и

может достигнуть к 2020 г. более 1,1 млн случаев в год [1]. Это связано с развитием инвазивных медицинских технологий, длительностью пребывания пациентов в отделениях реанимации, увеличением количества высокотехнологичных медицинских манипуляций, цитостатической и иммуносупрессивной терапии, трансплантологии и протезирования, ВИЧ-инфекции и увеличением количества микроорганизмов, устойчивых к большинству антибиотиков.

В зависимости от источника инфекции различают сепсис: абдоминальный, респираторный, ангиогенный, мочевой, ожоговый; по этиологическому фактору выделяют сепсис, вызванный грамположительными или грамотрицательными бактериями, грибами [1].

Обнаружение микроорганизма в крови культуральным методом при инвазивных инфекциях и сепсисе позволяет верифицировать микроорганизмы, определить их резистентность к антимикробным препаратам, что является определяющим в выборе адекватных режимов антимикробной терапии [2-8]. Рекомендации по выбору эмпирического режима терапии сепсиса должны базироваться, в том числе на уровне резистентности нозокомиальных возбудителей по данным микробиологического мониторинга (все рекомендации по антибиотикотерапии нозокомиального сепсиса без учёта локального уровня антибиотикорезистентности будут иметь условный характер) [1].

Цель исследования - выявить возбудителей бактериемии и сепсиса при использовании маркёров инвазивных инфекций и современных коммерческих питательных сред для посева крови у детей многопрофильного стационара.

Материал и методы. Проведён ретроспективный анализ посевов крови у больных, находившихся на лечении в разных отделениях ГАУЗ СО «ОДКБ» с января 2018 г. до марта 2019 г. За исследуемый период проведено 2348 исследования проб крови от 1724 пациентов. При этом больше, чем в половине случаев (63,4%) пробы поступали из отделений анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) новорожденных и недоношенных детей.

Для посева крови забранной из интактной вены и/или катетера использовались: системы для гемокультур «Signal» («Oxoid», Великобритания), флаконы для

автоматического анализатора гемокультур «ВАСТЕС™ FX» («Becton Dickinson», США), бульон с сердечно-мозговым экстрактом с 0,025% SPS, CO₂ и вакуумом («Conda», Испания).

Взятие крови на бактериологическое исследование производили согласно общепринятым методам [9]. Идентификацию выделенных микроорганизмов и антибиотикоустойчивость проводили бактериологическим методом и на полуавтоматических: SENSITITRE (TREC Diagnostic Systems, США/Великобритания), ATB Expression (bioMerieux, Франция) и автоматическом MicroScan WalkAway 96 (Siemens, США) анализаторах.

Количественное определение прокальцитонина (нг/мл) проводилось методом фермент-связанного флуоресцентного анализа на автоматическом анализаторе MiniVidas («bioMerieux», Франция). Количественное определение С-реактивного белка (мг/л) на биохимическом анализаторе AU 680 Beckman Coulter (США).

Результаты и обсуждение. Наибольшее количество проб крови поступило из ОРИТ новорожденных и недоношенных детей (табл. 1).

Этиология бактериемии и фунгемии у детей многопрофильного стационара в 2018 г. представлена на рисунке.

Микроорганизмы обнаружены в 5,8% (136 проб) посевов крови детей с подозрением на инвазивные инфекции многопрофильного стационара. Микроорганизмы обнаружены в крови новорожденных, находящихся в ОРИТ новорожденных и недоношенных детей в 4,4%, от пациентов после хирургических вмешательств – 5,3%, от пациентов с соматическими заболеваниями – 12,9%. Культуральное исследование крови в ОРИТ новорожденных и недоношенных детей проводится у каждого ребёнка в день поступления из родового отделения в соответствии с рекомендациями и согласно протоколу обследования, в других отделениях – по клиническим показаниям.

КОС, представители порядка *Enterobacteriales* лидируют среди возбудителей бактериемии.

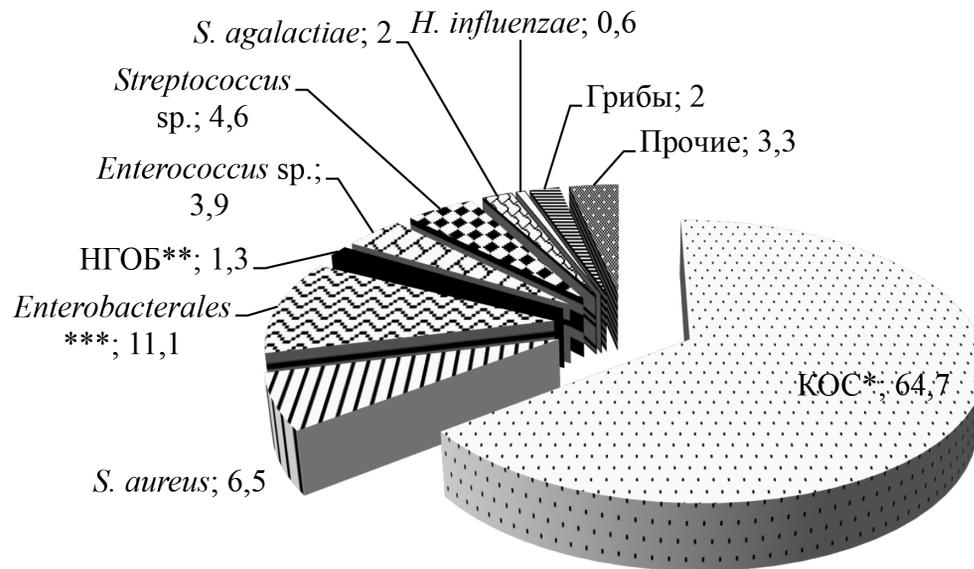
Выделенные представители порядка *Enterobacteriales* включали: *Escherichia coli* (n=12), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Rahnella aquatilis* (n=1), *Serratia marcescens* (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=1).

НГОБ представлены *Pseudomonas aeruginosa* (n=1) и *Ralstonia pickettii* (n=1).

Таблица 1

Исследование посевов крови у пациентов многопрофильного стационара

Пациенты	Недоношенные дети	Пациенты после хирургических вмешательств	Пациенты с соматическими заболеваниями
Всего проб крови	1750	227	371
Положительные гемокультуры	76	12	48
Возраст детей	от рождения до 1 мес	от 10 дней до 9 лет	от 2 мес до 15 лет
Масса тела	от 600 грамм	от 1600 грамм	от 2500 грамм
Направительный диагноз	респираторный дистресс-синдром, врождённый порок сердца, внутриутробная инфекция, внутриутробный сепсис, сепсис, ранний неонатальный сепсис, пневмония, врождённые пороки развития, гипоксическое поражение центральной нервной системы, диафрагмальная грыжа, перитонит	остеомиелит, хилоторакс, сепсис, врождённый порок сердца, кишечная непроходимость, химический ожог пищевода, острая гнойно-деструктивная пневмония, перитонит, хроническая почечная недостаточность, гидроцефалия	пневмония, бронхолёгочная дисплазия, синдром мальабсорбции, энтероколит, хроническая почечная недостаточность, сепсис, кишечная непроходимость



Этиология бактериемии и фунгемии у детей многопрофильного стационара (%), $n=153$.

*КОС – коагулазоотрицательные стафилококки (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*).

**НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia pickettii*).

***Представители порядка *Enterobacteriales* включали следующие виды: *Esherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Rahnella aquatilis*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*.

Staphylococcus epidermidis, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans* с одной стороны, могут являться контаминантами при нарушении качества сбора материала у больных без факторов риска развития бактериемии и сепсиса. С другой стороны они могут иметь этиологическое значение, особенно у недоношенных и иммунокомпромитированных детей. Для доказательства их этиологической роли требуется проведение неоднократных посевов крови (не менее двух). КОС могут иметь значение при катетер-ассоциированных инфекциях (КАИК), в этом случае параллельно забирается кровь вначале из интактной (не катетеризированной) вены, затем из катетера, при необходимости можно исследовать сам катетер.

Микомицеты обнаружены в крови трижды: два штамма *Candida albicans* и один штамм *Candida parapsilosis*. При возникновении кандидемии вероятность развития кандидозного сепсиса во время госпитализации увеличивается в два раза, продолжительность лечения — на 13-30 дней, стоимость лечения — в 1,5-5 раз [1], поэтому раннее выявление этиологии инвазивной инфекции имеет решающее значение.

При выделении типичных патогенов, таких как *Staphylococcus aureus*, представителей порядка *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa*, грибов имеет диагностическую значимость даже одна положительная гемокультура. Выделение микроорганизмов, которые являются кожными сапрофитами, и могут контаминировать пробу (КОС, *Corynebacterium sp.*) для подтверждения истинной бактериемии требуется минимум две положительные гемокультуры [1].

Одними из наиболее информативных с клинической точки зрения критериев сепсиса является обнаружение белков, выявляемых в острую фазу инфекционного воспаления, таких как прокальцитонин (ПКТ, РСТ),

С-реактивный белок. Определение их концентрации в сыворотке используется для экспресс-диагностики сепсиса. Повышение концентрации РСТ ≥ 2 нг/мл, С-реактивного белка >5 мг/л происходит только при системном ответе организма на бактериальную инфекцию.

У пациентов, выделяющих из крови штаммы *S. epidermidis* № 16-19 и *S. haemolyticus* № 23-24 прокальцитонин и С-реактивный белок не определяли в связи с доказанным случаем вызванным вирусом, отсутствия явных признаков сепсиса, в данном варианте выделенные микроорганизмы явились контаминантами (табл. 2).

В 13 положительных проб (9,5%) наблюдалась ассоциация микроорганизмов, состоящая преимущественно из двух культур (табл. 3). Большинство из них свидетельствуют о контаминации при сборе крови. Выделение в составе ассоциаций таких микроорганизмов как *S. aureus*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus sp.*, свидетельствует об их этиологической роли, второй микроорганизм явился контаминантом. При сборе крови через катетер выделенные ассоцианты свидетельствуют о его колонизации, а не истинной бактериемии.

Обоснование этиологической роли ассоциаций микроорганизмов выделенных из крови затруднено. Это связано в первую очередь с трудностями сбора крови у глубоко недоношенных детей и с экстремально низкой массой тела, во-вторых, если кровь забрана через катетер, нельзя исключить КАИК или колонизацию катетера. В ассоциации № 11, *Serratia marcescens*, несомненно, является этиологически значимым патогеном, и свидетельствует о внутрибольничном инфицировании. Из крови, забранной через в первые сутки после рождения до назначения антибиотиков, выделен в ассоциации № 9

Таблица 2

Бактериemia, фунгемия, маркёры системного воспаления (прокальцитонин, С-реактивный белок) у недоношенных детей, с низкой массой тела

№ п/п	Гемокультура	Результат РСТ, нг/мл	СРБ, мг/л	Установленный диагноз
1.	<i>Escherichia coli</i>	-	41,55	сепсис
2.	<i>Escherichia coli</i>	-	19,0	ранний неонатальный сепсис
3.	<i>Escherichia coli</i>	-	-	ранний неонатальный сепсис
4.	<i>Escherichia coli</i>	6,61	13,57	сепсис
5.	<i>Escherichia coli</i>	-	11,0	ранний неонатальный сепсис
6.	<i>Haemophilus influenzae</i>	-	88,03	ранний неонатальный сепсис
7.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	0,34	ранний неонатальный сепсис
8.	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	12,35	внутриутробная пневмония, сепсис
9.	<i>Candida albicans</i>	-	15,03	ранний неонатальный сепсис
10.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	3,55	сепсис
11.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,33	-	внутриутробная пневмония
12.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,37	0,84	ранний неонатальный сепсис
13.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,85	64,80	сепсис
14.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	0,76	внутриутробная пневмония
15.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	28,03	внутриутробная пневмония
16.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	внутриутробная пневмония
17.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	внутриутробная пневмония
18.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	внутриутробная пневмония
19.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	внутриутробная пневмония
20.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	0,49	ранний неонатальный сепсис
21.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	2,32	ранний неонатальный сепсис
22.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	11,28	ранний неонатальный сепсис
23.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-	ранний неонатальный сепсис
24.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	-	внутриутробная пневмония
25.	<i>Staphylococcus simulans</i>	-	15,44	внутриутробный сепсис
26.	<i>Corynebacterium sp.</i>	1,24	13,81	внутриутробный сепсис

Таблица 3

Ассоциации микроорганизмов в гемокультуре, выделенные из крови, забранной из вены или центрального венозного катетера (n=13)

№ п/п	Состав ассоциаций	Количество	Интерпретация
1.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Staphylococcus hominis</i>	2	Ассоцианты являются контаминантами или колонизировали катетер
2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	
3.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Staphylococcus haemolyticus</i> + <i>Streptococcus viridans</i>	1	
4.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Corynebacterium sp.</i>	1	КОС явился контаминантом, второй микроорганизм является этиологически значимым
5.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Streptococcus viridans</i>	1	
6.	<i>Streptococcus oralis/mitis</i> + <i>Staphylococcus hominis</i>	1	
7.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Enterococcus faecalis</i>	1	
8.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Enterococcus sp.</i>	1	
9.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Streptococcus agalactiae</i>	1	
10.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	
11.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> + <i>Serratia marcescens</i>	1	

Streptococcus agalactiae, который имеет этиопатогенетическое значение, имело место внутриутробное инфицирование плода.

Современные специальные готовые коммерческие флаконы [9], позволяют обнаружить рост большинства микроорганизмов в течение 6-8 ч инкубации (до 24 ч), что позволяет уже через 24-48 ч получить результаты точной идентификации возбудителя и его антибиотикограмму. В зависимости от возможностей лаборатории оптимально иметь в работе минимум два вида флаконов для посева крови: один для визуального учёта роста ми-

кроорганизмов, другой для автоматического анализатора гемокультур. При большом количестве проб крови удобнее применять автоматический анализатор гемокультур, так как бактериолог не тратит время на их просмотр, и устраняются возможные ошибки визуального учёта – анализатор тестирует химический сенсор, чувствительный к уровню CO₂, продуцируемому микроорганизмами в процессе роста, флакона каждые 10 мин и не зависит от освещения, и более надежен, чем глаз человека. С другой стороны в автоматический анализатор ВАСТЕС не рекомендуется ставить флаконы с кровью, которые уже

инкубировали в термостате и поставили в анализатор через 6-12 ч, так как в них при росте микроорганизмов может уже накопиться определённый уровень CO₂, который прибор при постановке в него считает за начальный, а в процессе последующей инкубации этот уровень CO₂ не увеличится. Системы для гемокультур «Signal» - это флакон с 84 мл питательного бульона с факторами роста. Они имеют специальные прозрачные индикаторы роста, которые помещают сверху на флакон, куда уже произведён посев крови с соблюдением всех правил стерильности, после инкубации его при 36±1° С в течение 1 часа. Общая длительность инкубации флакона с посевом и присоединённым индикатором роста 7 дней, просмотр системы производится два раза в день. Положительная культура крови, демонстрирующая рост микроорганизмов, определяется внешним видом кровяно-бульонной смеси в прозрачном индикаторе роста выше запорного приспособления. Бульон с сердечно-мозговым экстрактом с 0,025% SPS, CO₂ и вакуумом представляют собой бульоны, готовые к применению, которые содержат восстановленную основу и специальный компонент – полианетолсульфонат натрия (SPS), предотвращающий свертывание крови, нейтрализует бактерицидное действие свежей сыворотки. Поставляются они во флаконах из нейтрального стекла. Для детей флаконы по 20 мл. Флаконы необходимо инкубировать в термостате при 35-37° С 7 дней, ежедневно просматривая, для аэробных культур – периодически встряхивая в первые сутки, а оставшиеся 6 дней – однократно. Просмотр флакона осуществляется ежедневно, при наличии видимых признаков роста производят микроскопическое исследование. После исследования микропрепаратов окрашенных по Граму производят высевы гемокультур на соответствующие селективные среды с последующей идентификацией. Визуальные признаки роста гемокультур при посевах крови на бульоне с сердечно-мозговым экстрактом с 0,025% SPS, CO₂ и вакуумом («Conda», Испания) включают следующие видимые изменения среды: гемолиз - возможные микроорганизмы - стрептококки, стафилококки, листерии, бациллы, клостридии; помутнение - аэробные грамотрицательные палочки, стафилококки, бактероиды; газообразование - аэробные грамотрицательные палочки, анаэробы; образование плёнки - бациллы, псевдомонады, дрожжи; образование хлопьев - *Staphylococcus aureus*.

Применённые для посева крови коммерческие питательные среды содержат в своем составе или к ним необходимо добавлять факторы роста в виде питательной добавки для выделения прихотливых микроорганизмов родов *Neisseria* и *Haemophilus*. У глубоконедоношенных детей и с экстремально низкой массой тела объем засеваемой крови зависит от массы и возраста ребёнка, у них сложно соблюдать кратность сбора крови.

Представляем клинические случаи выделенных гемокультур:

Клинический случай № 1. Ребёнок Б. (девочка), родился в результате преждевременных родов в сроке 34 нед, при рождении поставлен диагноз «Транзиторное тахипное новорожденных, недоношенность 34 недели», переведён в ОРИТ новорожденных и недоношенных детей. Из крови, забранной через пупочный катетер в первые сутки после рождения до назначения антибиотиков, выделен *Haemophilus influenzae* биотип II, бескапсульный вариант, штамм не продуцирует β-лактамазу. Ребёнок рождён естественным путём. Ребёнку проведено опре-

деление С-реактивного белка, который равен 88,03 мг/л. Ребёнок умер от септического шока в течение суток. Очевидно, имело место внутриутробное инфицирование плода, обусловившее в постнатальном периоде развитие тяжёлого септического состояния, что подтверждается результатами посева из заднего свода влагалища, забранного при поступлении – у женщины в сроке 34 нед выделен *H. influenzae* биотип II, бескапсульный вариант. Штамм не продуцирует β-лактамазу, чувствителен к амоксициллину/клавулановой кислоте, ампициллину/сульбактаму, триметоприму/сульфаметоксазолу, ампициллину, имипенему, кларитромицину, левофлоксацину, меропенему, тетрациклину, хлорамфениколу, цефепиму, цефиксиму, цефтриаксону, цефуроксиму.

Клинический случай № 2. Ребёнок К. (мальчик), родился в результате преждевременных родов в сроке 32 нед, при рождении поставлен диагноз «Недоношенность II ст.», переведён в ОРИТ новорожденных и недоношенных детей. Из крови, забранной в первые сутки после рождения до назначения антибиотиков, выделен *S. agalactiae*. Штамм чувствителен к ампициллину, левофлоксацину, линезолиду, офлоксацину, пенициллину. Достоверных случаев устойчивости к β-лактамам антибиотикам в литературе не описано. По результатам антибиотиграмм ребёнку проведена антибиотикотерапия ампициллином. С-реактивный белок = 0,34 мг/л. Очевидно, имело место внутриутробное инфицирование плода, обусловившее в постнатальном периоде развитие септического состояния, что подтверждается данными из обменной карты беременной – у женщины в сроке 30 нед из цервикального канала выделен *S. agalactiae*.

Клинический случай № 3. Ребёнок К. (мальчик), 2013 года рождения из ОРИТ. Диагноз – высокая кишечная непроходимость. Из периферической вены выделен *Rahnella aquatilis*. Штамм чувствителен к: амикацину, гентамицину, амоксициллину/клавулановой кислоте, ампициллину/сульбактаму, цефепиму, цефокситину, цефтазидиму, цiproфлоксацину, левофлоксацину, пиперациллину/тазобактаму, пиперациллину, тетрациклину, тигециклину, тобрамицину, триметоприму/сульфаметоксазолу и умеренно-резистентен к: ампициллину, цефазолину, цефуроксиму. Ребёнку назначен цефепим. Род *Rahnella* относится к порядку *Enterobacteriales*, группе *Yersiniaceae*. Род *Rahnella* состоит из одного первичного вида *Rahnella aquatilis* и двух дополнительных геновидов. *R. aquatilis* обнаружен в окружающей среде, преимущественно, в воде. У человека выделялся из крови, мочи, ран, бронхоальвеолярного лаважа. Большинство инфекций вызывает у иммунокомпromисных пациентов или с другими хроническими состояниями. Описаны случаи септицемии у преждевременно рожденных младенцев. *Rahnella* продуцирует β-лактамазы, обычно чувствительны к цефалоспорином расширенного спектра и другим классам антибиотиков активным против бактериального порядка *Enterobacteriales* [10-13].

Клинический случай № 4. Девочка (девочки) при рождении поставлен диагноз «респираторный дистресс-синдром, недоношенность 23 недели». Из крови, забранной через пупочный катетер в первые сутки после рождения, и отделяемого трахеи, забранного на 2-е сутки после рождения, у первого плода выделена *E. coli* (из отделяемого трахеи в скудном росте). Посевы крови осуществлялись на бульон с сердечно-мозговым экстрактом с 0,025% SPS, CO₂ и вакуумом («Conda», Испания). Штамм чувствителен к пиперациллину/тазобактаму, аз-

треонаму, амикацину, гентамицину, тобрамицину, эртапенему, дорипенему, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, левофлоксацину, миноциклину, тигециклину, тетрациклину, цефтриаксону; умеренно-резистентен к тикарциллину/клавуланату; резистентен к ампициллину, ампициллину/сульбактаму, триметоприму/сульфаметоксазолу. Из крови плаценты, забранной в первые сутки после рождения, и отделяемого трахеи, забранного на вторые сутки после рождения, у второго плода рост микроорганизмов не обнаружен. Стартовая антибиотикотерапия у обоих детей ампициллином и гентамицином.

У матери двойни (роженица Г., 24 лет), поступившей с диагнозом «беременность 23-24 нед, дихориальная диамниотическая двойня, преждевременные роды». Из отделяемого заднего свода влагалища, собранного в 1-е сутки госпитализации, выделены: 1) в умеренном росте *E. coli*; штамм чувствителен к амоксициллину/клавуланату, цефотаксиму, гентамицину, эртапенему, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, резистентен к ампициллину; 2) в обильном росте *Lactobacillus* sp. и *S. epidermidis*.

С последа обоих плодов в обильном росте выделена *E. coli*; штамм чувствителен к амоксициллину/клавуланату, цефотаксиму, гентамицину, эртапенему, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, резистентен к ампициллину.

Очевидно, имело место внутриутробное инфицирование одного из плодов, обусловившее в постнатальном периоде развитие септического состояния, что подтверждается выделением идентичного штамма *E. coli*, от родильницы и из крови и трахеи одного из новорожденных. Произведена смена антибиотикотерапии на меропенем, при повторных анализах из крови и трахеи детей рост микроорганизмов не обнаружен.

Преимущественно при исследовании бактериемии обнаружены КОС и представители порядка *Enterobacterales*. Для установления этиологической роли КОС при постановке диагноза сепсис в каждом конкретном случае необходимо учитывать состояние и возраст ребёнка, показатели маркёров системного воспаления. В 1/3 случаев КОС свидетельствуют о колонизации катетера. Для диагностики сепсиса необходимо проведение неоднократного (не менее двух раз) культурального исследования крови с применением качественных питательных сред содержащих все необходимые факторы роста, с последующим обязательным определением чувствительности выделенных штаммов микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Выводы. 1. Бактериемия у детей многопрофильного стационара составила 5,8%. У детей из ОРИТ новорожденных и недоношенных детей бактериемия выявлена в 4,4% случаев, из них сепсис подтвержден в 41,2%.

2. Применение различных коммерческих питательных сред для посева крови («Signal», флаконы для автоматического анализатора гемокультур «ВАСТЕС™ FX», бульон с сердечно-мозговым экстрактом с 0,025% SPS, CO₂ и вакуумом) не выявило различий как в скорости роста микроорганизмов, так и выделения труднокультивируемых бактерий (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*).

3. Для подтверждения этиологии сепсиса и других бактериальных инфекций, необходимо использовать определение белков острой фазы воспаления (прокальцитонин, С-реактивный белок) и посев крови: у доношенных детей не менее чем трёхкратный, у недоношенных детей не менее двукратного посева крови.

Финансирование. Исследование не имело спонсорскую поддержку.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарим врачей-бактериологов лаборатории клинической микробиологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница» Блинову С.М., Кукушкину М.П., Панову С.А., Устюгову С.С., за оказанную помощь.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 10-13 см. REFERENCES)

1. Карсанов А.М., Сажин В.П., Маскин С.С., Ремизов О.В., Коровин А.Я. Сепсис. ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России. Владикавказ: ИПЦ ИП Цопанова А.Ю.; 2017.
2. Багирова Н.С. Диагностика бактериемии: что нового? Материалы конференции Национальные дни лабораторной медицины России, Москва, 1-3 октября 2014 г. Available at: <http://www.mma-expo.ru/lab/2014/visitors/presentations/2-3-14>. Н.С. Багирова. Диагностика бактериемии.pdf.
3. Бокерия Л.А., Белобородова Н.В. Инфекция в кардиохирургии. М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; 2007.
4. Грувер К.П., Белобородов В.Б. Клиническое значение бактериемии у больных сепсисом. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2011; 13(1): 90-7.
5. Меньшиков В.В., ред. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие. Т. 3. Клиническая микробиология. М.: Лабора; 2009.
6. Лабинская А.С., Волина Е.Г., Ковалева Е.П., ред. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том второй. Оппортунистические инфекции: клинико-эпидемиологические аспекты. М.: Издательство БИНОМ; 2014.
7. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., ред. Сепсис в начале XXI века. Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. Патологоанатомическая диагностика: практическое руководство. М.: Литтерра; 2006.
8. Полухина О.В., Суборова Т.Н., Кузин А.А., Петров А.Н., Осовских В.В., Гранов Д.А. и др. Спектр возбудителей бактериемии у пациентов с иммунодефицитными состояниями различного происхождения. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 14(1):43-8.
9. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания 4.2.2039-05. Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. М.; 2005.

REFERENCES

1. Karsanov A.M., Sazhin V.P., Maskin S.S., Remizov O.V., Korovin A.Ya. Sepsis. FGBOU VO SOGMA Minzdrava Rossii. Vladikavkaz: IPTs IP Tsopanov A.Yu.; 2017. (in Russian)
2. Bagirova N.S. Diagnosis of bacteremia: what's new? Materialy konferentsii Natsional'nye dni laboratornoy meditsiny Rossii, Moscow, 1-3 oktyabrya 2014. Available at: <http://www.mma-expo.ru/lab/2014/visitors/presentations/2-3-14> - N.S. Bagirova. Diagnostika bakteriemii.pdf. (in Russian)
3. Bokeriya L.A., Beloborodova N.V. Infection in cardiac surgery. Moscow: NTSSKh im. A.N. Bakuleva RAMN; 2007. (in Russian)
4. Gruver K.P., Beloborodov V.B. The clinical significance of bacteremia in patients with sepsis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2011; 13(1): 90-7. (in Russian)
5. Men'shikov V.V., ed. Methods of clinical laboratory research: a reference guide. T. 3. Clinical Microbiology [Metodiki klinicheskikh laboratornykh issledovaniy. Klinicheskaya mikrobiologiya]. Moscow: Labora; 2009. (in Russian)
6. Labinskaya A.S., Volina E.G., Kovaleva E.P., eds. Manual of Medical Microbiology. Book III. Volume two. Opportunistic infections: clinical and epidemiological aspects. Moscow: BINOM; 2014. (in Russian)
7. Savel'ev V.S., Gel'fand B.R., eds. Sepsis v nachale XXI veka. Classification, clinical diagnostic concept and treatment. Pathoanatomical diagnosis: a practical guide. Moscow: Litterra; 2006. (in Russian)

8. Polukhina O.V., Suborova T.N., Kuzin A.A., Petrov A.N., Osovskikh V.V., Granov D.A. i dr. The spectrum of pathogens of bacteremia in patients with immunodeficiency of various origins. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 14(1): 43-8. (in Russian)
9. Technique of collecting and transporting biomaterials in microbiological laboratories. Metodicheskie ukazaniya 4.2.2039-05. Federal'nyy tsentr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii. Moscow; 2005. (in Russian)
10. Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta R.S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the «*Enterobacterales*»: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016; 66: 5575-99.
11. Kennedy J.F. Principles and practice of pediatric infectious diseases. 5 ed. Philadelphia: Elsevier; 2018.
12. Kuzdan C., Soysal A., Ozdemir H., Coskun S., Akman I., Bilgen H., Ozek E., Bakir M. *Rahnella aquatilis* sepsis in a premature newborn. Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Pediatrics. 2015. Article ID 860671, 3 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/860671>.
13. Woo Joo Lee, Youngpeck Song, Sang Young Park, Mi Jeong Kim. Bacteremia due to *Rahnella aquatilis* in patients with a chemoport. *Infect. Chemother*. 2018; 50(4):e35.

Поступила 18.09.2019

Егорова С.А.¹, Кафтырева Л.А.^{1,2}, Сужаева Л.В.¹, Забровская А.В.¹, Войтенкова Е.В.¹, Матвеева З.Н.¹, Останкова Ю.В.¹, Лихачев И.В.¹, Сатосова Н.В.², Кицбабашвили Р.В.³, Смирнова Е.В.⁴, Семченкова Л.И.⁴, Быстрая Т.Е.⁴, Сокольник С.Е.⁵, Уткина Н.П.⁵, Сихандо Л.Ю.⁵

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ И КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *SALMONELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2014–2018 гг. В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ, РОССИЯ

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;

³АНО «Медицинский Центр XXI век», 194044, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», филиал № 3, 192012, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», филиал № 6, 198329, Санкт-Петербург, Россия

В статье представлены результаты многолетнего мониторинга (2014–2018 гг.) чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella*, выделенных от детей и взрослых с диарейным синдромом в Санкт-Петербурге. 746 изученных штаммов относились к 42 сероварам, из них более 90,0% принадлежали к трем: *S. enteritidis* (79,6%), *S. typhimurium* (6,8%) и *S. infantis* (3,8%). Определение чувствительности к 7 классам антибиотиков, проведенное согласно рекомендациям EUCAST, выявило устойчивость у 78,6% штаммов. Резистентность к хинолонам, обнаруженная у 63,3% штаммов (*S. enteritidis* -71,0%, *S. typhimurium* - 15,7%, *S. infantis* - 89,3%), у всех штаммов, за исключением одного, характеризовалась низким уровнем (МПК ципрофлоксацина 0,12–0,5 мг/л) и была обусловлена пятью видами однонуклеотидных замен в гене *gyrA*: Asp87Tyr - 36,1% штаммов (*S. infantis*); Ser83Phe - 22,2% (*S. enteritidis*); Asp87Asn - 19,4% (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. hadar*, *S. newport*); Ser83Tyr -11,1% (*S. enteritidis*, *S. infantis*) и Asp87Gly - 8,3% (*S. enteritidis*). У одного штамма *S. kentucky* с устойчивостью высокого уровня (МПК ципрофлоксацина выше 8,0 мг/л) выявлены одновременно две замены Ser83Phe и Asp87Asn. Два штамма (*S. typhimurium* и *S. corvallis*) имели плазмидоопосредованную резистентность к хинолонам (ген *qnrS*). Устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра обнаружена у штаммов шести сероваров (1,6%). Выявлены гены бета-лактамаз расширенного спектра генетических групп CTX-M1 (10 штаммов сероваров *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. abony*, *S. coeln* и *S. virchow*), CTX-M2 (2 штамма *S. typhimurium*), CTX-M9 (три штамма *S. enteritidis*), у одного штамма *S. typhimurium* выявлены одновременно CTX-M1 и CTX-M2. У двух штаммов (*S. newport* и *S. enteritidis*) обнаружены гены цефалоспориноазы молекулярного класса C CMY-2. Наше исследование показало, что в Санкт-Петербурге штаммы *Salmonella*, ведущего возбудителя острых кишечных инфекций бактериальной этиологии у детей и взрослых, характеризуются устойчивостью к антибиотикам, используемым для лечения сальмонеллезов.

Ключевые слова: *Salmonella*; резистентность; хинолоны; цефалоспорины; БЛРС; AmpC, бета-лактамазы; *gyrA*; *qnrS*.

Для цитирования: Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Забровская А.В., Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Останкова Ю.В., Лихачев И.В., Сатосова Н.В., Кицбабашвили Р.В., Смирнова Е.В., Семченкова Л.И., Быстрая Т.Е., Сокольник С.Е., Уткина Н.П., Сихандо Л.Ю. Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014–2018 гг. в Санкт-Петербурге, Россия. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 620–626. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-620-626>

Egorova S.A.¹, Kaftyreva L.A.^{1,2}, Suzhaeva L.V.¹, Zabrovskaya A.V.¹, Voitenkova E.V.¹, Matveeva Z.N.¹, Ostantkova Y.V.¹, Likhachev I.V.¹, Satosova N.V.², Kitsbabashvili R.V.³, Smirnova E.V.⁴, Semchenkova L.I.⁴, Bystraya T.E.⁴, Sokol'nik S.E.⁵, Utkina N.P.⁵, Sikhando L.Y.⁵

ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND CLINICAL SIGNIFICANT RESISTANCE MECHANISMS OF *SALMONELLA* ISOLATED IN 2014–2018 IN ST. PETERSBURG, RUSSIA

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, 191015, Saint-Petersburg, Russia;

³ANO «Medical Center XXI Century», 194044, Saint-Petersburg, Russia;

⁴FBUZ «Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg», division № 3, 192012, Saint-Petersburg, Russia;

⁵FBUZ «Center for Hygiene and Epidemiology in St. Petersburg», division № 6, 198329, Saint-Petersburg, Russia

The article presents the results of antimicrobial resistance monitoring of *Salmonella* isolated from children and adults with diarrhea in St. Petersburg in 2014–2018. In 746 isolates of 42 serovars more than 90,0% belonged to three: *S. enteritidis* (79,6%), *S. typhimurium* (6,8%) and *S. infantis* (3,8%). The antimicrobial susceptibility testing (according to the EUCAST) to 7 classes of antimicrobials revealed the resistance in 78,6% of *Salmonella*. Low-level quinolone resistance (MIC of ciprofloxacin 0,12–0,5 mg/l) was detected in 63,3% isolates (*S. enteritidis* -71,0%, *S. typhimurium* - 15,7%, *S. infantis* - 89,3%) and was due to five kinds of single nucleotide substitutions in *gyrA*: Asp87Tyr - 36,1% of studied isolates (only *S. infantis*); Ser83Phe - 22,2% (only *S. enteritidis*); Asp87Asn - 19,4% (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. hadar*, *S. newport*); Ser83Tyr -11,1% (*S. enteritidis* and *S. infantis*) and Asp87Gly - 8,3% (only *S. enteritidis*). Only in one *S. kentucky* isolate with high-level fluoroquinolone resistance (MIC

of ciprofloxacin > 8,0 mg/l) two substitutions (Ser83Phe and Asp87Asn) were detected. Two *Salmonella* isolates (*S. typhimurium* and *S. corvallis*) had plasmid-mediated quinolone resistance (*qnrS*). Extended-spectrum cephalosporin resistance was found in 6 *Salmonella* serovars (1,6%). The *bla*-genes were detected: of genetic group CTX-M1 – in 10 isolates (serovars *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. abony*, *S. coeln* and *S. virchow*), CTX-M2 – in 2 *S. typhimurium* isolates, CTX-M9 – in three *S. enteritidis* isolates. In one *S. typhimurium* CTX-M1 and CTX-M2 were detected. The gene of CMY-2 (molecular class C cephalosporinase) was revealed in two isolates (*S. newport* and *S. enteritidis*). Our study showed that *Salmonella* (the main bacterial pathogen of acute diarrhea in children and adults) isolated in Saint-Petersburg had antimicrobial resistance to drugs of choice for salmonellosis treatment.

Key words: *Salmonella*; resistance; quinolones; cephalosporins; ESBL; AmpC; beta-lactamases; *gyrA*; *qnrS*.

For citation: Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Zabrovskaya A.V., Voitenkova E.V., Matveeva Z.N., Ostankova Y.V., Likhachev I.V., Satosova N.V., Kitsbabashvili R.V., Smirnova E.V., Semchenkova L.I., Bystraya T.E., Sokol'nik S.E., Utkina N.P., Sikhando L.Y. Antimicrobial resistance and clinical significant resistance mechanisms of *Salmonella* isolated in 2014-2018 in St. Petersburg, Russia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (10): 620-626 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-620-626>

For correspondence: Egorova S.A., PhD, senior researcher of laboratory of enteric infections; e-mail: 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>; ResearcherID: K-2708-2014

Suzhaeva Lyudmila V. <https://orcid.org/0000-0001-7292-9933>;

Zabrovskaya Anna V., <https://orcid.org/0000-0003-2655-7555>

Voitenkova Elena V., <https://orcid.org/0000-0001-7702-2492>;

Matveeva Zoya N., <https://orcid.org/0000-0002-7173-2255>;

Ostankova Yulia V., <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>, ResearcherID: G-4252-2017

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 01.10.2019
Accepted 08.10.2019

Введение. Несмотря на то, что в РФ в последние 10 лет заболеваемость сальмонеллезом снижается (с 35,2 на 100 тыс. населения в 2009 г. до 22,9 в 2018 г.), ежегодно регистрируют около 50 тыс. случаев заболеваний сальмонеллезом, причем в 2018 г. зарегистрировано 83 очага групповых заболеваний с общим количеством пострадавших более 2 000 человек, из которых около 70,0% составляли дети [1]. В перечне антимикробных препаратов (АМП), которые могут быть использованы для лечения сальмонеллезов, препаратами выбора являются фторхинолоны и цефалоспорины расширенного спектра (ЦРС) [2-6]. Эффективная антибактериальная терапия осложняется наличием в популяции *Salmonella* штаммов, устойчивых к рекомендованному АМП. В странах ЕС в 2017 г. у *Salmonella* отмечены высокие показатели резистентности к сульфаниламидам (32,8%), тетрациклам (30,2%) и аминопенициллинам (27,5%), а также множественной устойчивости к АМП (3 и более класса АМП) (28,6%) [7]. Доля штаммов, устойчивых к фторхинолонам и ЦРС в целом была относительно невысокой (13,0 и 1,9%, соответственно), хотя выявлены значительные серовароспецифические отличия [7]. Анализ и сравнение данных, полученных в РФ в разные годы, затруднены тем обстоятельством, что критерии интерпретации и методические подходы к тестированию многих АМП в последние годы неоднократно менялись не только в РФ, но и в мире. Документ, регламентирующий процедуру определения чувствительности микроорганизмов к АМП (МУК 4.2.1890-04), был принят в нашей стране в 2004 г., основан на рекомендациях CLSI и является действующим в настоящее время [8]. В 2014 г. были введены Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (в дальнейшем по тексту – КР), основанные

на рекомендациях EUCAST [9]. По данным различных авторов на отдельных территориях РФ в разные годы доля штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, составляла от 0 до 45,3%, фторхинолонам – от 0 до 59,2% [10-20]. Целью проведенного нами исследования была оценка чувствительности штаммов *Salmonella*, выделенных в рамках пятилетнего мониторинга в Санкт-Петербурге, к АМП с использованием современных международных подходов, а также выявление механизмов резистентности к клинически значимым группам АМП.

Материал и методы. Изучены 746 штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014-2018 гг. из проб испражнений детей и взрослых, обследованных по различным показаниям (больные ОКИ, контактные, декретированные лица). Видовая идентификация штаммов проведена методом время-пролетной масс-спектрометрии на приборе Microflex LRF (Bruker Daltonics, Германия), идентификация до серовара – в реакции агглютинации на стекле с диагностическими сальмонеллезными адсорбированными сыворотками (ФГУП СПбНИИВС ФМБА РФ). Список АМП, использованных для тестирования, соответствовал европейским рекомендациям [21] и включал бета-лактамы (ампициллин, амоксициллин/клавулановая кислота, цефтазидим, цефотаксим, меропенем), хинолоны (налиндиксовая кислота, пefлоксацин, цiproфлоксацин), аминогликозиды (гентамицин, тобрамицин, амикацин), нитрофурантоин, тетрациклин, хлорамфеникол и триметоприм/сульфаметоксазол. Тестирование проводили диско-диффузионным методом с использованием дисков и агара Мюллера-Хинтона (Oxoid, Великобритания) согласно КР [9]. Для оценки чувствительности к хинолонам использовали комплексный подход: скрининг устойчивых штаммов диско-диффузионным методом с

налидиксовой кислотой и пепфлоксацином, определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) ципрофлоксацина методом микроразведений в бульоне. Продукцию бета-лактамаз молекулярных классов А и С подтверждали фенотипически, оценивая их чувствительность к ингибиторам с использованием набора реагентов “ESBL+AmpC Screen Kit” (Rosco Diagnostica, Дания) согласно руководству EUCAST [22]. Бактериальную ДНК выделяли с помощью реагента InstaGen Matrix (BioRad, США). Детекцию генов бета-лактамаз, а также *qnr*(A,B,S,C,D) и *aac*-(6')-Ib проводили, используя опубликованные праймеры [23-28], методом ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов амплификации с красителем SYBR GREEN с анализом кривых плавления. У 36 штаммов оценили характер мутаций в гене *gyrA* путем амплификации и прямого секвенирования QRDR-региона согласно опубликованному протоколу [29]. Секвенирование по Сенгеру проводили с использованием Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали в программе BLAST с референсной последовательностью гена *gyrA* штамма *S. typhimurium* LT2 (GenBank CP014051.2). 95% доверительные интервалы долей (95%ДИ) рассчитаны по методу Уилсона.

Результаты. Чувствительность штаммов *Salmonella* к АМП. Антигенная структура включенных в исследование штаммов была представлена 42 сероварами. Доминирующее положение занимал серовар *S. enteritidis*, доля которого в разные годы колебалась незначительно и в среднем составила 79,6% (95%ДИ 76,6-82,4). На долю сероваров *S. typhimurium* и *S. infantis* приходилось 6,8% (95%ДИ 5,2-8,9) и 3,8% (95%ДИ 2,6-5,4), соответственно. Другие серовары были представлены единичными штаммами (9,8%; 95%ДИ 7,9-12,1).

Результаты изучения чувствительности штаммов к АМП представлены в таблице. Устойчивость к 1 и более классу АМП отмечена у 78,6% исследованных штаммов: *S. enteritidis* – 85,0%, *S. typhimurium* – 60,8%, *S. infantis* – 89,3%. Следует отметить, что у других сероваров доля устойчивых штаммов была достоверно ниже (34,2%), чем у трех ведущих. Наиболее высокие показатели устойчивости штаммов *Salmonella* отмечены в отношении фторхинолонов и нитрофуранов: 63,3 и 57,8% штаммов, соответственно. Причем доля устойчивых штаммов была достоверно выше у сероваров *S. enteritidis* (71,0 и 66,2%) и *S. infantis* (89,3 и 82,1%), большинство штаммов которых имели сочетанную резистентность к этим двум группам АМП. Устойчивость к аминопенициллинам выявлена у 5,6% штаммов, и достоверно выше отмечена у серовара *S. typhimurium* (41,2%). Выявлено 12 штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС (1,6%), достоверной разницы в зависимости от серовара не обнаружено. Для тетрациклина и триметоприм/сульфаметоксазола при относительно невысоких долях устойчивых штаммов (13,0 и 6,3%, соответственно), отмечены достоверно более высокие показатели у штаммов *S. infantis* (78,6 и 60,7%) и *S. typhimurium* (37,3 и 17,6%). Устойчивость к аминогликозидам выявлена у 1,1% штаммов (достоверно выше у *S. typhimurium*, чем у *S. enteritidis*), к хлорамфениколу – 4,8% (без достоверных различий в сероварах). Множественная устойчивость к АМП выявлена у 13,0% штаммов, но у серовара *S. infantis* доля достигала 82,1% (достоверно выше, чем у других сероваров), *S. typhimurium* – 19,6%. Большинство полирезистентных штаммов (63,6%) были устойчи-

вы к 4 классам АМП, профили устойчивости включали хинолоны, нитрофураны и тетрациклины в сочетании с дополнительным классом АМП. Около половины (43,6%) полирезистентных штаммов серовара *S. enteritidis* характеризовались идентичным профилем: устойчивостью к хинолонам, нитрофуранам, тетрациклину и хлорамфениколу. Профиль множественной резистентности, наиболее характерный для *S. infantis* (56,5% штаммов), включал хинолоны, нитрофураны, тетрациклин и триметоприм/сульфаметоксазол. Выявлены три штамма *Salmonella*, устойчивые к шести классам АМП (*S. typhimurium*, *S. bredeney*).

Механизмы резистентности штаммов *Salmonella* к бета-лактамам АМП. Из 42 штаммов, устойчивых к аминопенициллинам, 21 штамм принадлежал к серовару *S. typhimurium* (41,2% штаммов этого серовара), 13 штаммов – *S. enteritidis* (2,2%), 2 штамма – *S. infantis* (7,1%), 3 штамма – *S. kentucky* (из 5 изученных штаммов данного серовара), 2 штамма – *S. bredeney* (из 5 штаммов) и 1 штамм – *S. london* (из 3 штаммов). Детекция механизма резистентности у штаммов, устойчивых к аминопенициллинам, не требовала выполнения дополнительных фенотипических тестов, в ходе молекулярного исследования у 38 штаммов (90,5%) выявлены гены *bla*_{TEM-1}; гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз генетических семейств SHV, OXA и PSE, не обнаружены.

Механизмы резистентности к ЦРС изучили у 18 штаммов, устойчивых к индикаторным препаратам из этой группы (цефтазидиму и цефотаксиму): *S. enteritidis* (7 штаммов), *S. typhimurium* (6 штаммов), *S. abony* (1 штамм), *S. coeln* (1 штамм), *S. virchow* (1 штамм), *S. newport* (1 штамм), *Salmonella* 1,4,12:i:- (1 штамм). Кроме 12 устойчивых штаммов, выделенных в 2014-18 гг., в исследование включили шесть штаммов, обнаруженных в период с 2002 по 2013 гг. У 16 штаммов результат подтверждающего фенотипического теста (синергизм ЦРС с клавулановой кислотой) указывал на продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), у этих штаммов выявлены гены, кодирующие БЛРС генетического семейства CTX-M трех генетических групп: *bla*_{CTX-M1} (10 штаммов сероваров *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. abony*, *S. coeln* и *S. virchow*), *bla*_{CTX-M2} (2 штамма *S. typhimurium*), *bla*_{CTX-M9} (три штамма *S. enteritidis*), у одного штамма *S. typhimurium* выявлены одновременно *bla*_{CTX-M1} и *bla*_{CTX-M2}. У двух штаммов (*S. newport* и *S. enteritidis*) результат подтверждающего фенотипического теста (синергизм ЦРС с клоксациллином) свидетельствовал о продукции цефалоспориноаз AmpC, молекулярные исследования выявили ген *bla*_{CMY-2}. Все штаммы *Salmonella*, продуцирующие БЛРС и AmpC, имели множественную резистентность: наиболее часто – к хинолонам (12 штаммов) и нитрофуранам (11). Два штамма *S. typhimurium* оставались чувствительны только к карбапенемам.

Механизмы резистентности штаммов *Salmonella* к хинолонам. Устойчивость к хинолонам выявлена у 472 штаммов (63,3%) и характеризовалась низким уровнем (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,25 мг/л). Обнаружен один штамм *S. kentucky* с высоким уровнем устойчивости (МПК ципрофлоксацина более 8,0 мг/л). У всех штаммов, за исключением двух, результаты скрининга диско-диффузионным методом (устойчивость к налидиксовой кислоте и пепфлоксацину) свидетельствовали о хромосомном механизме резистентности. У двух штаммов «парадоксальный» фенотип резистентности к хинолонам

(устойчивость к ципрофлоксацину и пefлоксацину, но чувствительность к налидиксовой кислоте) указывал на плазмидоопосредованный механизм. Детекцию мутаций в хромосомном гене *gyrA* провели у 36 штаммов, выявлены пять видов однонуклеотидных замен в 83 и 87 кодонах: Asp87Tyr – у 36,1% изученных штаммов (*S. infantis*); Ser83Phe – 22,2% (*S. enteritidis*); Asp87Asn – 19,4% (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. hadar*, *S. newport*); Ser83Tyr – 11,1% (*S. enteritidis*, *S. infantis*) и Asp87Gly – 8,3% (*S. enteritidis*). У штамма *S. kentucky* с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам выявлены одновременно две замены Ser83Phe и Asp87Asn. Серовар *S. enteritidis* характеризовался наибольшим разнообразием мутаций (4 из 5 выявленных), наиболее характерна Ser83Phe (13 из 17 исследованных штаммов). Серовар *S. infantis* был представлен в основном штаммами с заменой Asp87Tyr (13 из 15 штаммов). Частота выявления тех или иных однонуклеотидных замен во многом определялась выборкой штаммов, которая была представлена в основном сероварами *S. enteritidis* и *S. infantis*. У всех 746 штаммов провели поиск генов, ответственных за реализацию описанных у *Salmonella* плазмидоопосредованных механизмов резистентности к хинолонам: механизм защиты мишени (гены *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* и *qnrD*) и механизм ферментной инактивации антибиотика (ген *aac-(6)-Ib*). У двух штаммов (*S. typhimurium* и *S. corvallis*) с «парадоксальным» фенотипом резистентности к хинолонам обнаружен ген *qnrS*.

Обсуждение. Во всех странах среди большого разнообразия выделяемых сероваров доминируют *S. enteritidis* и *S. typhimurium* (в странах ЕС в 2017 г. два этих серовара, включая монофазный вариант *S. typhimurium*, обуславливали около 80,0% случаев сальмонеллезов), *S. infantis* занимают 3-4 место в зависимости от региона [7]. В РФ доля этих сероваров колеблется ежегодно незначительно и составляет для *S. enteritidis*, *S. typhimurium* и *S. infantis* 70,0-80,0%, 2,0-7,0% и 5,0-9,0%, соответственно [1,30]. Результаты пятилетнего мониторинга антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella* подтвердили циркуляцию глобально распространенных сероваров в Санкт-Петербурге в 2014-2018 гг., где на их суммарную долю приходилось более 90,0% выделенных от людей штаммов при доминировании *S. enteritidis* (79,6%).

Практически 8 из 10 штаммов *Salmonella*, выделенных в Санкт-Петербурге в последние пять лет, характеризовались устойчивостью к различным классам АМП, причем резистентность отмечена в значительно большей степени у штаммов трех ведущих сероваров, чем у редко выделяемых. Заслуживают особого внимания высокие показатели клинически значимой резистентности к АМП, рекомендованным для лечения сальмонеллезов. Устойчивость к фторхинолонам (препаратам выбора при генерализованных, осложненных и тяжелых формах сальмонеллеза) выявлена у 63,3% штаммов, нитрофуранам (широко используемым для лечения ОКИ) – 57,8%. Удельный вес штаммов, устойчивых к ЦРС (препаратам для лечения тяжелых и осложненных форм сальмонеллеза у детей и лиц с тяжелыми сопутствующими заболеваниями), был невысоким (12 штаммов, 1,6%), но это значительно больше, чем в 2003-2005 гг., когда при исследовании более 1000 штаммов в Санкт-Петербурге были обнаружены только два устойчивых к ЦРС (0,2%) [21]. Устойчивость к АМП, не используемым в настоящее время для лечения ОКИ (включая сальмонеллезы),

отмечена у штаммов *Salmonella* значительно реже, чем к фторхинолонам и нитрофуранам. Устойчивость к тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу, выявляемая достоверно чаще у штаммов *S. infantis*, являлась частью фенотипа множественной устойчивости, характерной для этого серовара. Учитывая тот факт, что *S. infantis* – один из ведущих сероваров, к которому относятся штаммы, выделяемые из пищевых продуктов и от сельскохозяйственных животных, высокие показатели устойчивости ко многим АМП связаны с использованием антибиотиков в ветеринарии и животноводстве, которое способствует приобретению и сохранению в штаммах этого серовара различных детерминант резистентности. Выявлены серовароспецифические особенности резистентности к АМП: для штаммов доминирующего серовара *S. enteritidis* характерны высокие показатели устойчивости к хинолонам (71,0% штаммов) и нитрофуранам (66,2%). У штаммов *S. typhimurium* отмечена высокая доля штаммов, устойчивых ко многим классам АМП (до 40,0% к ампициллину), самая высокая доля устойчивых к ЦРС штаммов (5,9%), каждый пятый штамм имел фенотип множественной резистентности. Серовар *S. infantis* отличался чрезвычайно высокой долей штаммов с множественной устойчивостью (82,1%), спектр которой включал клинически значимые АМП. Подобные серовароспецифические отличия отмечены и в странах Евросоюза [7,31]. В ходе нашего исследования обнаружены бета-лактамазы, наиболее часто выявляемые в мире у штаммов *Salmonella* [31, 33]. Устойчивость к аминопенициллинам была обусловлена продукцией бета-лактамазы TEM-1. Штаммы, устойчивые к ЦРС, продуцировали БЛРС генетических групп СТХ-M1,-2 и 9, а также цефалоспорины молекулярного класса С генетической группы СМУ-2. Рекомендованный EUCAST алгоритм фенотипической детекции [22] показал высокую достоверность при детекции и дифференциации ферментов БЛРС и AmpC.

Устойчивость к фторхинолонам характеризовалась низким уровнем, что затрудняло фенотипическую детекцию таких штаммов, требовало комплексного подхода к определению чувствительности *Salmonella* и интерпретации результатов согласно современным методическим рекомендациям. Включение диска с налидиксовой кислотой в алгоритм скрининга позволило не только достоверно выявить устойчивые штаммы, но и фенотипически дифференцировать механизмы устойчивости. По данным литературы устойчивость к хинолонам у подавляющего большинства штаммов *Salmonella* обусловлена хромосомными механизмами, плазмидоопосредованные встречаются редко [31-33]. В нашем исследовании у штаммов *Salmonella* выявлены пять вариантов однонуклеотидных замен в гене *gyrA* (Ser83Phe, Ser83Tyr, Asp87Tyr, Asp87Asn, Asp87Gly). Обнаружение штаммов *S. infantis* с редко выявляемой у *Salmonella* мутацией Asp87Tyr может свидетельствовать о циркуляции клональной линии этого серовара в Санкт-Петербурге. Выявленный в ходе исследования штамм *S. kentucky* с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам, обусловленной двумя хромосомными мутациями, может относиться к циркулирующему в мире клону *S. kentucky* ST198.

Сравнение наших результатов с данными, полученными в странах Евросоюза, показало, что устойчивости к фторхинолонам у штаммов *Salmonella* в Санкт-Петербурге почти в пять раз превышает европейские

Устойчивость к антибиотикам штаммов *Salmonella* в Санкт-Петербурге в 2014-18 гг. (доля устойчивых штаммов)

Фенотип	Всего (n=746)			<i>S. enteritidis</i> (n=594)			<i>S. typhimurium</i> (n=51)			<i>S. infantis</i> (n=28)			Другие серовары (n=73)		
	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ	n	%	95% ДИ
Чувствительный	160	21,4	18,7-24,5	89	15,0	12,3-18,1	20	39,2	21,0-52,9	3	10,7	3,7-27,2	48	65,8	54,3-75,6
Устойчивый	586	78,6	75,5-81,3	505	85,0	81,9-87,7	31	60,8	47,1-73,0	25	89,3	72,8-96,3	25	34,2	24,4-45,7
Клинически значимая устойчивость к:															
Цефалоспори- нам расширен- ного спектра	12	1,6	0,9-2,8	8	1,3	0,7-2,6	3	5,9	2,0-15,9	0	0	0-12,1	1	1,4	0,2-7,4
Фторхиноло- нам	472	63,3	59,8-66,7	422	71,0	67,3-74,5	8	15,7	8,2-28,0	25	89,3	72,8-96,3	17	23,3	15,1-34,2
Множествен- ная	97	13,0	10,8-15,6	55	9,3	7,2-11,9	10	19,6	11,0-32,5	23	82,1	64,4-92,1	9	12,3	6,6-21,8
Устойчивость к другим антимикробным препаратам:															
Аминопени- циллинам	42	5,6	4,2-7,5	13	2,2	1,3-3,7	21	41,2	28,8-54,8	2	7,1	2,0-22,6	6	8,2	3,8-16,8
Аминоглико- зидам	8	1,1	0,5-2,1	3	0,5	0,2-1,5	9	17,6	3,6-30,3	1	3,6	0,6-17,7	2	2,7	0,8-9,5
Триметоприм/ сульфаметок- сазолу	47	6,3	4,8-8,3	17	2,9	1,8-4,5	9	17,6	9,6-30,3	17	60,7	42,4-76,4	4	5,5	2,2-13,3
Хлорамфени- колу	36	4,8	3,5-6,6	28	4,7	3,3-6,7	4	7,8	3,1-18,5	0	0	0-12,1	4	5,5	2,2-13,3
Тетрацикли- нам	97	13,0	10,8-15,6	45	7,6	5,7-10,0	19	37,3	25,3-51,0	22	78,6	60,5-89,8	11	15,1	8,6-25,0
Нитрофуран- ам	431	57,8	54,2-61,3	393	66,2	62,3-69,9	3	5,9	2,0-15,9	23	82,1	64,4-92,1	12	16,4	9,7-26,6

показатели (63,3 и 13,0% штаммов, соответственно) [7]. Устойчивость к ЦРС была сопоставима: 1,6% штаммов в Санкт-Петербурге и 1,9% – в странах Евросоюза. Несмотря на то, что в Санкт-Петербурге множественная устойчивость отмечена реже (13,0% штаммов по сравнению с 28,6%), тем не менее, у штаммов серовара *S. infantis* она достигала 82,1% штаммов по сравнению с 39,4% в странах Евросоюза. Такая разница обусловлена тем, что в РФ основной вклад в суммарные показатели устойчивости *Salmonella* вносит серовар *S. enteritidis*, тогда как в странах Евросоюза спектр выделяемых сероваров значительно шире и доля *S. enteritidis* не превышала 50,0% в 2017 г. [34].

Локализация детерминант резистентности обуславливает различия в показателях устойчивости штаммов различных сероваров. Гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз, локализованы на плазмидах, что позволяет им распространяться в штаммах вне зависимости от вида микроорганизма и серовара: так, устойчивость к ЦРС отмечена у штаммов различных сероваров. Напротив, устойчивость к хинолонам, обусловленная хромосомными мутациями, выявленная с высокой частотой у штаммов двух сероваров (*S. enteritidis* и *S. infantis*), вероятно является следствием клонального распространения в Санкт-Петербурге нескольких генетических линий, что косвенно подтверждается идентичными профилями множественной резистентности и идентичностью хромосомных мутаций у большинства штаммов *S. enteritidis* и *S. infantis*.

В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения опубликовала список резистентных бактерий, представляющих угрозу для здоровья человека и требующих неотложной разработки новых АМП [35]. *Salmonella*, устойчивые к фторхинолонам (доля которых в Санкт-Петербурге превышает 60,0%), отнесены к высокому

уровню приоритетности. Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella*, выделенных от человека, сельскохозяйственных животных, пищевых продуктов и внешней среды, должен быть неотъемлемой частью эпидемиологического надзора за сальмонеллезом в РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (4–7, 13, 20–28, 31–35
см. REFERENCES)

- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2019. 254 с. Available at: <https://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf>
- Андреева И.В., Стецюк О.У. Отпуск без проблем: современные подходы к профилактике и лечению диареи путешественников. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 20(3):172-80.
- 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>
- Методические указания «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». МУК 4.2.1890-04. Утверждено Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200038583>
- Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>

10. Ахметова Л.И., Розанова С.М. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов шигелл и сальмонелл, выделенных в Екатеринбурге. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2(3): 58-62.
11. Милутина Л.Н., Гурьева О.В. Эволюция лекарственной резистентности сальмонелл, выделенных от детей, и ее клиническая значимость. *Лаборатория*. 2011; 3: 5-7.
12. Шитова О.И., Казьянин А.В., Захарова Ю.А. Эпидемиологические особенности, биологическая характеристика и чувствительность к антимикробным препаратам сальмонелл, циркулирующих в Пермском крае. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26(2):116-20.
14. Елиусизова А.Б., Шубин Ф.Н., Кузнецова Н.А., Бахолдина С.И. Чувствительность к фторхинолонам сальмонелл в Сибири и на Дальнем Востоке. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; 4: 51-4.
15. Халиуллина С.В., Анохин В.А., Герасимова Е.С., Леонтьева Н.С., Малышева Л.М., Гутор И.А. Антибиотикорезистентность современных возбудителей внебольничных бактериальных кишечных инфекций у детей. *Практическая медицина*. 2010; 1(40): 85-8.
16. 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.
17. Решетнева И.Т., Перьянова О.В., Дмитриева Г.М., Остапова Т.С. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных на территории Красноярского края. *Гигиена и санитария*. 2015; 94 (2): 35-8.
18. Евмененкова И.Г., Мурач Л.В. Анализ резистентности штаммов *Salmonella* spp. к антибиотикам в Смоленском регионе за 2012-2017 гг. *Смоленский Медицинский Альманах*. 2018; 1: 93-6.
19. Кузнецова Н.А., Соловьева А.С., Раков А.В. Чувствительность к антибиотикам у штаммов *Salmonella Enteritidis*, циркулирующих на территории Сибири и Дальнего Востока, поданным многолетнего мониторинга. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018; 3: 50-8.
29. Козырева В.К., Эйдельштейн М.В., Топальский Д.В., Азизов И.С., Козлов Р.С. Независимое приобретение резистентности к хинолонам у клонально-родственных нозокомиальных штаммов вследствие гипермутабельности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(2): 153-61.
30. Рожнова С.Ш., Акулова Н.К., Христюхина О.А. Этиологическая структура сальмонеллезов у детей раннего возраста. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 1(80): 56-8.
6. 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.
7. EFSA and ECDC, 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal*. 2019;17 (2):5598, 278 pp. Available at: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598>
8. Guidelines "Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms". MUK 4.2.1890-04. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200038583>. (in Russian)
9. Guidelines "Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms". Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>. (in Russian)
10. Ahmetova L.I., Rozanova S.M., Susceptibility to antimicrobials of Salmonellae and Shigellae isolated in Ekaterinburg. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2000; 2(3): 58-62. (in Russian)
11. 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)
12. Shitova O.I., Kaz'yanin A.V., Zakharova Yu.A. Epidemiological features, biological characteristics and antimicrobial susceptibility of Salmonella circulating in the Perm region. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 26(2):116-120. (in Russian)
13. Kozyreva V.K., Ilina E.N., Malakhova M.V., Carattoli A., Azizov I.S., Tapalski D.V. et al. Long-term dissemination of CTX-M-5-producing hypermutable Salmonella enterica serovar typhimurium sequence type 328 strains in Russia, Belarus, and Kazakhstan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(9): 5202-10.
14. Eliusizova A.B., Shubin F.N., Kuznetsova N.A., Bakholdina S.I. Fluoroquinolone susceptibility of Salmonella in Siberia and the Far East. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; 4: 51-4. (in Russian)
15. Khaliullina S.V., Anokhin V.A., Gerasimova E.S., Leont'eva N.S., Malysheva L.M., Gutor I.A. Antimicrobial resistance of modern pathogens of community-acquired bacterial intestinal infections in children. *Prakticheskaya meditsina*. 2010; 1(40): 85-8. (in Russian)
16. 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)
17. Reshetneva I.T., Per'yanova O.V., Dmitrieva G.M., Ostapova T.S. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated in the Krasnoyarsk Territory. *Gigiena i sanitariya*. 2015; 94 (2): 35-8. (in Russian)
18. Evmenenkova I.G., Murach L.V. Analysis of resistance of strains of salmonella spp. To antibiotics in the Smolensk region for 2012-2017. *Smolenskiy Meditsinskiy Al'manakh*. 2018; 1: 93-6. (in Russian)
19. Kuznetsova N.A., Solovyeva A.C., Rakov A.V. Antibiotic resistance of Salmonella Enteritidis strains, circulated in territory of the Siberia and Far East, at multi-year monitoring. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2018; 3: 50-8. (in Russian)
20. European Centre for Disease Prevention and Control. EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human Salmonella and Campylobacter isolates – June 2016. Stockholm: ECDC; 2016. Available at: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-Salmonella-Campylobacter-harmonised-monitoring.pdf>
21. 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.
22. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017-07-11). Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
23. Dallenne C., Da Costa A., Decré D., Favier C., Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(3): 490-5.
24. Weill F.X., Fabre L., Grandry B., Grimont P.A.D., Casin I. Multiple-antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B

REFERENCES

1. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018: State report. M.: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-Being; 2019. 254p. Available at: https://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno_epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf. (in Russian)
2. Andreeva I.V., Stetsiuk O.U. Current approaches to prophylaxis and treatment of travelers' diarrhea. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 20(3):172-80. (in Russian)
3. Guidelines for treatment of salmonellosis in children. Available at: <http://niidi.ru/dotAsset/6501246b-27f5-4d17-964d-7dc4defb8b43.pdf>. (in Russian)
4. 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.
5. 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. Gastroent. Nutr.* 2014;59(1):132-52.

- isolates collected in France between 2000 and 2003 is due mainly to strains harboring Salmonella genomic islands 1, 1-B, and 1-C. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(7): 2793-2801.
25. Robicsek A., Strahilevitz J., Sahm D.F., Jacoby G.A., Hooper D.C. Qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(8): 2872-4.
 26. Cavaco L., Hasman H., Xia S., Aarestrup F. qnrD, a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in Salmonella enterica Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(2):603-8.
 27. Wang M., Guo Q., Xu X., Wang X., Ye X., Wu S., et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(5):1892-7.
 28. Park C.H., Robicsek A., Jacoby G.A., Sahm D., Hooper D.C. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(11): 3953-5.
 29. Kozyreva V.K., Edelstein M.V., Tapalski D.V., Azizov I.S., Kozlov R.S. Independent Acquisition of Quinolone Resistance in Clonally Related Nosocomial Strains of Salmonella Typhimurium Due to Hypermutability. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2012; 14(2):153-161. (in Russian)
 30. Rozhnova S.Sh., Akulova N.K., Khristukhina O.A. Etiological Structure Salmonellosis in toddlers. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2015; 1(80): 56-8. (in Russian)
 31. 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
 32. Tadesse G., Tessema T.S., Beyene G., Aseffa A. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant Salmonella in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2018; 13(2):e0192575.
 33. McDermott P.F., Tyson G.H., Kabera C., Chen Y., Li C., Folster J.P., et al. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal Salmonella. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60: 5515-20.
 34. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal.* 2018; 16(12):5500, 262.
 35. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News Release 27.02.2017. Available at <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Поступила 01.10.2019
Принята к печати 08.10.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Бурнашов С. И., Шипицына И. В., Осипова Е. В.

МИКРОФЛОРА ОПЕРАЦИОННЫХ РАН И СВИЩЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ БОЛЬШЕБЕРЦОВОЙ КОСТИ ДО РЕКОНСТРУКТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ, ПРИ РЕЦИДИВЕ ИНФЕКЦИИ

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г. А. Илизарова Минздрава РФ», 640014, Курган, Россия

Актуальность микробиологического мониторинга при хроническом остеомиелите большеберцовой кости, развившегося на фоне лечения переломов пластиной, связана с заметным расширением видового состава микрофлоры.

Проведено микробиологическое исследование материала, взятого из ран, из свищей и из очага воспаления у 49 пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости, развившегося на фоне лечения переломов пластиной. Пациентам выполняли секвестрнекрэктомию большеберцовой кости с последующим применением билочального последовательного компрессионно-дистракционного остеосинтеза или монолокального компрессионного остеосинтеза.

*У пациентов в период до реконструктивного лечения из мазков в монокультуре выделены 30 штаммов, остальные 30 – в составе 14-и двух- и трёхкомпонентных ассоциаций. Частота выделения штаммов *S. aureus* составила 55,3%, далее следовали коагулазонегативные стафилококки – 13,6% и представители семейства *Enterobacteriaceae* – 10,2%. Доля метициллинустойчивых штаммов *S. aureus* составила 11,8%, штаммов коагулазонегативных стафилококков (MRCоNS) – 6,8%.*

*Рецидивы заболевания наблюдали у 7 пациентов. Микрофлора отделяемого из свищей представлена монокультурами *S. aureus* и ассоциациями бактерий, в которых одним из компонентов являлись метициллинрезистентные штаммы *S. aureus*.*

*Отмечены различия в составе микробного пейзажа до реконструктивного лечения пациентов и при рецидиве инфекции. При рецидиве инфекции изменился видовой состав микрофлоры: у 2-х пациентов в ассоциации микроорганизмов и у 3-х - в монокультурах штаммы *S. aureus* приобрели резистентность к β-лактамам антибиотикам, появились новые ассоцианты, которых при первичных посевах отсутствовали. Видовой спектр микроорганизмов при хроническом остеомиелите большеберцовой кости, развившемся после накостного остеосинтеза пластиной, разнообразен и может меняться, что диктует необходимость проведения микробиологического мониторинга для выявления этиологической структуры возбудителей, контроля антибиотикорезистентности выделенных штаммов и рационального подхода к лечению пациентов*

Ключевые слова: хронический остеомиелит; большеберцовая кость; микробный пейзаж; биопленки, антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Бурнашов С.И., Шипицына И.В., Осипова Е.В. Микрофлора операционных ран и свищей у пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости до реконструктивного лечения, при рецидиве инфекции. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 627-631. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-627-631>

Burnashov S. I., Shipitsyna I. V., Osipova E. V.

MICROFLORA OF SURGICAL WOUNDS AND FISTULAS IN PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS OF THE TIBIA BEFORE RECONSTRUCTIVE TREATMENT, IN CASE OF RECURRENCE OF INFECTION

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» (FSBI «RISC RTO») of the RF Ministry of Health, 640014, Kurgan Russia

Relevance of microbiological monitoring in chronic osteomyelitis of the tibia developed during treatment of fractures with a plate is associated with a noticeable increase of various kinds of the microflora.

A microbiological study was conducted of pathological material taken from wounds, fistulas and from the focus of inflammation in 49 patients with chronic tibial osteomyelitis, developed during treatment of fractures with a plate. The patients underwent sequestrectomy of the tibia and subsequent application of bilocal consecutive compression-distraction osteosynthesis or monolocal compression osteosynthesis.

*Microbiological study of smears taken before the reconstructive treatment from fistulas and wounds of patients showed that in monoculture there were 30 strains, the remaining 30 – as a part of 14 two- and three-component associations. The frequency of *S. aureus* strains was 55.3%, followed by coagulase-negative staphylococcus – 13.6% and representatives of the family *Enterobacteriaceae* – 10.2%. There were methicillin-resistant strains of *S. aureus* in 11.8%, strains of coagulase-negative staphylococcus (MRCоNS) – 6.8%. Recurrence of the disease was observed in 7 patients. The microflora of the discharge from the fistula was represented by monocultures of *S. aureus* and associations of bacteria in which one of the components was methicillin-resistant strains of *S. aureus*. We observed differences in the contents of the microflora before reconstructive treatment of patients and in recurrence of infection. In case of recurrence of infection, the qualitative contents of the microflora changed: in 2 patients in the association of microorganisms and in 3 - in monocultures, *S. aureus* strains acquired resistance to β-lactam antibiotics, new associations appeared, which were not present in primary cultures before reconstructive treatment. The study showed that the spectrum of micro-organisms in chronic osteomyelitis of the tibia, developed after osteosynthesis with a plate, varied and is subject to change and that dictates the need for microbiological monitoring to detect the etiological structure of pathogens, monitoring of antibiotic resistance of the isolated strains and rational approach to treatment of patients.*

Key words: chronic osteomyelitis, tibia, microflora, biofilms, antibiotic resistance.

Для корреспонденции: Шипицына Ирина Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотр. научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии; e-mail: IVSchimik@mail.ru

For citation: Burnashov S.I., Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Microflora of surgical wounds and fistulas in patients with chronic osteomyelitis of the tibia before reconstructive treatment, in case of recurrence of infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (10): 627-631. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-627-631>

For correspondence: Shipitsyna I.V.; e-mail: IVSchimik@mail.ru

Information about authors:

Burnashov S.I., <http://orcid.org/0000-0001-7284-709X>

Shipitsyna I.V., <http://orcid.org/0000-0003-2012-3115>

Osipova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2408-4352>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 22.08.2019
Accepted 23.09.2019

Введение. Среди всех гнойных осложнений, возникающих после переломов длинных костей, лидирующие позиции занимает остеомиелит, при лечении которого важным этапом является купирование очага воспаления, и, в дальнейшем, восстановление целостности и опороспособности конечности с использованием различных методик [1-3]. В центре им. Г.А. Илизарова при лечении ложных суставов и дефектов большеберцовой кости, осложнённых остеомиелитом, развившегося вследствие погружного остеосинтеза, после санации гнойного очага, удаления инородных тел и нежизнеспособных некротизированных тканей, проводят реконструктивное лечение с использованием внеочаговой фиксации. В зависимости от величины дефекта и состояния мягких тканей применяют монолокальный компрессионный остеосинтез (МКО) или билокальный последовательный дистракционно-компрессионный остеосинтез (БПДКО) [4-6].

Интраоперационная санация раны и костной ткани с помощью различных способов антисептики, не всегда позволяет достичь полной стерильности даже при условии идеально выполненной операции. Как следствие, циркулирующие в организме популяции инфекционного агента могут вызвать рецидивы заболевания [1]. Наиболее важным фактором в развитии хронического остеомиелита является способность микроорганизмов формировать биоплёнки, что оказывает влияние на рецидивирующее течение, длительность воспалительного процесса и устойчивость к антибактериальным препаратам [2,7]. Ведущими возбудителями остеомиелита являются грамположительные кокки рода *Staphylococcus* spp., преимущественно *S. aureus*, и, реже, грамотрицательные микроорганизмы: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. [2, 8]. В структуре биоплёнок эти микроорганизмы могут быть представлены монокультурами и аэробно-анаэробными ассоциациями, при этом, состав микрофлоры изменяется в зависимости от формы, продолжительности заболевания, локализации повреждения [7, 9].

Актуальность микробиологического мониторинга при хроническом остеомиелите связана с заметным расширением видового состава микрофлоры [1; 2]. Участие бактерий, ранее считавшихся не способными вызывать заболевания у здорового человека, в развитии остеомиелитического процесса, открывает новые возможности для научно-обоснованного подхода к применению современных методов диагностики [1].

Цель исследования – проанализировать микробный

пейзаж ран у пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости до и после реконструктивного лечения, при рецидиве инфекции.

Материал и методы. Проведено микробиологическое исследование патологического материала, взятого из ран, из свищей (в дооперационном периоде) и из очага воспаления (во время операции) у 49 пациентов с хроническим остеомиелитом большеберцовой кости, развившегося на фоне лечения переломов пластиной. Пациентам выполняли секвестрнекрэктомию большеберцовой кости с последующим применением билокального последовательного компрессионно-дистракционного остеосинтеза (БПКДО) или монолокального компрессионного остеосинтеза (МКО). Средний возраст пациентов составил 41,6±13,1 года, 70% – мужчины. Сопутствующая патология не выявлена лишь у одной трети больных, почти у половины имелись заболевания сердечно-сосудистой системы, у каждого четвертого больного заболевания желудочно-кишечного тракта, у каждого седьмого – носительство вирусного гепатита В или С. Более двух трети пациентов прибыли на лечение уже инвалидами 2, 3 группы.

Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили традиционным методом и с использованием панелей для грамположительных (PBCPC20) и грамотрицательных микроорганизмов (NBC44) для бактериологического анализатора WalkAway-40 Plus («Siemens»). Определение антибиотикочувствительности проводили диско-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона; ряд штаммов тестировались на панелях PBCPC20, NBC44 (WalkAway-40 Plus, «Siemens»).

Результаты. При микробиологическом исследовании мазков, взятых из свищей и ран пациентов, выделено 60 изолятов, принадлежащих к 14 таксонам: *Staphylococcus aureus* (n=33), *Staphylococcus epidermidis* (n=5), *Staphylococcus haemolyticus* (n=1), *Staphylococcus hyicus* (n=1), *Staphylococcus intermedius* (n=1), *Enterococcus faecalis* (n=4), *Streptococcus* sp. (n=3), *Corynebacterium* sp. (n=2), *Serratia marcescens* (n=2), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3), *Klebsiella pneumoniae* (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1), *Candida* sp. (n=1).

В монокультуре выделены 30 штаммов, остальные 30 – в составе 14-и двух - или трёхкомпонентных ассоциаций: *S. aureus*+*S. hyicus* (n=1), MRSA+*P. aeruginosa* (n=2), *S. aureus*+*E. faecalis* (n=2), *S. aureus*+MRSE (n=1), *S. epidermidis* MRSE+*E. faecalis* (n=2), *S. aureus*+*E. cloacae* (n=1), *S. aureus*+*S. haemolyticus* MRSH+*Serratia marcescens* (n=1), *S. aureus*+*S. epidermidis*+*Serratia marc-*

Видовой состав микрофлоры операционных ран и свищевого отделяемого

Количество человек	Микрофлора операционных ран и отделяемого из свищей до реконструктивного лечения	Микрофлора свищевого отделяемого при рецидиве инфекции
n=1	<i>S. aureus</i>	MRSA+ <i>E. faecalis</i>
n=1	<i>S. aureus</i> + <i>E. cloacae</i>	MRSA+ <i>E. cloacae</i>
n=1	<i>S. aureus</i> + <i>K. pneumoniae</i>	MRSA
n=1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> + <i>Streptococcus</i> sp.
n=1	<i>S. aureus</i>	MRSA
n=1	<i>S. aureus</i>	MRSA
n=1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>

escens (n=1), *S. aureus*+*K. pneumoniae* (n=2), *S. aureus*+*P. mirabilis* (n=1).

Ведущие позиции в спектре возбудителей посттравматического хронического остеомиелита, развившегося после накостного остеосинтеза большеберцовой кости пластиной, занимают *S. aureus* – 55,3%, далее следуют коагулазонегативные стафилококки – 13,6% и представители семейства Enterobacteriaceae – 10,2% (см. рисунок). Доля метициллинустойчивых штаммов *S. aureus* составила 11,8%, штаммов коагулазонегативных стафилококков (MRCoNS) – 6,8%.

Отмечена высокая резистентность метициллинчувствительных штаммов стафилококков (MSS) к пенициллину (57,6%), эритромицину (75,7%), ко-тримоксазолу (83%). Наиболее эффективными в отношении MS – стафилококков являются β-лактамы антибиотики (100%), клиндамицин (95,1%), фторхинолоны (95,2%).

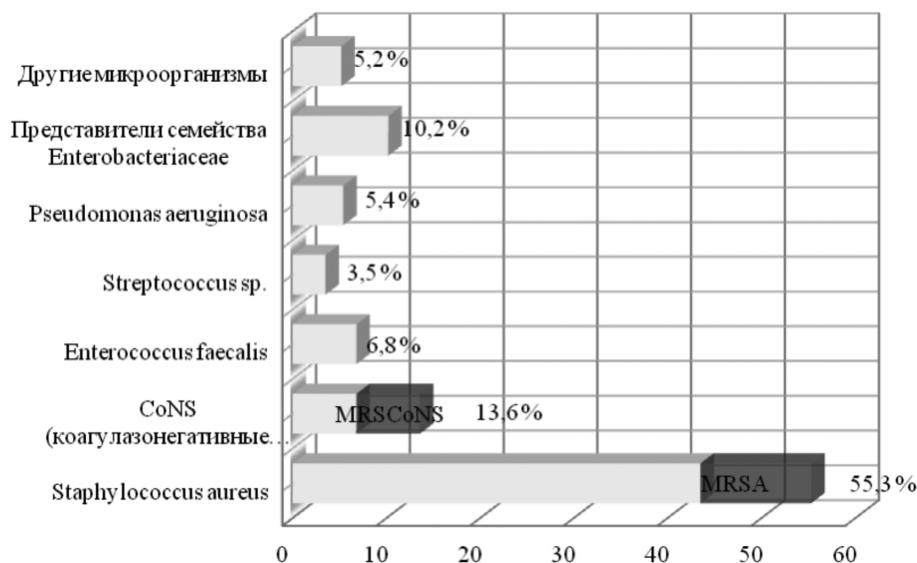
Метициллинрезистентные стафилококки (MRS) устойчивы к цефокситину (100%), ципрофлоксацину (81,8%), эритромицину (63,6%), гентамицину (45,5%), тетрациклину (36,4%). Наиболее эффективными в отношении MRS оказались фузидиевая кислота (100%), рифампицин (81,8%), ко-тримоксазол (81,8%), хлорамфеникол (81,2%), клиндамицин (72,7%).

Частота обнаружения *E. faecalis* составила 6,8%. Все штаммы чувствительны к ампициллину, линезолиду, пенициллину; 60% штаммов проявляли резистентность к стрептомицину и гентамицину; 40% - к левофлоксацину. Бактерии рода *Enterococcus* sp. выделены в ассоциации с *S. epidermidis* или *S. aureus*.

В отношении бактерий семейства Enterobacteriaceae наиболее эффективными являлись имипенем (66,7%), ципрофлоксацин (66,7%). Высокую резистентность наблюдали по отношению к ампициллину (83,3%), амоксицилаву (83,3%), гентамицину (66,7%), цефтазидиму (66,7%). Доля ассоциаций бактерий, в которые входили энтеробактерии составила 40%.

Неферментирующие грамотрицательные бактерии представлены только штаммами *P. aeruginosa*, чувствительными к амикацину (66,7%), цефтазидиму (66,7%), ципрофлоксацину (66,7%). Все штаммы резистентны к цефотаксиму, цефтриаксону; 66,7% - к гентамицину и пиперациллин/тазобактаму.

У 7 пациентов наблюдали рецидив остеомиелита, из них, у 4-х микрофлора свищевого отделяемого представлена монокультурами *S. aureus* (2 штамма MRSA), у 3-х – ассоциациями микроорганизмов: MRSA+*E. faecalis*, MRSA+*E. cloacae*, *S. aureus*+*Streptococcus* sp. При реци-



Видовая структура возбудителей хронического остеомиелита большеберцовой кости, развившегося после накостного остеосинтеза пластиной.

дике инфекции изменился видовой состав микрофлоры: у 2-х пациентов в составе ассоциации микроорганизмов и у 3-х - в монокультурах штаммы *S. aureus* приобрели резистентность к β -лактамам антибиотикам, появились новые ассоцианты, которых в первичных посевах до реконструктивного лечения не встречалось (см. таблицу).

Штаммы *S. aureus* устойчивы к пенициллину (100%), клиндамицину (85,7%), эритромицину (85,7%), цефокситину (71,4%), ко-тримоксазолу (57,1%). Эффективными антибиотиками в отношении данных микроорганизмов являлись ципрофлоксацин, гентамицин. В отношении штаммов *E. cloacae* эффективными были все антибиотики, используемые для данной группы бактерий. Высокую активность в отношении *E. faecalis* проявляли ампициллин, ципрофлоксацин, гентамицин. В отношении штаммов *Streptococcus* sp. эффективными являлись эритромицин, клиндамицин, хлорамфеникол, ванкомицин.

Пациенты с рецидивами гнойной инфекции и отсутствием сращения повторно прооперированы, у всех обследуемых достигнуто сращение и купирование гнойного процесса.

Обсуждение. Возбудителями хронического остеомиелита, как правило, являются условно-патогенные микроорганизмы. Их патогенность может быть обусловлена наличием микрокапсулы, строением клеточной стенки, выработкой ферментов, способностью синтезировать целый ряд экзо- и эндотоксинов [8; 10]. Являясь представителями нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека, при определённых условиях они могут вызвать рецидив инфекции с формированием свищей и выделением гноя.

В структуре ведущих возбудителей остеомиелита за последние несколько лет выявлено значительное увеличение частоты выделения *S. epidermidis* и бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [1].

Осложнения при хроническом остеомиелите чаще всего связаны со способностью бактерий формировать в организме микробные биоплёнки на поверхности различных носителей [7,11]. Штаммы *E. cloacae* характеризуются среднеадгезивными свойствами [12]. При их совместном культивировании со *S. aureus* уровень биоплёнкообразования снижается. В случае с пациентом, у которого выделена ассоциация бактерий: MRSA+*E. cloacae*, мы наблюдали хорошую чувствительность штаммов *E. cloacae* к антибактериальным препаратам, что может быть связано с угнетением патогенного потенциала за счёт совместного существования бактерий и потребностей ассоциантов.

В экспериментальных исследованиях показан низкоадгезивный потенциал *E. faecalis* [7,13]. Вместе с тем, для данного микроорганизма достаточно поверхностной колонизации, чтобы его клетки приобрели устойчивость к противомикробным препаратам [10]. Согласно данным литературы бактерии рода *Enterococcus* могут инициировать воспалительную реакцию при синергидных взаимодействиях с другими микроорганизмами, в дальнейшем не влияя на течение процесса [10, 13].

У всех пациентов с рецидивами инфекции в ране присутствовал *S. aureus*. Наличие капсулы у стафилококков повышает их вирулентность, защищает от фагоцитоза, способствует адгезии и инвазии в ткани [2, 8]. Среди грамотрицательных микроорганизмов при хроническом остеомиелите выявлено значимое увеличение частоты выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, на

фоне уменьшения доли *Acinetobacter* sp. и *P. aeruginosa* [1].

Выводы. Ведущим возбудителем хронического остеомиелита большеберцовой кости, развившегося на фоне лечения переломов пластиной, является *S. aureus*. Далее следуют коагулазонегативные стафилококки и представители семейства *Enterobacteriaceae*. Персистентный потенциал коагулазонегативных стафилококков подтверждался высокой частотой выявления метициллин-резистентных штаммов. Неферментирующие грамотрицательные бактерии представлены штаммами *P. aeruginosa*.

Несмотря на высокий процент выделения монокультур микроорганизмов, возросла доля двух- и трёхкомпонентных ассоциаций, что осложняет применение стандартной антибиотикотерапии.

Отмечены различия в составе микробного пейзажа до реконструктивного лечения пациентов и при рецидиве инфекции. При рецидиве инфекции изменился видовой состав микрофлоры: у 2-х пациентов в составе ассоциации микроорганизмов и у 3-х - в монокультурах штаммы *S. aureus* приобрели резистентность к β -лактамам антибиотикам, появились новые ассоцианты, которые в первичных посевах до реконструктивного лечения отсутствовали.

Видовой спектр микроорганизмов при хроническом остеомиелите большеберцовой кости, развившемся после накостного остеосинтеза пластиной, разнообразен и может меняться, что диктует необходимость проведения микробиологического мониторинга для выявления этиологической структуры возбудителей, контроля антибиотикорезистентности выделенных штаммов и рационального подхода к лечению пациентов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Божкова С.А., Касимова А.Р., Тихилов Р.М., Полякова Е.М., Рукина А.Н., Шабанова В.В., Ливенцов В.Н. Неблагоприятные тенденции в этиологии ортопедической инфекции: результаты 6-летнего мониторинга структуры и резистентности ведущих возбудителей. *Травматология и ортопедия России*. 2018; 24 (4): 20-31.
2. Сакович Н.В., Андреев А.А., Микулич Е.В., Остроушко А.П., Звягин В.Г. Современные аспекты этиологии, диагностики и лечения остеомиелита. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2018; 11 (1): 70-9.
3. Рушай А.К. Значимость факторов в выборе лечебной тактики у больных с остеомиелитом конечностей. *Травма*. 2016; 17 (3): 155-8.
4. Ключин Н.М., Шляхов В.И., Злобин А.В., Бурнашов С.И., Чакушин Б.Э., Абабков Ю.В., Михайлов А.Г. Чрескостный остеосинтез при лечении остеомиелита длинных костей верхней конечности. *Гений ортопедии*. 2010; 4: 45-50.
5. Крючков Р.А., Хунафин С.Н., Кунафин М.С., Загреддинов А.Ш., и др. К вопросу о ранней диагностике остеомиелита после остеосинтеза трубчатых костей с применением металлоконструкций. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2014; 9(1): 89-92.
6. Леонова С.Н., Рехов А.В., Каменка А.Л. Традиционное хирургическое лечение пациентов с переломами костей голени, осложненными хроническим травматическим остеомиелитом. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2013; 2-1 (90): 45-8.

7. Шипицына И.В., Осипова Е.В. Биопленкообразующая способность клинически значимых штаммов бактерий, выделенных у больных хроническим посттравматическим остеомиелитом, и их ассоциаций, полученных *in vitro*. *Успехи современного естествознания*. 2015; 1(6): 958-1.
8. Терехова Р.П., Митиш В.А., Пасхалова Ю.С., Складан Г.Е., и др. Возбудители остеомиелита длинных костей и их резистентность. *Раны и раневые инфекции*. 2016; 3(2): 24-30.
9. Дахер З.Р. Анализ ассоциаций микроорганизмов при остеомиелите трубчатых костей // Интегративные тенденции в медицине и образовании. 2016; (4): 30-1.
10. Marcano-Lozada M, Molero-Leon S. 7 Years of Experience in Osteomyelitis Management in Caracas, Venezuela. *Cohesive J. Microbiol infect Dis*. 2018; 2(1). CJMI.000530. DOI: 10.31031/CJMI.2018.02.000530
11. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Информационная характеристика микробных биопленок, формируемых *in vitro* на поверхности покровного стекла клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*. *Гений ортопедии*. 2018; 24 (4): 478-1.
12. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Розова Л.В. Адгезивная способность клинических штаммов *Enterobacter cloacae*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом, и их чувствительность к антимикробным препаратам. *Новости хирургии*. 2017; 25(3): 273-8.
13. Eaton T.J., Gasson M.G. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67 (4): 1628-35.
4. Klyushin N.M., Shlyahov V.I., Zlobin A.V., Burnashov S.I., Chakushin B.E., Ababkov YU.V., Mihajlov A.G. Transosseous osteosynthesis in management of osteomyelitis of long bones of the upper limb. *Geniy ortopedii*. 2010; 4: 45-50. (in Russian)
5. Kryuchkov R.A., Hunafin S.N., Kunafin M.S., Zagretinov A.S.H., et al. Early diagnostics of osteomyelitis after osteosynthesis of tubular bones using internal fixation. *Meditinskiiy vestnik Bashkortostana*. 2014; 9(1): 89-2. (in Russian)
6. Leonova S.N., Rekhov A.V., Kameka A.L. Traditional surgical treatment of patients with tibial fractures complicated by chronic traumatic osteomyelitis. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchno-go tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossijskoy akademii medicinskikh nauk*. 2013; 2-1 (90): 45-8. (in Russian)
7. Shipitsyna I.V., Osipova E.V. Biofilm-forming potential of clinically significant strains of the bacteria, isolated in patients with chronic posttraumatic osteomyelitis, and their *in vitro*-obtained associations. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015; 1 (6): 958-61. (in Russian)
8. Terekhova R.P., Mitish V.A., Paskhalova YU.S., Skladan G.E. et al. Osteomyelitis agents of the long bones and their resistance. *Rany i ranevye infektsii*. 2016; 3 (2): 24-30. (in Russian)
9. Daher Z.R. Analysis of associations of microorganisms in osteomyelitis of tubular bones. *Integrativnye tendentsii v meditsine i obrazovanii*. 2016; 4: 30-1. (in Russian)
10. Marcano-Lozada M, Molero-Leon S. 7 Years of Experience in Osteomyelitis Management in Caracas, Venezuela. *Cohesive J. Microbiol. Infect. Dis*. 2018; 2(1). CJMI.000530.
11. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Informational characteristics of microbial biofilms formed by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae in vitro* on the surface of the cover glass. *Geniy ortopedii*. 2018; 24 (4):478-81. (in Russian)
12. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Rozova L.V. Adhesive potential of clinical strains of enterobacter cloacae isolated from the wounds of patients with chronic osteomyelitis and their sensitivity to antimicrobial medications. *Novosti khirurgii*. 2017; 25 (3): 273-78. (in Russian)
13. Eaton, T.J. Gasson M.G. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67 (4): 1628-35.

REFERENCES

1. Bozhkova S.A., Kasimova A.R., Tihilov R.M., Polyakova E.M., Rukina A.N., Shabanova V.V., Livencov V.N. Adverse trends in the etiology of orthopedic infection: results of 6-year monitoring of the structure and resistance of leading pathogens. *Travmatologiya i Ortopediya Rossii*. 2018; 24 (4): 20-31. (in Russian)
2. Sakovich N.V., Andreev A.A., Mikulich E.V., Ostroushko A.P., Zvyagin V.G. Modern aspects of etiology, diagnostics and treatment of osteomyelitis. *Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii*. 2018; 11 (1): 70-9. (in Russian)
3. Rushaj A.K. Importance of Factors for Choosing Treatment Tactics for Patients with Osteomyelitis of Extremities. *Travma*. 2016; 17 (3): 155-8. (in Russian)

Поступила 22.08.19
Принята к печати 23.09.19

© ГОДОВАЛОВ А.П., КАРПУНИНА Т.И., 2019

Годовалов А. П., Карпунина Т. И.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА БИОПЛЕНОК ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614000, Пермь, Российская Федерация

Существующие методы визуализации биопленки не предусматривают дифференцированной оценки её компонентного состава, поскольку отсутствует возможность установить субстрат, окрашиваемый генцианвиолетом, так как краситель может формировать комплексы, как с внутриклеточными, так и внеклеточными структурами. Такой подход не позволяет адекватно оценивать антибиоплёночные эффекты препаратов, в отличие от модификации существующего метода для определения соотношения клеточной части и матрикса биоплёнок грамположительных микроорганизмов. Оценку компонентного состава биоплёнок осуществляли с помощью двухэтапного подхода, когда сформированные биоплёнки грамположительных микроорганизмов окрашивали генцианвиолетом в течение 5 мин с последующей фиксацией красителя в бактериальных клетках раствором Люголя, затем растворяли окрашенные продукты 95% спиртом: компоненты матрикса – в течение 1 мин, совокупной биоплёнки – в течение 15 мин, после чего оценивали состав биоплёнок по формуле: $M = (OP_{бв} / OP_{15}) \times 100$, $Kб = 100 - M$, где M – доля матрикса, %; $Kб$ – доля клеточной составляющей, %; $OP_{бв}$ – оптическая плотность проб, когда спирт для растворения окрашенного продукта выдерживают не более 1 мин; OP_{15} – оптическая плотность проб, когда спирт для растворения окрашенного продукта выдерживают 15 мин. Показано, что в составе биоплёнки, сформированной коллекционным штаммом, доля матрикса составляет 13,2%, на клеточный компонент приходится 86,8%. При культивировании того же штамма в присутствии антибиотика наблюдается увеличение матрикса биоплёнки, что вероятно обусловлено компенсаторным ответом микроорганизма на действие антибиотика. Предлагаемый подход к изучению биоплёнок позволяет оценить её компонентный состав. Получение таким способом дополнительной информации может обеспечить повышение эффективности антимикробной терапии при сокращении времени исследования.

Ключевые слова: биопленкообразующая активность; генцианвиолет; раствор Люголя; *S. aureus*.

Для цитирования: Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Определение компонентного состава биопленок грамположительных бактерий. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 632-634. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-632-634>.

Godovalov A.P., Karpunina T.I.

THE DETERMINATION OF BIOFILM COMPOSITION OF GRAM-POSITIVE BACTERIA

Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, Russian Ministry of Health, 614990, Perm, Russian Federation

Current methods of biofilm imaging do not support a differentiated assessment of its composition, since it is not possible to establish a substrate stained with crystal violet, as this dye can form complexes with both intracellular and extracellular structures. This approach does not adequately assess the anti-biofilm effects of drugs, while the results of studying the interaction of drugs with biofilm components can ensure their most correct choice. The aim of investigation was to study the possibility of applying the original modification of the current method to determine the ratio of the cellular part and the matrix of biofilms of gram-positive microorganisms. The biofilm components were analyzed using a two-step approach, when prepared biofilms of gram-positive microorganisms were stained with crystal violet for 5 minutes, followed by fixing the dye in bacterial cells with iodine solution, and then the colored products were dissolved with 95% alcohol: matrix components for 1 minute, total biofilm for 15 minutes, after which the composition of biofilms was estimated by the formula: $M = (OP_{бв} / OP_{15}) \times 100$, $Kb = 100 - M$, where M is the proportion of the matrix, %; Kb - the proportion of the cellular component, %; $OP_{бв}$ - optical density of samples, when alcohol was allowed to dissolve the colored product for no more than 1 minute; OP_{15} - was the optical density of samples, when alcohol is allowed to dissolve the colored product for 15 minutes. It was shown that in the composition of the biofilm formed by the collection strain, the proportion of the matrix was 13.2%, and the cellular component accounted for 86.8%. When the same strain cultivated in the presence of an antibiotic, an increase in the biofilm matrix was observed, which is probably due to the compensatory response of the microorganism to the action of the antibiotic. The proposed approach to the study of biofilms makes it possible to evaluate its component composition. Obtaining additional information in this way can provide, inter alia, an increase in the effectiveness of antimicrobial therapy while reducing the study time.

Key words: biofilm-forming activity; crystal violet; iodine solution; *S. aureus*.

For citation: Godovalov A.P., Karpunina T.I. The determination of biofilm composition of gram-positive bacteria. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (10): 632-634. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-632-634>

For correspondence: Godovalov A.P., Candidate of Medical Sciences, lead researcher of the Central scientific laboratory, Associate Professor of Microbiology and Virology Department, e-mail: AGodovalov@gmail.com

Information about authors:

Godovalov A.P., [http:// orcid.org/0000-0002-5112-2003](http://orcid.org/0000-0002-5112-2003)

Karpunina T.I., [http:// orcid.org/0000-0003-2511-4656](http://orcid.org/0000-0003-2511-4656)

Acknowledgment. The reported study was funded by RFBR and Perm Region according to the research projects 17-44-590404 p_a.

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

Received 12.08.2019
Accepted 26.08.2019

Введение. В развитии более 80% инфекционно-воспалительных заболеваний человека прослеживается участие биоплёнок, образованных условно-патогенными микроорганизмами. Предполагается, что в основе хронизации воспалительного процесса лежит именно формирование биоплёнки, которая защищает микроорганизмы от факторов иммунной системы человека [1,2] и от антибактериальных препаратов [3]. По способности к биоплёнкообразованию микроорганизмы существенно различаются [4].

Для изучения биопленкообразующей активности микроорганизмов предложен широкий спектр методов, как в статических, так и в динамических условиях [5-7]. Наибольшее распространение получили исследования по культивированию биоплёнок в статических условиях в полистироловых плоскостных планшетах для ИФА. Широко используется методика, предложенная G.A.O'Toole [8]. Этот протокол интересен тем, что предусматривает изучение ранних стадий формирования биоплёнки, предполагает возможность изучения действия различных соединений и факторов на биоплёнку, проведение генетических исследований. В предложенной методике используется окраска биоплёнки генцианвиолетом. Генцианвиолет хорошо себя зарекомендовал при окраске бактерий по методу Грама [9,10], т. к. известно о его способности связываться с пептидогликаном клеточной стенки бактерий [11]. В методе Грама используется дополнительно йодный раствор Люголя для образования генцианвиолетом нерастворимых комплексных соединений [10, 11]. Нет однозначного мнения о том, какие вещества в биоплёнке окрашиваются этим красителем. Генцианвиолет способен окрашивать белково-полисахаридные комплексы, входящие в состав нуклеоида, клеточной стенки, межклеточного пространства [12,13], формируя «большие» комплексные молекулы. Биоплёнка фирмикотов представляет структуру, состоящую из клеточного компонента и соединений матрикса, среди которых значительную часть составляют полисахариды [14,15]. Используемый для её визуализации краситель должен соответствовать нескольким требованиям: он должен окрашивать клетки и матрикс биоплёнок; его цвет должен соответствовать длине волны фильтра, используемого в фотоэлектроколориметре при учёте результатов; остатки красителя в лунках должны легко удаляться промыванием, без повреждения биоплёнок [16]. При использовании генцианвиолета, который соответствует перечисленным требованиям, проблемы возникают с определением соотношения клеточной части и матрикса в общей совокупности массы плёнки, между тем этот показатель может быть существенным в клинической лабораторной диагностике.

Цель исследования – изучить возможность применения оригинальной модификации существующего метода для определения соотношения клеточной части и матрикса биоплёнок грамположительных микроорганизмов.

Материал и методы. Исследования проведены на штаммах *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis* из коллекции АТСС. Культивирование микроорганизмов осуществляли в 96-луночных полистироловых план-

шетах в питательном бульоне в течение 24-48 ч при 37° С. Сформировавшиеся плёнки изучали по стандартной [8] и модифицированной методике [17]: планктонную культуру из лунок планшета удаляли и промывали их забуференным физиологическим раствором. Далее в планшет вносили 0,1%-водный раствор генцианвиолета на 5 мин, затем раствор Люголя на 2 мин. По окончании окраски планшеты промывали и высушивали на воздухе, предохраняя их от попадания солнечных лучей.

На первом этапе часть лунок (не менее 5) заливали 95% спиртом и сразу же переносили элюат в новый планшет. На втором этапе другую часть лунок (не менее 5) так же заливали 70% спиртом и выдерживали 15 мин, после чего собирали элюат в новый планшет. Полученные образцы анализировали на спектрофотометре PowerWave X при длине волны 560 нм.

Для вычисления доли матрикса и клеточной составляющей в биоплёнке использовали формулы:

$$M = (OP_{об} / OP_{15}) \times 100,$$

$$Kб = 100 - M, \text{ где}$$

M – доля матрикса, %;

Kб – доля клеточной составляющей, %;

OP_{об} – оптическая плотность проб, когда спирт для элюации выдерживали не более 1 мин.;

OP₁₅ – оптическая плотность проб, когда спирт для элюации выдерживали 15 мин [17].

Для подтверждения целесообразности дифференцированного подхода при анализе плёнокообразующей способности дополнительно проводили эксперименты с воздействием бактериостатических концентраций антибактериальных препаратов.

Результаты. При определении оптической плотности элюатов традиционным способом установлены показатели, типичные для биоплёнок, сформированных штаммами *S. aureus* 0,364±0,029 у.е. и *S. epidermidis* - 0,336±0,031 у.е. По модифицированной методике для штамма *S. aureus* АТСС 28922 характерны следующие показатели: OP_{об}=0,310; OP₁₅=2,356; M=13,2%; Kб=86,8%. В составе биоплёнки, сформированной коллекционным штаммом, доля матрикса составляла 13,2%, на клеточный компонент приходилось 86,8%. Можно предположить, что такое соотношение компонентов соответствует оптимальному для стафилококков уровню, что обусловлено адекватными условиями культивирования штамма [18].

В случае культивирования штамма *S. aureus* АТСС 28922 в присутствии цефазолина изучаемые показатели изменились: OP_{об}=0,189; OP₁₅=0,453; M=41,7%; Kб=58,3%, т.е. удельный вес матрикса увеличился, доля клеточного компонента снизилась. Полученный результат предположительно связан с действием антибиотика, который ингибирует синтез пептидогликана основного вещества клеточной стенки стафилококков. В результате этого число клеток в биоплёнке снижается. Оставшиеся жизнеспособными клетки стафилококка компенсаторно увеличивают продукцию веществ матрикса для защиты от антибиотика [4, 19]. При использовании цефазолина необходимо дополнять терапевтическую схему препаратами, действие кото-

рых направлено на разрушение матрикса.

Обсуждение. При изучении морфологии клеток с использованием метода Грама, окраска генцианвиолетом зависит от разного строения клеточной стенки у грамположительных и грамотрицательных бактерий, в частности, содержания пептидогликана, тейхоевых кислот, ионов магния и др. Неотъемлемой частью окраски грамположительных микроорганизмов является формирование сложных комплексных соединений между красителем и их специфическими компонентами при участии раствора Люголя, что обеспечивает прочное удержание красителя в толще пептидогликана. Это легло в основу предложенной модификации традиционного метода. При непродолжительной экспозиции 95% этиловый спирт способен сужать поры клеточной стенки. Это послужило основанием для применения двухэтапного подхода в реализации методики. На первом этапе краткосрочное (1 мин) воздействие спирта обеспечивает элюацию только компонентов окрашенного матрикса, а при 15-минутной экспозиции выход окрашенного продукта увеличивается за счёт разрушения клеток, определение оптической плотности такого элюата даёт информацию о совокупной массе биоплёнки.

Заключение. Предложен двухэтапный подход, позволяющий на первом этапе оценить долю матрикса в биоплёнке, на втором – совокупность клеточных и экстрацеллюлярных компонентов. Предлагаемая модификация позволяет дискриминировать компонентный состав биоплёнок грамположительных бактерий благодаря привлечению раствора Люголя и вариабельности сроков спиртовой экспозиции. Полученная таким способом дополнительная информация может обеспечить повышение эффективности антимикробной терапии за счёт комбинации лекарственных средств с различными мишенями действия при сокращении времени исследования.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта 17-44-590404 п_а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка - «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*. 2007; 76 (2): 149-63.
2. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Гущин М.О. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища инфертильных женщин. *Медицинский академический журнал*. 2017; 17(4): 53-4.
3. Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журин М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты. *Микробиология*. 2017; 4: 402-20.
4. Цветкова А.В., Фахретдинова В.Р., Маркушева Т.В., Мавзютов А.Р. Биопленки: методика сравнительной оценки интенсивности роста бактерий. *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. 2017; 3-1: 209-13.
5. Симонова И.Р., Головин С.Н., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Титова С.В. Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2017; 1: 75-81.
6. Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 4: 238-41.
14. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 12: 59-63.
16. Терещенко В.С. Способ выявления биопленкообразующей способности у грамотрицательных бактерий. *Известия Самарского*

- го научного центра Российской академии наук. 2015; 17(5-3): 917-9.
17. Карпунина Т.И., Годовалов А.П., Рябова Л.Д. Способ оценки состава биопленок грамположительных бактерий. Патент РФ № 2688215; 2019.
18. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Биопленкообразование оппортунистических микроорганизмов в плазме крови в зависимости от содержания железа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(1): 52-4.
19. Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Носков С.М., Романов В.А. Формирование биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными у больных с ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(11): 53-5.

REFERENCES

1. Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Is biofilm a “city of microbes” or an analogue of a multicellular organism? *Mikrobiologiya*. 2007; 76 (2): 149-63. (in Russian)
2. Godovalov A.P., Karpunina T.I., Guschin M.O. Features of intermicrobial relations in the microbiota of the vagina infertile women. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal*. 2017; 17(4): 53-4. (in Russian)
3. Plakunov V.K., Martyanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Controlling the formation of microbial biofilms: anti- and probiofilm agents. *Mikrobiologiya*. 2017; 4: 402-20. (in Russian)
4. Tsvetkova A.V., Fakhretdinova V.R., Markusheva T.V., Mavzyutov A.R. Biofilms: a method of comparative assessment of the growth rate of bacteria. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2017; 3-1: 209-13. (in Russian)
5. Simonova I.R., Golovin S.N., Verkina L.M., Berезnyak E.A., Titova S.V. Methods of cultivation and study of bacterial biofilms. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennyye nauki*. 2017; 1: 75-81. (in Russian)
6. Titova S.V., Verkina L.M. Simulation of cholera vibrio biofilms on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and fluorescent microscopes. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 4: 238-41. (in Russian)
7. Hannig C., Follo M., Hellwig E., Al-Ahmad A. Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *J. Med. Microbiol*. 2010; 59: 1-7.
8. O'Toole G.A. To build a biofilm. *J. Bacteriol*. 2003; 185(9): 2687-9.
9. Maley A.M., Arbisser J.L. Gentian violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century. *Exp. Dermatol*. 2013; 22(12): 775-80.
10. Coico R. Gram staining. *Curr. Protoc. Microbiol*. 2005; Appendix 3: Appendix 3C.
11. Budin G., Chung H.J., Lee H., Weissleder R. A magnetic Gram stain for bacterial detection. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2012; 51(31): 7752-5.
12. Wilhelm M.J., Sheffield J.B., Sharifian Gh.M., Wu Y., Spahr C., Gonnella G., Xu B., Dai H.L. Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane. *ACS. Chem. Biol*. 2015; 10(7): 1711-7.
13. Popescu A., Doyle R.J. The Gram stain after more than a century. *Biotech. Histochem*. 1996; 71(3): 145-51.
14. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsarev V.N. Features of the morphology of periodontal biofilm in inflammatory diseases of the gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, candida-associated periodontitis) according to electron microscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 12: 59-63. (in Russian)
15. You H., Zhuge P., Li D., Shao L., Shi H., Du H. Factors affecting bacterial biofilm expression in chronic rhinosinusitis and the influences on prognosis. *Am. J. Otolaryngol*. 2011; 32(6): 583-90.
16. Tereshchenko V.S. A method for detecting biofilm-forming ability in gram-negative bacteria. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*. 2015; 17(5-3): 917-9. (in Russian)
17. Karpunina T.I., Godovalov A.P., Ryabova L.D. The method of assessing the composition of the biofilms of gram-positive bacteria. Патент РФ № 2688215; 2019. (in Russian)
18. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Biofilm formation of opportunistic microorganisms in the blood plasma, depending on the iron content. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(1): 52-4. (in Russian)
19. Malafeeva E.V., Gul'neva M.Yu., Noskov S.M., Romanov V.A. Formation of biofilms by conditionally pathogenic microorganisms isolated from patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(11): 53-5. (in Russian)

Поступила 12.08.19

Принята к печати 26.08.19

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Останкова Ю. В.¹, Семенов А. В.^{1,2,3}, Тотолян Арег А.^{1,2}

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ НИЗКОЙ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКЕ

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия;
² ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, Россия;
³ ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, 191015, Санкт-Петербург, Россия

Проанализирован метод выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке и оценить его значимости при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В. В работе использованы образцы плазмы крови и биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих в РФ и Республике Узбекистан, без ХВГВ и с ХВГВ подтвержденным выявлением кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в гепатоцитах. Вирусную нагрузку в плазме крови измеряли с помощью набора «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). ВГВ при низкой вирусной нагрузке выявляли методом «гнездовой» ПЦР. Аналитическую чувствительность проверяли методом поэтапного разведения. Согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится асимметричная ПЦР с использованием протяженных олигонуклеотидных праймеров с разной температурой плавления, комплементарных области наибольшего сходства геномов различных образцов вируса гепатита В. Для повышения чувствительности проводится вторая ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и внутренних праймеров. Чувствительность метода при экстракции ДНК из 100 мкл плазмы составила 5 МЕ/мл, специфичность 100%. Поскольку, несмотря на характерное географическое распределение генотипов ВГВ, обнаружение «чуждых» для тех или иных территорий геновариантов становится все более частым, мы апробировали метод в географически удаленных, но имеющих активные международные отношения с Российской Федерацией регионах с высокой частотой встречаемости гепатотропных вирусов. Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке на основе технологии ПЦР позволяет идентифицировать и генотипировать различные геноварианты ХВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Метод может быть использован для выявления ВГВ в группах риска, в популяции, а также при скринировании доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В; скрытый гепатит В; низкая вирусная нагрузка; метод идентификации.

Для цитирования: Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (10): 635-640. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640>

Ostankova Yu. V.¹, Semenov A. V.^{1,2,3}, Totolian Areg A.^{1,2}

HEPATITIS B VIRUS IDENTIFICATION IN A BLOOD PLASMA AT A LOW VIRAL LOAD

¹ Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;

² Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, 197022, Saint Petersburg, Russia;

³ North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, 191015, Saint Petersburg, Russia

To analyze the method for detecting HBV DNA in peripheral blood at low viral load and evaluate its significance in identifying HBsAg-negative viral hepatitis B. In this work, samples of blood and liver tissue biopsy material were used from 128 patients living in the Russian Federation and the Republic of Uzbekistan without CHB and with CHB confirmed detection of circle covalently closed HBV DNA in hepatocytes. Plasma viral load was measured using the «AmpliSens® HBV-Monitor-FL» kit. HBV at low viral load was detected by nested PCR. Analytical sensitivity was checked by step dilution. According to our method, at the first stage, an asymmetric PCR is carried out using extended oligonucleotide primers with different melting points, complementary to the hepatitis B different genotypes greatest similarity region. To increase the sensitivity, a second PCR is performed using the first reaction amplification product and internal primers. The sensitivity of the method for DNA extraction from 100 µl of plasma was 5 IU / ml, specificity 100%. Since, in spite of the HBV genotypes characteristic geographical distribution, the detection of "alien" genovariants for certain territories is becoming more frequent, we tested the method in geographically remote but active international relations with the Russian Federation regions with a high frequency of hepatotropic viruses. The developed method for detecting HBV DNA in blood plasma at low viral load based on PCR technology allows the various HBV gene variants identification and genotyping, both characteristic and rare in the Russian Federation, circulating in other world regions. The method can be used to detect HBV in risk groups, in a population, as well as when screening blood donors in order to ensure the blood transfusions safety.

Key words: chronic hepatitis B; occult hepatitis B; low viral load; identification method.

For citation: Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (10): 635-640 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-635-640>

For correspondence: Ostankova Yu. V., PhD researcher at the Laboratory of Molecular Immunology; e-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu. V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Semenov A. V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 04.10.2019
Accepted 10.10.2019

Введение. Одной из самых значимых проблем здравоохранения в мире остаются гепатотропные вирусы, способные вызывать как острые, так и хронические заболевания и являющиеся седьмой по значимости причиной смертности [1]. Самым распространенным гепатотропным вирусом является вирус гепатита В (ВГВ): по данным ВОЗ в 2015 г. в мире насчитывалось 257 млн человек, живущих с хронической инфекцией гепатита В [2]. Более 47% смертей, причиной которых являются вирусные гепатиты, связаны с ВГВ [3]. Среди инфицированных вирусом гепатита В более чем у 240 миллионов человек развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ) – диффузно-воспалительное заболевание, связанное с персистенцией вируса гепатита В.

Распространенность ХВГВ оценивается по частоте встречаемости HBsAg, в то время как одной из естественных форм течения заболевания является HBsAg-негативный (скрытый) ХВГВ. Скрытый гепатит В (СкГВ) определяют как стадию заболевания, при которой в ткани печени обнаруживают ДНК ВГВ при неопределяемом уровне HBsAg в сыворотке периферической крови, вне зависимости от того, выявляется или нет ДНК ВГВ методом ПЦР в периферической крови [4]. За счет подавления внутриядерной транскрипции субгеномных РНК ВГВ с матрицы кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ (ккзДНК) развивается СкГВ, так как ккз ДНК ВГВ является матрицей для субгеномных и прегеномных копий РНК, на основе которых синтезируются вирусный геном и вирусные белки [5]. В ядре гепатоцита ккзДНК находится в виде минихромосомы, где НК связана с гистоновыми и гистоноподобными белками, а транскрипционная активность регулируется по эукариотическому механизму и способна существовать долгое время [6]. В большинстве случаев, репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в периферической крови больного крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса при подавлении репликации не происходит. Ключевым фактором остается сохранение ккзДНК в виде минихромосомы, что становится причиной невозможности полной элиминации ВГВ и за рецидивы репликации вируса после прекращения противовирусной терапии [7].

Встречается как серопозитивный, так и серонегативный по другим маркерам инфицирования скрытый ВГВ [8, 9]. Развитие при серонегативном варианте может быть мгновенным, то есть при первичном инфицировании, и постепенным с потерей серологических маркеров

по мере течения заболевания. При серопозитивном варианте СкГВ потеря HBsAg может являться итогом либо разрешения острого гепатита В, либо последовательной фазой естественного течения ХВГВ [10]. Несмотря на низкую вирусную нагрузку, СкГВ может играть существенную роль в развитии фиброза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [11].

Из-за относительно недавней идентификации этой группы ВГВ-инфицированных лиц, факторы риска, связанные со скрытой инфекцией ВГВ все еще остаются не до конца изученными и понятными, хотя некоторые данные позволяют предположить, что при СкГВ сохраняется большая часть тех же факторов риска, что и при HBsAg-позитивной форме течения ХВГВ [12]. Так, например, показана возможность внутриутробного инфицирования ребенка HBsAg и HBeAg-негативной матерью [13]. При переливании крови минимальная инфекционная доза приблизительно 16-100 копий [14]. Более того, несмотря на крайне низкую вирусную нагрузку при СкГВ, возможна передача ВГВ при тесном бытовом контакте от пациента со скрытой формой течения заболевания с дальнейшим проявлением у реципиента HBsAg-позитивной инфекции [15].

Распространенность HBsAg-негативного ВГВ в мире варьирует и, вероятнее всего, коррелирует с распространенностью HBsAg-позитивной формы ВГВ в том или ином регионе. Хорошо известно, что некоторые группы пациентов подвергаются значительно более высокому риску заражения СкГВ вне зависимости от их географического положения, например, лица с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС) и/или ВИЧ-инфекцией, подвергающиеся гемодиализу, трансплантации печени, потребители инъекционных наркотиков [16]. Однако различные данные о встречаемости СкГВ в одних и тех же географических регионах и/или сходных группах риска могут быть связаны не только с биологическими особенностями вируса и частотой встречаемости ВГВ на той или иной территории, но и с методом выявления вируса.

Поскольку уровень вирусной нагрузки в крови при HBsAg-негативном ВГВ крайне низок (<200 МЕ ДНК ВГВ/мл), вплоть до невозможности обнаружения стандартными методами, выявление ДНК ВГВ в ткани печени остается не только «золотым стандартом», но и практически единственным достоверным методом лабораторной диагностики скрытого ВГВ. Идентификация и количественная оценка кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в ткани печени позволяет с высо-

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для выявления ДНК ВГВ в плазме при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР

Праймер	Нуклеотидная последовательность
HBV LongF1.1	5'- CTGCGCACCAGCACCATGCAACTTTTTACCTCTGC-3'
HBV LongR1.1	5'-CAGACCAATTATATGCCTACAGCCTCCTA-3'
SF2	5'-GGTCACCATATCTTGGGAA-3'
SR2	5'-AATGGCACTAGTAAACTGAG-3'
CF2	5'-GCCTTAGAGTCTCCTGAGCA-3'
CR2	5'-GAGGGAGTTCTTCTTAGG-3'
XF2	5'- CCATACTGCGGAACCTAGC-3'
XR2	5'- CCCAAGGCACAGCTTGGAGG-3'
PF2	5'- TCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC-3'
PR2	5'- AGTTCCGCAGTATGGATCGG-3'

кой точностью обнаружить ВГВ в скрытой фазе течения заболевания, а также предварительно оценить уровень репликации вируса в гепатоцитах [17]. Однако необходимость инвазивного вмешательства позволяет предложить метод только в качестве дополнительной диагностики в случаях, когда пункционная биопсия печени осуществляется по клиническим показаниям, но не дает возможности использовать его для широкого скрининга популяций, доноров крови или отдельных групп пациентов.

Целью нашей работы являлся анализ метода выявления ДНК ВГВ в периферической крови при низкой вирусной нагрузке и оценка его значимости при идентификации HBsAg-негативного вирусного гепатита В.

Материал и методы. В работе были использованы плазма крови и образцы биопсийного материала ткани печени 128 больных, проживающих на территории Санкт-Петербурга, в различных регионах РФ, а также в Республике Узбекистан без ХВГВ и с ХВГВ ранее подтвержденным в том числе методом выявления кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в тканях печени [17].

Для определения специфичности разработанного метода в соответствии с отработанными условиями проведения ПЦР были исследованы предварительно охарактеризованные с использованием коммерческих тест-систем серологически и молекулярно-генетически негативные по ВГВ образцы плазмы крови детей 4-11 лет, подростков 12-18 лет, беременных женщин на различных сроках беременности, пациентов в возрасте 50-70 лет, онкологических больных (немелкоклеточный рак легкого) вне терапии, онкологических больных проходящих лечение, пациентов гемодиализного центра, пациентов с коинфекцией ВИЧ + ВГС.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции.

Вирусную нагрузку в плазме крови предварительно измеряли с помощью стандартизированного набора для количественного определения ДНК ВГВ в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® HBV-Монитор-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции.

ВГВ при низкой вирусной нагрузке выявляли методом «гнездовой» ПЦР с использованием на втором этапе нескольких пар праймеров, фланкирующих четыре региона генома вируса. В том числе фрагменты, включающие рекомендованный для гено- и субгенотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S [18].

Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 3-30 пМ каждого олигопраймера, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (pH 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл.

Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при 95°C в течение 5 мин устанавливали 30-40 циклов амплификации в режиме: 95°C – 20-40 сек, 55-65°C – 20-30 сек, 72°C – 30-90 сек; затем финальная элонгация при 72°C – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1xTBE), окрашенном бромистым этидием.

На первом этапе проводили асимметричную ПЦР с использованием 3 пмоль/л прямого и 30 пмоль/л обратного праймеров HBV Long (табл. 1). На втором этапе для повышения чувствительности проводили вторую ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних (вложенных, гнездовых) праймеров для четырех регионов ВГВ (см.табл. 1) – по 15 пмоль/л каждого.

В качестве дополнительного контроля для исключения контаминации секвенировали полученные фрагменты амплификации анализируемых образцов при помощи генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США), использовали набор реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение. Для выявления ВГВ в плазме крови при низкой вирусной нагрузке был разработан способ обнаружения ДНК ВГВ на базе методики, предложенной в работе, посвященной передаче ВГВ от матери ребенку [19]. Недостаток метода, предложенного D.Candotti и соавт. [4], заключается в необходимости большого объема плазмы крови для экстракции ДНК (500 мкл), а также в невозможности убедиться в полноте генома вируса за счет секвенирования как минимум двух из четырех участков генома ВГВ, как это было рекомендовано на совещании по скрытому ВГВ.

Согласно разработанному нами методу, на первом этапе проводится амплификация ДНК методом асимметричной ПЦР с использованием протяженных олигонуклеотидных праймеров с разной температурой плавления, комплементарных области наибольшего сходства геномов различных образцов вируса гепатита В. Для повышения чувствительности проводится вторая полимеразная цепная реакция с использованием продукта амплификации первой реакции и внутренних праймеров (см.табл.1), соответствующих одному из четырех рекомендованных при диагностике СкГВ регионов генома ВГВ. В составе амплификационной смеси на каждом этапе предложено неравное соотношение дезок-

Таблица 2

Вирусная нагрузка использованных в оценке аналитической чувствительности образцов в разведениях

Образец	МЕ/мл образец	МЕ/мл пул 1	МЕ/мл пул 2	МЕ/мл пул 3	МЕ/мл пул 4	МЕ/мл пул 5	МЕ/мл пул 6	МЕ/мл пул 7	МЕ/мл пул 8	МЕ/мл пул 9
1	38*10 ⁶	19*10 ⁶	9,5*10 ⁶	4,7*10 ⁶	2,3*10 ⁶	1,0*10⁶	5,9*10 ⁵	2,9*10 ⁵	1,4*10 ⁵	7,4*10 ⁴
2	24*10 ⁵	12*10 ⁵	6*10 ⁵	3,2*10⁵	1,5*10 ⁵	7,5*10 ⁴	3,7*10 ⁴	1,8*10 ⁴	9,3*10 ³	4,6*10 ³
3	11*10 ⁵	5,5*10 ⁵	2,7*10 ⁵	1,3*10 ⁵	6,8*10 ⁴	3,4*10 ⁴	1,7*10 ⁴	8,5*10³	4,2*10 ³	2,1*10 ³
4	47*10 ⁴	23,5*10 ⁴	11,7*10 ⁴	5,8*10 ⁴	2,9*10 ⁴	1,4*10 ⁴	7,3*10 ³	3,6*10 ³	1,7*10³	9,1*10 ²
5	21*10 ⁴	10,5*10 ⁴	5,2*10 ⁴	2,6*10 ⁴	1,3*10 ⁴	6,5*10 ³	3,1*10³	1,6*10 ³	8,2*10 ²	4,1*10 ²
6	8*10 ⁴	4*10 ⁴	2*10 ⁴	1*10 ⁴	5*10 ³	2,7*10³	1,2*10 ³	6,2*10 ²	3,1*10 ²	1,5*10 ²
7	9*10 ³	4,5*10 ³	2,2*10 ³	1,1*10 ³	5,6*10 ²	2,8*10²	1,4*10²	70	35	17
8	6*10 ³	3*10 ³	1,5*10 ³	7,5*10 ²	3,9*10²	1,8*10 ²	93	46	23	11
9	5*10 ³	2,5*10 ³	1,2*10 ³	6,2*10 ²	3,0*10²	1,6*10²	78	39	19	9,7
10	7*10 ²	3,5*10 ²	1,7*10²	87	43	21	10	5	2,5	1,2

Примечание. Вирусная нагрузка в пулах анализировалась выборочно (выделены полужирным шрифтом и подчеркиванием).

синуклеотидтрифосфатов и высокая концентрация MgCl₂, на первом этапе в смеси присутствуют формамид и глицерин в количестве 4% и 6% от конечного объема соответственно, а на втором этапе формамид и DMSO в количестве 4% и 10% от конечного объема соответственно.

Аналитическую чувствительность метода проверяли методом поэтапного разведения. Были выбраны 10 образцов плазмы крови, содержащие различные концентрации ВГВ. Каждый образец поэтапно разводили предварительно проанализированной плазмой крови без ВГВ (чистой плазмой) следующим образом. Аликвоту образца объемом 100 мкл вносили в микропробирку Eppendorf объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл чистой плазмы, тщательно пипетировали и переносили 100 мкл полученного пула в новую микропробирку, куда снова добавляли 100 мкл чистой плазмы, пипетировали и 100 мкл нового пула переносили в третью пробирку итд. до десятикратного последовательного разведения (табл. 2). После разведения осуществляли экстракцию ДНК из каждого пула разведения каждого образца. Полученные образцы ДНК амплифицировали, согласно предложенному методу. Результаты выявления вируса в пулах разведения представлены в табл. 3.

В качестве примера оценки чувствительности на гель-электрофорезе на рисунке представлен черно-белый негатив фотографии электрофореза продуктов амплификации второго этапа (праймеры SF2/SR2) последовательных разведений образца № 9, вирусная нагрузка 5*10³ МЕ/мл. Продукт амплификации последнего разведения предположительно около 9,7 МЕ/мл. Данной концентрации фрагмента было достаточно для проведения секвенирующей реакции.

Для определения уровня диагностической чувствительности разработанного метода относительно «референсных» коммерческих тест-систем был использован набор реагентов для качественного определения ДНК ВГВ в биологическом материале методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН

Таблица 3

Выявление ВГВ в пулах разведения в соответствии с таблицей 2.

Образец	Без разведения	пул 1	пул 2	пул 3	пул 4	пул 5	пул 6	пул 7	пул 8	пул 9
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
10	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-

Примечание. «+» – образец, визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле, «-» – образец, визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле, «+/-» – образец, слабо визуализируемый при электрофорезе в агарозном геле, хорошо визуализируемый в полиакриламидном геле. Для «+» и «+/-» образцов возможно дальнейшее секвенирование.

ЦНИИЭ, Москва), а также одна из наиболее чувствительных (аналитическая чувствительность 3,8 МЕ/мл) тест-систем HBV RG PCR Kit (Qiagen) с предварительной экстракцией анализируемой ДНК из различного объема биологического материала. В качестве анализируемого биологического материала использовали образцы и пулы образцов, приведенные в табл. 4.

Таким образом, чувствительность предложенного метода при использовании 100 мкл плазмы при стандартном методе экстракции НК с помощью коммерческого набора реагентов «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) составила 5 МЕ/мл.

Оценку специфичности проводили в два этапа. На первом этапе последовательно проводили анализ охарактеризованных образцов. На втором этапе проводили «слепой» анализ, для чего пробирки с анализируемыми негативными образцами объединяли с пробирками, содержащими ВГВ-положительную плазму крови больных, пробирки маркировали сквозной нумерацией. Для контроля анализируемых образцов и исключения возможной контаминации в качестве контрольных ВГВ-

Таблица 4

Определение чувствительности разработанного метода в сравнении с «референсными» тест-системами

Наименование образцов и объем биологического материала экстракции	Концентрация (предположительная концентрация) образца МЕ/мл	АмплиСенс HBV-FL	HBV RG PCR Kit	Предложенный нами метод выявления ВГВ при низк. вирусной нагрузке
1 без разведения	500 мкл		+	+
	100 мкл	38*10 ⁶	+	+
1 пул 7	500 мкл		+	+
	100 мкл	2,9*10 ⁵	+	+
4 пул 8	500 мкл		+	+
	100 мкл	1,7*10 ³	+	+
6 пул 3	500 мкл		+	+
	100 мкл	1*10 ⁴	+	+
6 пул 9	500 мкл		+	+
	100 мкл	1,5*10 ²	+	+
7 пул 4	500 мкл		+	+
	100 мкл	5,6*10 ²	+	+
7 пул 8	500 мкл		+	+
	100 мкл	35	-	+
9 пул 5	500 мкл		+	+
	100 мкл	1,6*10 ²	+	+
9 пул 9	500 мкл		+	+
	100 мкл	9,7	-	+
10 пул 3	500 мкл		+	+
	100 мкл	87	+	+
10 пул 7	500 мкл		-	+
	100 мкл	5	-	+
10 пул 8	500 мкл		-	+
	100 мкл	2,5	-	-

позитивных образцов использовали плазму, содержащую ВГВ субгенотипов А1, D4, Е, выявление которых в используемых для тестирования специфичности группах маловероятно. Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК ВГВ в крови при низкой вирусной нагрузке представлены в табл. 5.

Из представленных данных видно, что 98,82% обследованных образцов являлись отрицательными, сомнительных образцов не обнаружено, четыре образца (1,18%) положительны при использовании указанного метода выявления ВГВ при низкой вирусной нагрузке. Для позитивных образцов проводили секвенирование и субгенотипирование полученных фрагментов ДНК. Ни один из амплифицированных фрагментов не относился к ВГВ субгенотипов А1, D4, Е.

Дополнительно для оценки специфичности был проведен анализ посредством добавления в реакцию амплификации геномной ДНК/кДНК следующих вирусов: вирусы гепатитов А, С, D, Е, G, вирус иммунодефицита человека, парвовирус В19, вирус Эпштейн-Барра, цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1 и 2 типов, вирус клещевого энцефалита. При проведении тестирования образцов ДНК/кДНК вышеперечисленных вирусов позитивной реакции на присутствие ДНК ВГВ и неспецифических реакций выявлено не было.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности разработанного метода при исследовании биологического материала.

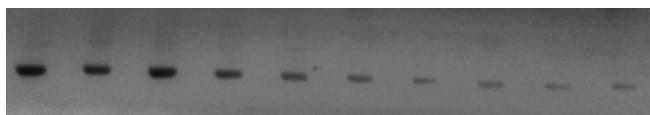
Вышеописанный метод был разработан с использованием в качестве образцов ВГВ, циркулирующих

Таблица 5

Результаты тестирования специфичности метода выявления ДНК ВГВ в крови при низкой вирусной нагрузке

Наименование группы образцов	Количество образцов	Положительные	Отрицательные	Сомнительные
Плазма крови детей	28	0	28	0
Плазма крови подростков	40	0	40	0
Плазма крови беременных	96	2	94	0
Плазма крови онкобольных вне терапии	46	0	46	0
Плазма крови онкобольных проходящих лечение	27	0	27	0
Плазма крови пациентов 50-70 лет	30	0	30	0
Плазма крови пациентов гемодиализного центра	34	1	33	0
Плазма крови лиц с коинфекцией ВИЧ ВГС	36	1	35	0

на территории РФ и Республики Узбекистан генотипов (D1, D2, D3, A2). Метод позволили выявить и охарактеризовать HBsAg-негативный ВГВ среди ВИЧ-



Негатив фотографии электрофореза продуктов амплификации второго этапа последовательных разведений образца №9, вирусная нагрузка $5 \cdot 10^3$ МЕ/мл. Продукт амплификации последнего разведения, предположительно около $9,7$ МЕ/мл.

инфицированных лиц, больных хроническим вирусным гепатитом С, больных криптогенным гепатитом, доноров крови. Поскольку, несмотря на характерное географическое распределение генотипов и субгенотипов ВГВ, обнаружение «чуждых» для тех или иных территорий геновариантов становится все более частым, мы сочли необходимым оценить возможность использования предложенного метода в географически удаленных, но имеющих активные международные отношения с Российской Федерацией регионах с высокой частотой встречаемости гепатотропных вирусов, в том числе ВГВ не встречающихся в нашей стране генотипов.

Метод был апробирован в Гвинейской Республике и в Социалистической Республике Вьетнам [20]. Было показано, что предложенный метод позволяет выявлять и секвенировать различные геноварианты ВГВ как широко распространенные в РФ D1, D2, D3, A2, так и редко встречающиеся в России A1, B2, B4, C1, C2, E (полные геномы ВГВ, полученные из образцов с низкой вирусной нагрузкой субгенотипов C2, B2, B4 депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами MN535017-MN535019).

Заключение. Разработанный метод выявления ДНК ВГВ в плазме крови на основе технологии ПЦР при низкой вирусной нагрузке позволяет идентифицировать и генотипировать различные геноварианты ХВГВ как характерные, так и редко встречающиеся на территории РФ, циркулирующие в других регионах мира. Метод может быть использован для выявления ВГВ в группах риска, в популяции, а также при скринировании доноров крови в целях обеспечения безопасности гемотрансфузий.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8, 10-16, 18,19 см. REFERENCES)

9. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.Л., Савчук Т.Н., Тотолян Арег А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 383-92.
17. Останкова Ю. В., Семенов А. В., Тотолян Арег А. Метод количественной оценки кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК ВГВ в пункционных биоптатах печени. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(9): 565-7.
20. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Понятишина М.В., Хамитова И.В., Сафронов В.А. и др. Распространенность маркеров вируса гепатита В среди пациентов Российско-Гвинейского госпиталя г. Киндия Гвинейской Республики. В кн.: Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет. Попова А.Ю., ред. СПб.: ФБУН

НИИЭМ имени Пастера; 2017: 256-62.

REFERENCES

1. Van Nguyen D., Van Nguyen C., Bonsall D., Ngo T.T., Carrique-Mas J., Pham A.H. et al. Detection and Characterization of Homologues of Human Hepatitis Viruses and Pegviruses in Rodents and Bats in Vietnam. *Viruses*. 2018; 10(3): E102.
2. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>>. Accessed 2019.07.08.
3. Dong Hyun Sinn, Eun Ju Cho, Ji Hoon Kim, Do Young Kim, Yoon Jun Kim, Moon Seok Choi. Current status and strategies for viral hepatitis control in Korea. *Clin. Mol. Hepatol.* 2017; 23(3): 189–95.
4. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M. et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2008; 49: 652–7.
5. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics. *Antiviral. research*. 2015; 122: 91–100.
6. Raffa G., Maimone S., Cargnel A., Santantonio T., Antonucci G., Massari M. et al. Analysis of occult hepatitis B virus infection in liver tissue of HIV patients with chronic hepatitis C. *AIDS*. 2007; 21: 2171–5.
7. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*. 2012; 61(1): i6–i17.
8. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2: 479–86.
9. Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Burkitbayev Z.K., Savchuk T. N., Totolian Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i Immunitet*. 2017; 7(4): 383-92. (in Russian)
10. Mulrooney-Cousins P. M., Michalak T. I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13: 5682–6.
11. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2007; 46: 160–70.
12. Pollicino T., Squadrito G., Cerenzia G., Cacciola I., Raffa G., Craxi A. et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*. 2004; 126(1): 102-10.
13. Gui Q.D., Yue Y.F., Li S.H., Zhang F. Study on intrauterine infection of hepatitis B virus in pregnant women with hepatitis B surface antigen and hepatitis B e antigen negative. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005; 40: 99–102.
14. Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Steinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut*. 2019; 68(2): 313-21.
15. Hu L.P., Liu D.P., Chen Q.Y., Harrison T.J., He X., Wang X.Y. et al. Occult HBV Infection May Be Transmitted through Close Contact and Manifest as an Overt Infection. *PLoS One*. 2015; 10(10):e0138552. 10.1371/journal.pone.0138552
16. Samal J., Kandpal M., Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2012; 25: 142–63.
17. Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Totolian Areg A. The quantitative determination method of covalently closed circular DNA HBV in puncture biopsy specimens of the liver. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (9): 565-70. (in Russian)
18. Brichtler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013; 94 (Pt 10): 2318-29.
19. Candotti D., Danso K., Allain J-P. Maternofetal transmission of hepatitis B virus genotype E in Ghana, West Africa. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 2686-95.
20. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Ponyatishina M.V., Khamitova I.V., Safronov V.A. et al. The prevalence of hepatitis B virus markers among patients of the Russian-Guinean hospital in Kindia, the Republic of Guinea. In the book: Popova A.Yu., ed. Actual infections in the Republic of Guinea: epidemiology, diagnosis and immunity [Aktual'nye infektsii v Gvineyskoy Respublike: epidemiologiya, diagnostika i immunitet]. St.Petersburg: Saint-Petersburg Pasteur Institute; 2017: 256-62. (in Russian)

Поступила 04.10.19

Принята к печати 10.10.19