

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"»

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

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



# КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 64  
11 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

НОЯБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

**Почтовый адрес**  
**ОАО «Издательство "Медицина"»**  
115088, Москва, Новоостановская 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 из-  
дания не может быть занесена в память компью-  
тера либо воспроизведена любым способом  
без предварительного письменного разреше-  
ния издателя.

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

**Индекс 71442 — для подписчиков**  
**Подписка через Интернет: www.akc.ru,**  
**www.pressa-rf.ru**  
**Подписка на электронную версию:**  
**elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2019. № 11. 641–704.

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

**Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ**

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИХИ-  
НА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, В.Т. МОРОЗОВА,  
Л.М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л.М. СКУ-  
ИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН, И.П. ШАБАЛОВА

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-  
Петербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*),  
А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красно-  
ярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*),  
В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНО-  
ВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Шве-  
ция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*),  
К.П. КАШКИН (*Москва*), Г.И. КОЗИНЕЦ (*Москва*),  
А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), В.Г. КОЛБ (*Минск*),  
Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*),  
А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*),  
Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ  
(*Москва*), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (*Москва*), Е.Н. ОВАНЕСОВ  
(*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ  
(*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), Д.Б. САПРЫ-  
ГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕН-  
КО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕ-  
ШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-Петербург*),  
С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ (*Моск-  
ва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРОВАЯ  
(*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО  
"МЕДИЦИНА"

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

# Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ Диагностика

Volume 64  
11 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

NOVEMBER

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](mailto: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](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**

**WWW page: [www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)**

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

**Editor-in-Chief 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. REZNICOV  
(*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyu-  
men'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY  
(*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA  
(*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*),  
A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peter-  
burg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## БИОХИМИЯ

- Акайзин Э.С., Метелев А.С., Акайзина А.Э. Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике инфицированного и стерильного панкреонекроза ..... 644

## ЦИТОЛОГИЯ

- Круглова И.А., Зиновьев С.В., Уткин О.В., Денисенко А.Н., Ильинская О.Е., Москвичев М.А. Цифровое изображение в практике цитолога: экспериментальное исследование ..... 649

## ИММУНОЛОГИЯ

- Акиншина Ю.А., Никитина А.В., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера ..... 654
- Новиков Ю.А., Индутный А. В., Кравченко Е.Н. Иммунологические маркёры поражения нервной ткани как элемент прогностической модели поражения нервной системы при сифилисе ..... 659
- Соснин Д.Ю., Гилева О. С., Сивак Е. Ю., Даурова Ф.Ю., Гибадуллина Н.В., Коротин С. В. Содержание васкулоэндотелиального фактора роста в слюне и сыворотке крови больных пародонтитом ..... 663
- Аллахвердиев В.А. Клинико-лабораторное обоснование эффективности рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  в хирургическом лечении острых язвенных гастродуоденальных кровотечений ..... 669
- Гусейнова А.С. Особенности изменения цитокинового профиля и кальцийрегулирующих гормонов при ревматоидном артрите ..... 673
- Ахунув В. М., Сизова Ж. М., László Galgóczi, Ахунова А. М., Лаврентьева Т. П. Роль эритроцитов в механизмах неспецифической защиты крови при инфекции грибом рода *Paecilomyces* ..... 677

## МИКРОБИОЛОГИЯ

- Харсеева Г.Г., Алиева А.А., Алексеева Л.П., Мангутов Э.О., Шовкун Л.А. Цитопатическое действие возбудителя дифтерии в составе биопленки ..... 681
- Леонова Г.Н. Сравнительный анализ эффективности методов верификации вируса клещевого энцефалита ..... 686
- Александрова Н.А., Заславская М.И., Соловьева И.В., Точилиная А. Г., Белова И. В. Оценка антикандидозной активности метаболитов клинических изолятов энтерококков ..... 690
- Мельников В.Г., Villena J., Комбарова С.Ю. Проблема деколонизации назальных носителей *Staphylococcus aureus* с точки зрения микробиолога (обзор литературы) ..... 693

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Прохвятилова Е.В., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В. Оценка возможности применения в лабораторной практике набора реагентов для диагностики сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени ..... 700

## BIOCHEMISTRY

- Akayzin E.S., Metelev A.S., Akayzina A.E. Indicators of volatile fatty acids in differential diagnostics of infected and sterile pancreonecrosis

## CYTOLOGY

- Kruglova I.A., Zinoviev S.V., Utkin O.V., Denisenko A.N., Ilyinskaya O.E., Moskvichev M.A. A digital image in the practice of cytology: a pilot study

## IMMUNOLOGY

- Akinshina Yu.A., Nikitina A.V., Amelina E.A.1 Mardany S.G. Immunochromatographic test for determination of D-dimer
- Novikov Yu.A., Indutny A.V., Kravchenko E.N. Immunological markers of defeat of nervous tissue as the element of predictive model of damage of nervous system at syphilis
- Sosnin D.Yu., Gileva O.S., Sivak E.Yu., Daurova F.Yu., Gibadullina N.V., Korotin S.V. The content of vascular endothelial grow factor in saliva and serum in patients with periodontitis
- Allahverdiyev V.A. The efficacy of recombinant interleukin-1 $\beta$  in surgical treatment of acute ulcerative gastroduodenal bleedings
- Huseynova A.S. Changes the cytokine profile and calcium-regulating hormones in rheumatoid arthritis
- Akhunov V.M., Sizova Zh.M., László Galgóczi, Akhunova A.M., Lavrentyeva T.P. Role of erythrocytes in mechanisms of nonspecific protection of blood in infection caused by the fungus of genus *Paecilomyces*

## MICROBIOLOGY

- Kharseeva G.G., Alieva A.A., Alekseeva L.P., Mangutov Ye.O., Shovkun L.A. Cypopathic effect of Diphtheria pathogen in the composition of biofilm
- Leonova G.N. Comparative analysis of methods efficiency of virification of the tick-borne encephalite virus
- Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., Soloveva I.V., Tochilina A.D., Belova I.V. Evaluation of anti-candida activity of metabolites of enterococcal clinical isolates
- Melnikov V.G., Villena J., Kombarova S.Yu. The problem of decolonization of staphylococcus aureus nasal carriers from the microbiologist's point of view (review of literature)

## CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Prokhvatilova E.V., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Assessment of the possibility of application in laboratory practice of reagent kit for diagnosis of glanders and melioidosis by real-time polymerase chain reaction

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Акайзин Э.С.<sup>1</sup>, Метелев А.С.<sup>2</sup> Акайзина А.Э.<sup>1</sup>

### ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФИЦИРОВАННОГО И СТЕРИЛЬНОГО ПАНКРЕОНЕКРОЗА

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 153012, Иваново, Россия;

<sup>2</sup>ОБУЗ «Ивановская областная клиническая больница», 153040, Иваново, Россия

*Цель исследования — оценка информативности показателей летучих жирных кислот для дифференциальной диагностики инфицированного и стерильного панкреонекроза. Обследовано и пролечено 34 больных с панкреонекрозом. Проведён анализ концентраций летучих жирных кислот (ЛЖК): уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой на автоматизированном газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000» с капиллярной колонкой «HP-FFAP» и пламенно-ионизационным детектором. Показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше у больных с инфицированным панкреонекрозом по сравнению с показателями ЛЖК больных со стерильным панкреонекрозом. Показатели ЛЖК можно использовать для дифференциальной диагностики инфицированного и стерильного панкреонекроза.*

**Ключевые слова:** панкреонекроз; диагностика; летучие жирные кислоты.

**Для цитирования:** Акайзин Э.С., Метелев А.С., Акайзина А.Э. Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике инфицированного и стерильного панкреонекроза. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 644-648. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-644-648>

Akayzin E.S.<sup>1</sup>, Metelev A.S.<sup>2</sup>, Akayzina A.E.<sup>1</sup>

#### INDICATORS OF VOLATILE FATTY ACIDS IN DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF INFECTED AND STERILE PANCREONECROSIS

<sup>1</sup>Ivanovo State Medical Academy, 153012, Ivanovo, Russian Federation;

<sup>2</sup>Ivanovo Regional Clinical Hospital, 153040, Ivanovo, Russian Federation

*The aim of the study was to assess the information content of volatile fatty acid parameters for the differential diagnosis of infected and sterile pancreatic necrosis. The work is based on the results of examination and treatment of 34 patients with pancreatic necrosis. The analysis of concentrations of volatile fatty acids: acetic, propionic, butyric and isovaleric was carried out on an automated gas chromatograph «Crystallux-4000» with a capillary column «HP-FFAP» and flame ionization detector. The indicators of acetic, propionic, butyric, isovaleric acid and the sum of volatile fatty acids are statistically significantly higher in patients with infected pancreatic necrosis compared with the indicators of volatile fatty acids in patients with sterile pancreatic necrosis. Volatile fatty acid values can be used for the differential diagnosis of infected and sterile pancreatic necrosis.*

**Key words:** pancreatic necrosis; diagnostics; volatile fatty acids.

**For citation:** Akayzin E.S., Metelev A.S., Akayzina A.E. Indicators of volatile fatty acids for differential diagnostics of infected and sterile of pancreatic necrosis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 644-648 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-644-648>

**For correspondence:** Akayzin E.S., doctor of medicine (MD), professor of the microbiology and virology department; E-mail: [ed.s.a@mail.ru](mailto:ed.s.a@mail.ru)

#### Information about authors:

Akayzin E.S., <https://orcid.org/0000-0002-4600-8054>

Metelev A.S., <https://orcid.org/0000-0003-4922-1800>

Akayzina A.E., <https://orcid.org/0000-0001-9805-1188>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 10.10.2019  
Accepted 14.10.2019

**Введение.** Актуальным направлением неотложной панкреатологии является совершенствование существующих и поиск новых, патогенетически обоснованных методов диагностики и консервативного лечения панкре-

онекроза (ПН) для выбора оптимальной хирургической тактики [1-11]. Для деструктивного панкреатита характерна закономерная трансформация стерильных форм в инфицированные [1]. Для выявления признаков инфи-

Для корреспонденции: Акайзин Эдуард Семенович, д-р мед. наук, проф. каф. микробиологии и вирусологии; e-mail: [ed.s.a@mail.ru](mailto:ed.s.a@mail.ru)

цирования при ПН применяют воспалительные маркёры (фибриноген, С-реактивный белок, прокальцитонин и др.), результаты культурального исследования аспирата, полученного при тонкоигльной пункции [1]. Многообразие используемых лабораторных и инструментальных методов диагностики свидетельствует о том, что ни один из них в полной мере не удовлетворяет запросам клиницистов, так как не всегда позволяет достоверно и своевременно выявлять наличие инфицирования некротически изменённых тканей поджелудочной железы и забрюшинной клетчатки у пациентов с деструктивным панкреатитом и его осложнениями. Ультразвуковое сканирование и рентгеновская компьютерная томография позволяют дифференцировать жидкостные образования от мягкотканых воспалительно-некротических масс, но не обеспечивают дифференциальную диагностику стерильного и инфицированного характера деструкции [1, 2].

Летучие жирные кислоты (ЛЖК), (*англ.* «volatile fatty acids») – монокарбоновые органические кислоты являются метаболитами факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий [12-14]. К ним относятся уксусная, пропионовая, изомасляная, масляная, изовалериановая, валериановая, изокапроновая, капроновая кислоты. Метод основан на обнаружении в патологическом материале от больного ЛЖК, которые являются специфическими продуктами метаболизма облигатно-анаэробных бактерий [12-16].

ЛЖК используют для диагностики дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта [17, 18]. Для оптимизации диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний необходима быстрая индикация возбудителей, их классификация как аэробов (факультативных анаэробов) или облигатных анаэробов для выбора адекватного лечения [19-30]. Изучение содержания ЛЖК в биоптатах поджелудочной железы и периферической крови методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС), позволило установить роль анаэробной неклостридиальной инфекции в развитии инфицированного панкреонекроза (ИПН) [3].

Значение анаэробной микрофлоры и её метаболитов - ЛЖК для диагностики острого панкреатита до настоящего времени изучено недостаточно [3; 4; 6; 30]. Дифференциальная диагностика инфицированного панкреонекроза и стерильного панкреонекроза (СПН) недостаточно разработана.

Цель исследования — оценка информативности показателей ЛЖК для дифференциальной диагностики инфицированного и стерильного панкреонекроза.

**Материал и методы.** Обследовано и пролечено 34 больных ПН, находившихся в хирургическом отделении Ивановской областной клинической больницы (ретроспективное исследование). Возраст больных от 21 года до 84 лет, в среднем составлял  $44 \pm 3$  года. Мужчин 27 (79%), женщин — 7 (21%). Причины возникновения ПН: приём алкоголя, желчнокаменная болезнь, травма поджелудочной железы, осложнение эндоскопической ретроградной панкреатикохолангиографии с эндоскопической папиллосфинктеротомией. Диагноз ИПН установлен на основании клинических данных, результатов УЗИ, МСКТ, общепринятых лабораторных показателей.

После установления диагноза ПН всем пациентам проводили анализ концентраций ЛЖК: уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой в крови методом ГХ. Подготовка образцов крови для хроматографии выполнена методом жидкостной экстракции диэтиловым

эфиром [13]. ГХ для количественного определения уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот выполняли на автоматизированном газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000» с капиллярной колонкой «НР-FFAP» Agilent Technologies (длина — 50 м; диаметр — 0,32 мм; толщина фазы — 0,5 мкм) и пламенно-ионизационным детектором; газ-носитель — гелий [15]. Идентификацию и количественное определение концентраций ЛЖК осуществляли при помощи аналитических стандартов и программного комплекса для обработки хроматографических данных «МультиХром». Продолжительность хроматографического анализа ЛЖК составляет 40-60 мин с момента доставки анализа в лабораторию. Рассчитывали сумму ЛЖК. Анаэробный индекс (АИ) рассчитывали путём деления суммы концентраций пропионовой, масляной, изовалериановой кислот на концентрацию уксусной кислоты.

Для статистического анализа применён специализированный пакет программ «Statistica 7.0» (StatSoft, Inc). Использованы следующие методы анализа: расчёт размера выборки на основе статистической мощности; проверка нормальности распределения количественных признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка; оценка значимости различий количественных признаков в независимых выборках с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Расчёт объёма выборки исследования, необходимого для достижения требуемой мощности, выполнен по показателю уксусной кислоты. Различия между группами считали значимыми при  $p < 0,05$ . Непараметрические статистические показатели: медиана, нижний, верхний квартили приведены в таблице.

**Результаты.** При обследовании у пациентов диагностирован различной степени распространённости ПН.

Для сравнения показателей ЛЖК у больных с ПН использованы концентрации ЛЖК практически здоровых доноров. Значения концентраций ЛЖК доноров: уксусная, пропионовая, масляная кислоты - 0,00100 ммоль/л, изовалериановая кислота — 0,00080 ммоль/л [12]. Используя эти данные, рассчитаны показатели суммы ЛЖК — 0,00380 и анаэробный индекс — 2,80000. При сравнении показателей ЛЖК крови у больных с ИПН со значениями практически здоровых доноров установлены более высокие показатели у больных с ИПН: уксусной кислоты в 100% проб, пропионовой кислоты в 100% проб, масляной кислоты в 100% проб, суммы ЛЖК в 100% проб и более низкие показатели: изовалериановой кислоты в 87% проб, анаэробного индекса в 100% проб. При сравнении показателей ЛЖК крови у больных с СПН со значениями практически здоровых доноров установлены более высокие показатели у больных с СПН: уксусной кислоты в 100% проб, пропионовой кислоты в 100% проб, масляной кислоты в 100% проб, суммы ЛЖК в 100% проб и более низкие показатели: изовалериановой кислоты в 100% проб, анаэробного индекса в 82% проб.

Для достижения 90% мощности исследования при уровне ошибки первого рода в 5% требуемый объём выборки составил 9 пациентов. Распределение концентраций ЛЖК отличается от нормального, поэтому для описания данных использованы непараметрические статистические показатели, для оценки значимости различий количественных признаков в независимых выборках использован непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Содержание ЛЖК (в ммоль/л) у больных с инфицированным и стерильным панкреонекрозом

| Показатели, ммоль/л        | Панкреонекроз        |                 |                  |                  |                 |                  |
|----------------------------|----------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|
|                            | инфицированный; n=23 |                 |                  | стерильный; n=11 |                 |                  |
|                            | Медиана              | Нижний квартиль | Верхний квартиль | Медиана          | Нижний квартиль | Верхний квартиль |
| уксусная кислота*          | 0,42000              | 0,20000         | 0,62000          | 0,02700          | 0,00800         | 0,06400          |
| пропионовая кислота*       | 0,03000              | 0,01400         | 0,04500          | 0,00560          | 0,00250         | 0,00630          |
| масляная кислота**         | 0,00430              | 0,00350         | 0,00540          | 0,00220          | 0,00100         | 0,00310          |
| изовалериановая кислота*** | 0,00036              | 0,00011         | 0,00056          | 0,00015          | 0,00003         | 0,00019          |
| сумма ЛЖК*                 | 0,44022              | 0,25456         | 0,63295          | 0,03684          | 0,01346         | 0,06832          |
| анаэробный индекс****      | 0,10431              | 0,04814         | 0,17091          | 0,36444          | 0,12208         | 0,95989          |

Примечание. Различия значимы: \* –  $p < 0,0001$ ; \*\* –  $p = 0,0002$ ; \*\*\* –  $p = 0,0159$ ; \*\*\*\* –  $p = 0,0009$ . U-критерий Манна-Уитни.

Сумма ЛЖК, анаэробный индекс, содержание уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой ЛЖК в крови больных с инфицированным ПН и больных со стерильным ПН представлены в таблице.

Показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше, анаэробный индекс статистически значимо ниже у больных с ИПН по сравнению с показателями ЛЖК больных с СПН.

**Обсуждение.** Для оптимизации диагностики и лечения панкреонекроза хирургам необходима быстрая дифференциация инфицированного и стерильного панкреонекроза для выбора адекватного консервативного и оперативного лечения [1,2].

Метод ГХ отличается от культурального исследования высокой чувствительностью и быстротой получения результата [13, 15].

Статистически значимые отличия показателей ЛЖК у больных с ИПН и СПН позволяют рекомендовать показатели ЛЖК крови для дифференциальной диагностики ИПН и СПН. При ИПН показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот, суммы ЛЖК превышают показатели доноров, что свидетельствует об участии патогенных и условно-патогенных бактерий в его патогенезе. При СПН показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот, суммы ЛЖК превышают показатели практически здоровых доноров, что позволяет предположить участие патогенных и условно-патогенных бактерий в его патогенезе.

Отличия показателей ЛЖК у больных с ИПН и СПН количественные, что позволяет предположить участие патогенных и условно-патогенных бактерий в патогенезе не только ИПН, но и СПН. Более высокие показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот, суммы ЛЖК показывают более высокое инфицирование патогенными и условно-патогенными бактериями у больных с ИПН по сравнению с больными со СПН.

#### Выводы:

Показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот, суммы ЛЖК выше, анаэробный индекс ниже у больных с ИПН по сравнению с показателями ЛЖК больных со СПН.

Показатели ЛЖК крови можно использовать для дифференциальной диагностики ИПН и СПН.

Превышение показателей уксусной, пропионовой, масляной кислот, суммы ЛЖК у больных со СПН по сравнению с показателями доноров, только количественные отличия показателей ЛЖК у больных с ИПН

и СПН позволяют предположить участие патогенных и условно-патогенных бактерий в патогенезе СПН.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 9-11, 14 см. REFERENCES)

1. Затевахин И.И., Кириенко А.И., Кубышкин В.А., ред. Абдоминальная хирургия. Национальное руководство: краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
2. Абдуллаев Э.Г., Бабышин В.В., Гусев А.В. Неотложная хирургия (Протоколы клинических рекомендаций по диагностике и лечению ОХЗ органов брюшной полости). Владимир: Изд-во ВлГУ; 2015.
3. Буткевич А.Ц., Истратов В.Г., Бровкин А.Е., Наливайский А.А., Рябков М.Г., Клычникова Е.В. Комплексная оценка тяжести и эффективности интенсивной терапии панкреонекроза. *Московский хирургический журнал*. 2014; 3: 28-32.
4. Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Метелев А.С. Клиническое значение показателей летучих жирных кислот крови для диагностики панкреонекроза. *Московский хирургический журнал*. 2018; 4: 20-4.
5. Иваненков И.М., Гагуа А.К., Акайзин Э.С. Возможности постоянной вено-венозной гемодиализации в комплексном лечении инфицированного панкреонекроза. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2014; 4: 84-5.
6. Гагуа А.К., Метелев А.С., Акайзин Э.С. Клиническое значение показателей летучих жирных кислот для диагностики панкреонекроза, осложнённого флегмоной забрюшинной клетчатки. *Хирургическая практика*. 2018; 3: 5-9.
7. Метелев А.С., Акайзин Э.С., Гагуа А.К. Сравнительное исследование летучих жирных кислот в крови и в отделяемом панкреатических свищей при панкреонекрозе. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2018; 4: 232-6.
8. Ермолов А.С., Иванов П.А., Благовестнов Д.А., Гришин А.А. Диагностика и лечение острого панкреатита. М.: Видар; 2013.
12. Истратов В.Г., Миронов А.Ю., Руднева В.Г., Горшенина И.Ю., Воробьев А.А. Изучение патогенетических механизмов интоксикации у больных анаэробной неклостридиальной инфекцией. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 1996; 2: 41-3.
13. Акайзин Э.С., Кулагин В.Ф., Слюсар С.Г. Экспресс-диагностика возбудителей гнойной инфекции и быстрая оценка эффективности лечения у больных с осложненной травмой. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 1997; 2(4): 17-20.
15. Акайзин Э.С., Акайзина А.Э. Летучие жирные кислоты у детей с дисфункцией билиарного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (2): 112-5.
16. Акайзин Э.С., Кулагин В.Ф. Анализ количественного содержания летучих жирных кислот в диагностике гнойной инфекции у больных с осложнённой травмой и в оценке эффективности лечения. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2017; 4: 57-8.
17. Алёшкин В.А., Афанасьев С.С., Караулов А.В., Воропаева Е.А.,

- Афанасьев М.С., Алёшкин А.В. и др. Микробиоценозы и здоровье человека. М.: Династия; 2015.
18. Алёшкин В.А., Селькова Е.П., Затевалов А.М., Миронов А.Ю., Волчецкий А.Л., Гудова Н.Н. Федеральные клинические рекомендации. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье; 2016.
19. Миронов А.Ю. Газовая хроматография и масс-спектрометрия в диагностике анаэробов. *Альманах клинической медицины*. 2012; 26: 45-51.
20. Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Вальков К.С. Использование летучих жирных кислот для экспресс-диагностики анаэробной неклостридиальной инфекции при гнойном холангите у больных механической желтухой. *Московский хирургический журнал*. 2016; 2: 23-7.
21. Вальков К.С., Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Алексахина Е.Л. Динамика показателей летучих жирных кислот, цитруллина и малонового диальдегида в комплексной оценке печёночной недостаточности у больных механической желтухой с гнойным холангитом. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2016; 2: 40-5.
22. Герасименко С.С., Шияев Р.Р., Акайзин Э.С. Диагностика омфалитов у новорожденных, протекающих с участием анаэробной микрофлоры. *Вестник новых медицинских технологий*. 2008. 15(2): 112-3.
23. Покровский Е.Ж., Станкевич А.М., Акайзин Э.С. Диагностическое значение содержания летучих жирных кислот в крови и экссудате брюшной полости при распространённом перитоните. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2012; 2: 45-7.
24. Миронов А.Ю., Митрохин С.Д., Ардатская М.Д., Шевцов В.В., Жакот А.Н. Диагностическое и прогностическое значение метаболитов микрофлоры в различных биосубстратах у больных раком лёгкого и ХОБЛ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 9: 83-4.
25. Миронов А.Ю., Зур Н.В. Молекулярные маркеры патогенов. М.: ООО Тираж; 2013.
26. Ардатская М.Д., Шевцов В.В., Жакот А.Н., Феданков И.Н., Митрохин С.Д., Миронов А.Ю. и др. Метаболиты микрофлоры различных биотопов при заболеваниях бронхолегочной системы. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 103(3):46-54.
27. Затевалов А.М., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Селькова Е.П., Миронов А.Ю., Гречишников О.Г. Референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов ОРИТ без респираторной патологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(3): 153-7.
28. Затевалов А.М., Селькова Е.П., Афанасьев С.С., Алёшкин А.В., Миронов А.Ю., Гусарова М.П. и др. Оценка степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника с помощью методов математического моделирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 117-21.
29. Урсу Т.Н., Чемоданов В.В., Шниткова Е.В., Акайзин Э.С. Особенности моторно-эвакуаторной функции пищеварительного тракта у новорожденных детей. *Практическая медицина*. 2012. 5(60): 62-4.
30. Акайзин Э.С., Гагуа А.К., Метелев А.С. Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике гнойных осложнений панкреонекроза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 12: 750-5.
- the severity and the effectiveness of intensive therapy of pancreatic necrosis. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2014; 3: 28-32. (in Russian)
4. Gagau A.K., Akayzin E.S., Metelev A.S. The clinical significance of volatile fatty acids for the diagnosis of pancreatic necrosis. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2018; 4: 20-4. (in Russian)
5. Ivanenkov I.M., Gagau A.K., Akayzin E.S. The possibilities of permanent veno-venous hemodiafiltration in complex treatment for infected pancreonecrosis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2014; 4: 84-5. (in Russian)
6. Gagau A.K., Metelev A.S., Akayzin E.S. The clinical significance of volatile fatty acid indicators for the diagnosis of pancreatic necrosis complicated by retroperitoneal cellulitis. *Khirurgicheskaya praktika*. 2018; 3: 5-9. (in Russian)
7. Metelev A.S., Akayzin E.S., Gagau A.K. Comparative study of volatile fatty acids in the blood and in the separated pancreatic fistula in pancreatic necrosis. *Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii*. 2018; 4: 232-6. (in Russian)
8. Yermolov A.S., Ivanov P.A., Blagovestnov D.A., Grishin A.A. Diagnosis and treatment of acute pancreatitis. [Diagnostika i lecheniye ostrogo pankreatita]. Moscow: Vidar; 2013. (in Russian)
9. Sarr M.G., Banks P.A., Bollen T.L., Dervenis C., Gooszen H.G., Johnson C.D., Vege S.S. The New Revised Classification of Acute Pancreatitis 2012. *Surgical Clinics of North America*, 2013; 93 (3): 549-62.
10. Dellinger E.P., Forsmark C.E., Laver P., Levy P., Maravi-Poma E., Petrov M.S. [et al.] Determinant-based classification of acute pancreatitis severity: an international multidisciplinary consultation. *Ann. Surg.* 2012; 256 (6): 875-80.
11. Garg P.K., Sharma M., Madan K., Sahni P., Banerjee D., Goyal R. Primary conservative treatment results in mortality comparable to surgery in patients with infected pancreatic necrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 8 (12):1089-94.
12. Istratov V.G., Mironov A.Yu., Rudneva V.G., Gorshenina I.Yu., Vorobev A.A. Study of pathogenetic mechanisms of intoxication in patients with anaerobic nonclostridial infection. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 1996; 2: 41-3. (in Russian)
13. Akaizin E.S., Kulagin V.F., Slyusar S.G. Rapid diagnosis of pathogens of purulent infection and rapid assessment of the effectiveness of treatment in patients with complicated trauma. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 1997; 2(4): 17-20. (in Russian)
14. Den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D.J., Bakker B.M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013; 54 (9): 2325-2340.
15. Akaizin E.S., Akaizina A.E. The volatile fatty acids in children with dysfunction of biliary tract. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(2): 112-5. (in Russian)
16. Akaizin E.S., Kulagin V.F. Clinical significance of volatile fatty acids examination in wound discharge in patients with complicated trauma and in assessing the effectiveness of treatment. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2017; 4: 57-8. (in Russian)
17. Aleshkin V.A., Afanas'yev S.S., Karaulov A.V., Voropayeva E.A., Afanas'yev M.S., Aleshkin A.V. i dr. Microbiocenosis and human health. [Mikrobiotsenoz i zdorov'ye cheloveka]. Moscow: Dinastiya; 2015. (in Russian)
18. Aleshkin V.A., Sel'kova E.P., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu., Volchetskiy A.L., Gudova N.N. Federal clinical guidelines. Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal tract by markers of intestinal contents. [Federal'nyye klinicheskiye rekomendatsii. Opredeleniye disbioticheskikh izmeneniy zheludочно-kishechnogo trakta po markéram soderzhimogo kishechnika]. Nizhniy Novgorod: Remedium Privolzh'ye; 2016. (in Russian)
19. Mironov A.Yu. Gas chromatography and mass spectrometry in diagnosis anaerobes. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2012; 26: 45-51. (in Russian)
20. Gagau A.K., Akayzin E.S., Val'kov K.S. The use of volatile fatty acids for the rapid diagnosis of anaerobic non-clostridial infection with purulent cholangitis in patients with obstructive jaundice. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2016; 2: 23-7. (in Russian)

## REFERENCES

1. Zatevakhin I.I., Kiriyaenko A.I., Kubyshkin V.A., eds. Abdominal surgery. National Leadership: Short Edition [Abdominal'naya khirurgiya. Natsional'noye rukovodstvo: kratkoye izdaniye]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
2. Abdullayev E.G., Babyshin V.V., Gusev A.V. Emergency surgery (Protocols of clinical guidelines for the diagnosis and treatment of TSS abdominal organs) [Neotlozhnaya khirurgiya (Protokoly klinicheskikh rekomendatsiy po diagnostike i lecheniyu OKHZ organov bryushnoy polosti)]. Vladimir: Izd-vo VIGU; 2015. (in Russian)
3. Butkevich A.T.S., Istratov V.G., Brovkin A.E., Nalivayskiy A.A., Ryabkov M.G., Klychnikova E.V. Comprehensive assessment of

21. Valkov K.S., Gagua A.K., Akaizin E.S., Aleksakhina E.L. The dynamics of the indices of volatile fatty acids, citrulline and malondialdehyde in the complex evaluation of hepatic insufficiency in patients with mechanical jaundice and purulent cholangitis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2016; 2: 40-5. (in Russian)
22. Gerasimenko S.S., Shilyayev R.R., Akaizin E.S. Diagnosis of omphalytes in newborns taking an anaerobic microflora. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2008. 15(2): 112-3. (in Russian)
23. Pokrovskiy E.Zh., Stankevich A.M., Akaizin E.S. Diagnostic significance of volatile fatty acids content in blood and abdominal cavity exudate in disseminated peritonitis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2012; 2: 45-7. (in Russian)
24. Mironov A.Yu., Mitrokhin S.D., Ardatskaya M.D., Shevtsov V.V., Zhakot A.N. Diagnostic and prognostic value of various metabolites biosubstrates microflora in patients with lung cancer and COPD. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 9: 83-4. (in Russian)
25. Mironov A.Yu., Zur N.V. Molecular markers of pathogens. [Molekulyarnyye markory patogenov]. M.: OOO Tirazh; 2013. (in Russian)
26. Ardatskaya M.D., Shevtsov V.V., Zhakot A.N., Fedankov I.N., Mitrokhin S.D., Mironov A.Yu. et al. Metabolites of microflora of different habitats at the diseases of respiratory system. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2014; 103(3):46-54. (in Russian)
27. Zatevalov A.M., Gudova N.V., Oganessian A.S., Selkova E.P., Mironov A.Y., Grechishnikova O.G. Reference values of short-cellular fatty acids in saliva in intensive care unit patients without respiratory pathology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(3): 153-7. (in Russian)
28. Zatevalov A.M., Sel'kova E.P., Afanas'yev S.S., Alëshkin A.V., Mironov A.Yu., Gusarova M.P. et al. Assessment of microbiological disorders oropharyngeal and intestinal microflora using methods of mathematical modeling. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(2): 117-21. (in Russian)
29. Ursu T.N., Chemodanov V.V., Shnitkova E.V., Akaizin E.S. The peculiarities of motor and evacuator function of digestive tract in neonates. *Prakticheskaya meditsina*. 2012. 5(60): 62-4. (in Russian)
30. Akayzin E.S., Gagua A.K., Metelev A.S. Indicators of volatile fatty acids in the differential diagnosis of purulent complications of pancreatic necrosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 12: 750-5. (in Russian)

Поступила 10.10.19

Принята к печати 14.10.19

## ЦИТОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Круглова И.А.<sup>1</sup>, Зиновьев С.В.<sup>2</sup>, Уткин О.В.<sup>3</sup>, Денисенко А.Н.<sup>1</sup>, Ильинская О.Е.<sup>4</sup>, Москвичев М.А.<sup>5</sup>

### ЦИФРОВОЕ ИЗОБРАЖЕНИЕ В ПРАКТИКЕ ЦИТОЛОГА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

<sup>1</sup>ГБУЗ «Городская больница №35», 603089, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603950, Нижний Новгород, Россия;

<sup>3</sup>ФБун «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохина» Роспотребнадзора, 603005, Нижний Новгород, Россия;

<sup>4</sup>ГБУЗ Нижегородской области «Нижегородский областной онкологический диспансер», 603081, Нижний Новгород, Россия;

<sup>5</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана», 105005, Москва,

*Цитологическое исследование является высокоспециализированным видом лабораторного анализа клеточного состава биологического материала и заключается в оценке морфологических характеристик клеточных элементов. Современное развитие цифровых технологий все больше формирует интерес специалистов к такому разделу как цифровая патология, представляющему собой процесс виртуальной микроскопии с преобразованием классических цитологических препаратов в цифровые. Большинство морфологов в настоящее время используют некоторые формы цифровых изображений, такие как статические изображения, полученные с помощью оптических камер, установленных под микроскопом. Развитие более высокого качества изображения и разрешения в рамках цифровой патологии способствует использованию телепатологии, в том числе телецитологии в повседневной работе для обучения специалистов, консультации препаратов, проведения контроля качества постановки диагноза.*

**Ключевые слова:** цитологическая диагностика по цифровым препаратам; телемедицинские технологии; телепатология, виртуальный препарат; цифровое изображение; виртуальная микроскопия; информационные технологии в здравоохранении.

**Для цитирования:** Круглова И.А., Зиновьев С.В., Уткин О.В., Денисенко А.Н., Ильинская О.Е., Москвичев М.А. Цифровое изображение в практике цитолога: экспериментальное исследование. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 649-653 DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-649-653>

Kruglova I. A. <sup>1</sup>, Zinoviev S. V. <sup>2</sup>, Utkin O. V. <sup>3</sup>, Denisenko A. N. <sup>1</sup>, Ilyinskaya O. E. <sup>4</sup>, Moskvichev M. A. <sup>5</sup>

#### A DIGITAL IMAGE IN THE PRACTICE OF CYTOLOGY: A PILOT STUDY

<sup>1</sup> State budgetary institution of health care «City hospital No. 35», 603089, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>2</sup> Federal state budgetary educational institution of higher professional education «Privolzhskiy Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 603950, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>3</sup> Federal budgetary institution of science «Nizhny Novgorod research Institute of epidemiology and microbiology. academician I. N. Blokhina» Rospotrebnadzor, 603006, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>4</sup> State budgetary institution of health care of the Nizhny Novgorod region «Nizhny Novgorod regional oncological clinic», 603081, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>5</sup> Federal state budgetary educational institution of higher education «Bauman Moscow state technical University», 105005, Moscow, Russia

*Cytological study is a highly specialized type of laboratory analysis of the cellular composition of biological material and is to assess the morphological characteristics of cellular elements. The modern development of digital technologies is increasingly forming the interest of specialists to such a section as telepathology (digital pathology), which is a process of virtual microscopy with the transformation of classical cytological preparations into digital. Most morphologists currently use some forms of digital imaging, such as static images obtained by optical cameras mounted under a microscope. The development of more high quality image and resolution in the digital pathology promotes the use of telepathology, including telecitology in their daily work for training specialists, counselling of medications, monitoring the quality of diagnosis.*

**Key words:** cytological diagnostics on digital preparations; telemedicine technologies; telepathology; virtual preparation; digital image; virtual microscopy; information technologies in health care.

**For citation:** Kruglova I. A., Zinoviev S. V., Utkin O. V., Denisenko A. N., Ilyinskaya O. E., Moskvichev M. A. Digital image in the practice of Cytology: a pilot study. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 649-653 (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-649-653>

**For correspondence:** Kruglova I.A., clinical laboratory diagnostics doctor (cytologist) of clinical diagnostic laboratory; e-mail: [irisha-kruglova@yandex.ru](mailto:irisha-kruglova@yandex.ru)

**Для корреспонденции:** Круглова Ирина Александровна, врач клинической лабораторной диагностики (цитолог) клинко-диагностической лаборатории; e-mail: [irisha-kruglova@yandex.ru](mailto:irisha-kruglova@yandex.ru)

**Information about authors:**

Kruglova I. A. <https://orcid.org/0000-0001-7955-349X>  
Denisenko A. N. [https://elibrary.ru/autor\\_items.asp?authorid=16069](https://elibrary.ru/autor_items.asp?authorid=16069)  
Zinoviev, S. V. <https://orcid.org/0000-0003-1037-2601>  
Utkin O. V. <https://orcid.org/0000-0002-0941-9890>  
Ilyinskaya O. E. <https://orcid.org>  
Moskvichev A. M. <https://orcid.org/0000-0002-3823-0528>

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 10.10.2019  
Accepted 14.10.2019

**Введение.** Цитологическое исследование является высокоспециализированным видом лабораторного анализа, позволяющего осуществлять морфологическую оценку клеточного состава биологического материала. Современное развитие цифровых технологий формирует все больший интерес среди цитологов к цифровой патологии (телепатологии), базирующейся на симбиозе виртуальной микроскопии с цифровизацией классических цитопрепаратов.

Цифровизация представляет собой создание, хранение и передачу файла изображения с использованием компьютера и является будущим анатомической патологии [9]. Уже сейчас большинство морфологов используют некоторые формы цифровых изображений, например, статические изображения, полученные с помощью оптических камер интегрированных с микроскопом [2,3,7,8]. Получение изображений более высокого качества и разрешения способствовало развитию телепатологии и некоторых ее разделов, включая телецитологию, уже используемую для цитологической экспресс-диагностики, а также в качестве инструмента оценки корректности поставленного диагноза [5-9].

Технической основой телепатологии являются устройства для оцифровки изображений цитопрепаратов, к которым относятся сканеры, сканирующие и онлайн микроскопы. Очевидно, что для постановки точного диагноза в нетривиальных клинических случаях только статичных фотографий микропрепаратов недостаточно, при этом использование онлайн микроскопов не позволяет проводить анализ нескольким профильным специалистам одновременно. Такая ситуация привела к доминированию сканирующих микроскопов и панорамных изображений микропрепаратов. Тотальная визуализация слайда основана на процессе сканирования всего предметного стекла и преобразовании полученных данных в цифровое изображение высокого разрешения, которое просматривается, анализируется и редактируется на компьютере [10-11]. Правильность интерпретации оцифрованного препарата зависит не только от качества оптики сканирующего микроскопа и квалификации патолога, но и подготовки цитопрепарата на преаналитическом этапе исследования. Наиболее распространенными методиками подготовки цитологических препаратов являются традиционный и жидкостный методы [1-4].

**Цель:** оценить точность постановки диагноза с помощью цифровых изображений, а также определить их преимущества и недостатки в ходе работы с ними в рутинной клинической практике.

**Материал и методы.** Проанализировано 128 образцов биологического материала, в качестве которого использовали промывные воды с поверхности мочевого

пузыря. Весь исследуемый материал был разделен на три группы: неопластические цитопрепараты ( $n=34$ ), цитопрепараты без патологии ( $n=71$ ), цитопрепараты с патологией отличной от онкозаболеваний ( $n=23$ ). Цитоморфологическое исследование было проведено с помощью сканера Aperio CS2 (Leica, Германия), используемое увеличение  $\times 200$ . В случае невозможности морфологической оценки часть цитопрепаратов была отсканирована при увеличении  $\times 400$ . В дальнейшем все цитопрепараты были охарактеризованы на светооптическом уровне с использованием микроскопа Zeiss Primo Star (Carl Zeiss, Германия) на увеличении  $\times 100-200$ . При недостаточности указанного увеличения цитологу предлагалось использовать увеличение в диапазоне  $\times 400-1000$ . В качестве критериев оценки использовались следующие параметры: время, затраченное на одно исследование, качество подготовленных цитопрепаратов (монослойность, адекватность окраски), возможность оценки клеточных включений и пигмента, а также оценки структуры хроматина и контуров ядерной мембраны. Окраска цитопрепаратов проводилась по методу Романовского. Критерием эффективности считалось число совпадений диагноза в ходе оценки цитопрепарата в реальном времени с помощью микроскопа и в цифровом виде. Все патологические процессы были подтверждены гистологически.

**Результаты.** Анализ результатов просмотра цифровых изображений при увеличении сканера  $\times 200$  распределил медицинские заключения следующим образом (рис. 1): без патологии – 48,3%, с реактивными изменениями – 20,3%, доброкачественные новообразования – 24,7%, злокачественные новообразования – 4,3%, без диагноза – 2,4%. Трудности в интерпретации возникли в 15,8% случаев (20 цитопрепаратов). При повторном сканировании цитопрепаратов с трудностями в постановке диагноза использование увеличения сканера  $\times 400$  позволило повысить процент случаев с установленным диагнозом до 85%. Точность диагностики по цифровым цитопрепаратам в случае использования увеличения  $\times 200$  составила 84,2%, а для увеличения  $\times 400$  достигла 97,6%.

На следующем этапе оценивалось время, затраченное на проведение одного исследования, которое включало в себя окраску и просмотр цитопрепарата. Установлено, что на проведение одного цитологического анализа требуется от 35 до 60 минут. Получение цифрового изображения (загрузка сканера, сканирование цитологического препарата, сохранение изображения на электронный носитель) было реализовано в пределах 13 мин в случае использования увеличения сканера  $\times 200$ , а при использовании увеличения  $\times 400$  за 21 минуту.

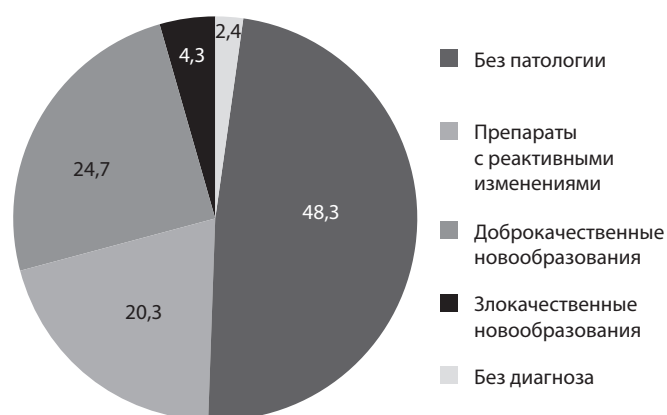


Рис. 1. Распределение заключений после просмотра цитологических препаратов в виде цифровых изображений.

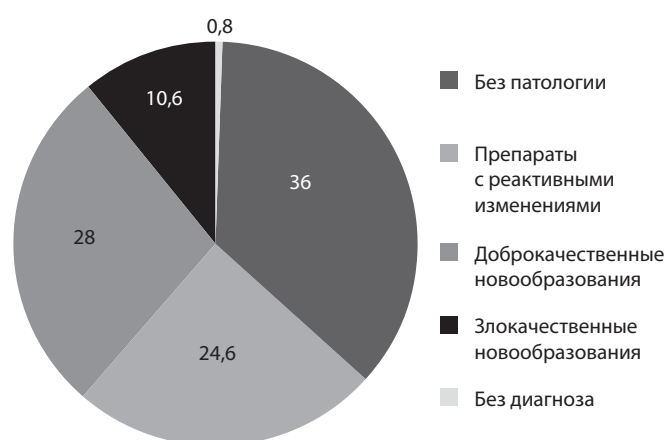


Рис. 2. Распределение заключений после просмотра цитологических препаратов с использованием классической микроскопии.

По результатам просмотра цитопрепаратов в реальном времени с использованием микроскопа (рис. 2) медицинские заключения распределились следующим образом: без патологии – 36%, с реактивными изменениями – 24,6%, доброкачественные новообразования – 28%, злокачественные новообразования – 10,6%, без диагноза – 0,8%. Сложности с просмотром цитопрепаратов возникли в 11,3% случаев (14 цитопрепаратов). Использование более высокого увеличения позволило добиться повышения процента диагностированных случаев до 93%. Точность цитологической диагностики при классической микроскопии с использованием увеличения  $\times 200$  составила 88,7%, а при использовании увеличения в диапазоне  $\times 400-1000$  – 99,2%. При этом время, затраченное на одно полноформатное цитологическое исследование, включающее в себя окраску и просмотр цитопрепарата, составляло от 20 до 40 минут.

К особенностям цифровых изображений цитологических препаратов (рис.3, а,б, см.обложку) по сравнению с анализом таковых до оцифровки (рис.4, а,б, см.обложку) можно отнести изменение оттенка окраски клеток, отсутствие четкости изображения многослойных структур, т.е. невозможность изменить фокальную плоскость просмотра участков препарата, сглаженность рисунка хроматина, снижение разрешения при повышении виртуального увеличения.

Стоит отметить, что время, необходимое на интерпретацию цифровых изображений, превышает таковое при классической микроскопии в 1,5 раза.

В дальнейшем нами проведена гистологическая верификация, по результатам которой медицинские заключения распределились следующим образом: без патологии – 40,7%, с реактивными изменениями – 24,1%, доброкачественные новообразования – 22,3%, злокачественные новообразования – 12,9%. Сравнивая результаты, полученные в ходе анализа цифровых цитопрепаратов на увеличении  $\times 200$  с данными гистологического исследования (рис.5), являющегося «золотым стандар-

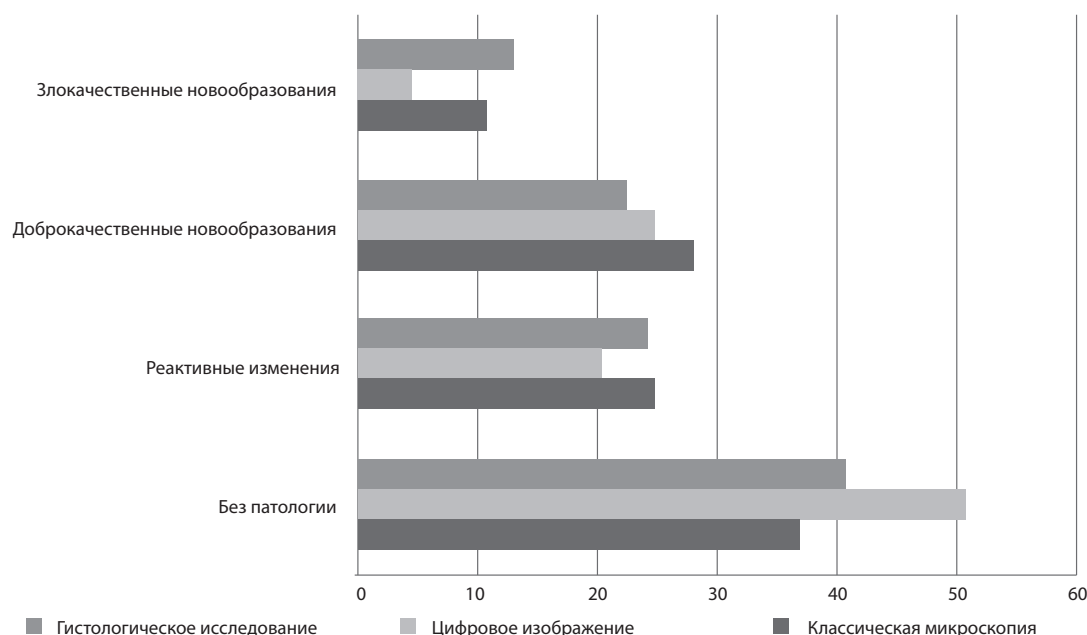


Рис.5. Диагностическая точность анализа цифровых и классических изображений в сравнении с результатами гистологического исследования. Ув.  $\times 200$ .

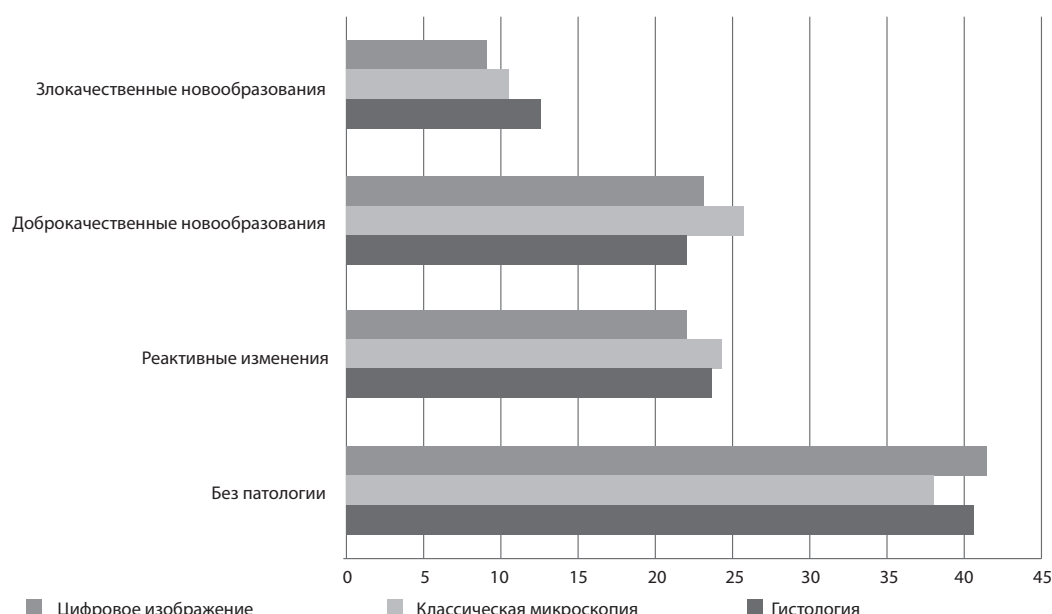


Рис.6. Диагностическая точность анализа цифровых и классических изображений в сравнении с результатами гистологического исследования. Ув.  $\times 400$ .

том» точности, обнаружены наибольшие расхождения в группе злокачественных новообразований, что обусловлено низким разрешением оцифрованных изображений. При классической микроскопии полученные результаты практически полностью совпадают с гистологическим заключением.

Важно, что использование увеличения сканера  $\times 400$  приводило к заметному повышению точности диагностики при анализе цифровых изображений, соответствующей таковой при классической микроскопии и практически полностью совпадала с результатами гистологического анализа (рис.6).

Таким образом, использование телемедицинских технологий в практике цитолога имеет ряд преимуществ и недостатков. К положительным аспектам с полным основанием можно отнести возможность участия в дистанционных мероприятиях (обучение, телеконференции, консультации), создание цифровых архивов и баз данных. Среди недостатков на первый план выходят технические погрешности, связанные с невозможностью изменения плоскости просмотра, нарушения цветопередачи, снижении резкости изображения при повышении виртуального увеличения, которые напрямую зависят от характеристик оборудования. Среди относительных недостатков на себя обращает внимание более высокое время пробоподготовки и анализа цитопрепарата. При этом точность морфологической диагностики в нашей работе составила 97,6% при анализе цифровых изображений, а при классической микроскопии 99,2%. Процент совпадений при сопоставлении результатов анализа цифровых изображений и классической микроскопии составил 98,4%.

**Заключение.** Визуализация всего слайда имеет много потенциальных возможностей применения в цитопатологии, таких как образование, анализ изображений, диагностика, документирование отчетов, дистанционная консультация, телецитология, совместная работа с

опухолями, контроль качества, архивирование вне консультации и архивирование стандартных случаев. Интерпретация цифровых изображений цитологических препаратов более длительна по времени и зависит от технических характеристик оборудования, а также от используемого увеличения при сканировании. Точность цитологической диагностики по цифровым изображениям практически не уступает таковой при анализе изображений, полученных с помощью классической микроскопии. Конечно, нельзя исключать тот факт, что большинство специалистов исходно обучались и работали в области классической микроскопии. С этим может быть связана более длительная интерпретация результатов цифровых изображений. Учитывая тенденции развития медицины, а именно дистанционных средств оказания помощи, необходимо учесть элементы телепатологии (телецитологии) в программах обучения профильных специалистов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА : (пп. 7-13 см. REFERENCES)

1. Джангирова Т.В., Шабалова И.П., Соломенцева О.Д. Цитологическая диагностика по видеоизображениям. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999; 8: 52.
2. Орлов О. И., Камаев И. А., Леванов В. М., Сергеев Д. В. Телемедицина. Опыт проведения научных Видео конференций. *Современные технологии в медицине*. 2009;2: 67-71.
3. Петровичев Н.Н., Шабалова И.П., Соколова В.К. и др. Возможности цитологической диагностики в статическом режиме телепатологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999;2: 21-4.
4. Лазарев А.Ф., Григорук О.Г, Герасименко И.Н., Лесничев А.Г., Петрова В.Д., Сигитова Е.С., Базулина Л.М, Фролова Т.С. Телемедицина как перспективное направление диагностики онкологических заболеваний. *Сибирский онкологический журнал*. 2002; 3-4: 146-9.

5. Шабалова И.П., Петровичев Н.Н. Интерактивные цитологические программы и телепатология (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999; 8: 23-5.
6. Шапиро Н.А. Телецитология – новое в работе центральной цитологической лаборатории ЦКБ департамента здравоохранения МПСРФ. *Новости клинической цитологии России*. 2000; 3-4: 93-102.
7. Alli P.M., Ollayos C.W., Thompson L.D. et al. Telecytology: intraobserver and interobserver reproducibility in the diagnosis of cervical-vaginal smears. *Human pathology*. 2001; 32 (12):1318-22.
8. Eichhorn JH, Brauns TA, Gelfand JA, Crothers BA, Wilbur DC. A novel automated screening and interpretation process for cervical cytology using the internet transmission of low-resolution images: a feasibility study. *Cancer*. 2005; 105(4):199-206.
9. Lee ES, Kim IS, Choi JS, et al. Accuracy and reproducibility of telecytology diagnosis of cervical smears: a tool for quality assurance programs. *American Journal of Clinical Pathology*. 2003; 119(3):356-60.
10. O'Brien MJ, Takahashi M, Brugal G, et al. Digital imagery/telecytology: International Academy of Cytology Task Force summary: Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: an international expert conference and tutorial. *Acta Cytologica*. 1998; 42(1):148-64.
11. Wright AM1, Smith D, Dhurandhar B, Fairley T, Scheiber-Pacht M, Chakraborty S, Gorman BK, Mody D, Coffey DM. Digital slide imaging in cervicovaginal cytology: a pilot study. *The Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2013; 137(5):618-24.
12. Al-Janabi S, Huisman A, Vink A, et al. Whole slide images for primary diagnostics of gastrointestinal tract pathology: a feasibility study. *Human pathology*. 2012; 43(5):702-7.
13. Wilbur DC, Madi K, Colvin RB, et al. Whole-slide imaging digital pathology as a platform for teleconsultation: a pilot study using paired subspecialist correlations. *The Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2009; 133(12):1949-53.
1. Dzhangirova T. V., Shabalova I. P., O. D. Solomentsev Cytological diagnosis according to the video. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 8: 52. (in Russian)
2. Orlov O. I., Kamaev I. A., Levanov V. M., Sergeev D. V. Telemedicine. Experience of scientific Video conferences. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2009; 2: 67-71. (in Russian)
3. Petrovichev N.N., Shabalova I. P., Sokolov V. K., and others cytological diagnosis in static telepathology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 2: 21-4. (in Russian)
4. Lazarev A. F., Grigoruk O. G., Gerasimenko I. N., Lesnichi A. G., Petrova V. D., Sigitova E. S., Bazulina L. M., Frolova T. S. Telemedicine as a promising area of cancer diagnosis. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2002; 3-4: 146-9. (in Russian)
5. Shabalova I. P., Petrovichev N. N. Interactive cytological programs and telepathology (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 8: 23-5. (in Russian)
6. Shapiro N. And.Teleitalia – novoobrazovannoj CDB cytological laboratory of the Department of health NSRF. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii*. 2000; 3-4: 93-102. (in Russian)

Поступила 10.10.19  
Принята к печати 14.10.19

## ИММУНОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Акиншина Ю.А.<sup>1</sup>, Никитина А.В.<sup>1</sup>, Амелина Е.А.<sup>1</sup>, Марданлы С.Г.<sup>1,2</sup>.

### ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Д-ДИМЕРА

<sup>1</sup>ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;

<sup>2</sup>Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской обл., 142611, г. Орехово-Зуево Московской обл., Россия

*В работе представлены результаты создания и апробации иммунохроматографической тест-системы для качественного определения D-димера. Оценка теста проводилась на образцах плазмы крови в сравнении с количественным иммуноферментным анализом (ИФА). Разработанная тест-система обеспечивала совпадение результатов с ИФА в 87,1% и в 100% случаев - для образцов с повышенной (более 400 нг/мл ФЭЕ) и нормальной концентрацией D-димера соответственно. Иммунохроматографический тест для определения D-димера может быть включен в диагностическую стратегию как исключающий тест после оценки клинической вероятности венозных тромбозов.*

**Ключевые слова:** иммунохроматографический анализ; ИХА; D-димер; иммуноферментный анализ; диагностика; тромбоз.

**Для цитирования:** Акиншина Ю.А., Никитина А.В., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для определения D-димера. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 654-658. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-654-658>

Akinshina Yu.A.<sup>1</sup>, Nikitina A.V.<sup>1</sup>, Amelina E.A.<sup>1</sup>, Mardanly S.G.<sup>1,2</sup>.

#### IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR DETERMINATION OF D-DIMER

<sup>1</sup>CJSC "EKOLab", 142530, Elektrogorsk, Moscow region;

<sup>2</sup>State educational institution of higher education of the Moscow region;  
State Humanitarian University of Technology "GGTU", 142611, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region

*The developing and the testing results of an immunochromatographic test for the D-dimer qualitative determination were presents in the article. The test was approved blood plasma samples in comparison with a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results of assay with developed test were the same with ELISA results for 87,1% and 100% for samples with increased (more than 400 ng/ml FEU) and normal concentration of D-dimer, respectively. The immunochromatographic test for determination of D-dimer can be included in the diagnostic strategy as a cut test after the assessment of venous thromboembolism risk.*

**Key words:** immunochromatographic assay; ICA; D-dimer; enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA; diagnostics, thrombosis.

**For citation:** Akinshina Ju.A., Nikitina A.V., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for determination of D-dimer. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 654-658 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0969-2084-2019-64-11-654-658>

**For correspondence:** Akinshina Yulia Aleksandrovna, specialist of the Innovative Development Department CJSC EKOLab; e-mail: [akinshina.opr@mail.ru](mailto:akinshina.opr@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 15.09.2019  
Accepted 10.10.2019

**Введение.** Венозная тромбоземболия (ВТЭ), к которой относят тромбоз глубоких вен и тромбоземболию легочных артерий остается важнейшей проблемой клинической медицины, что обусловлено чрезвычайно высоким риском для здоровья и жизни пациентов [1,6,8,13]. До 34% смертей, связанных с ВТЭ, наступают в связи с внезапной тромбоземболией, более половины этих случаев диагностируются посмертно [2,9]. Среди наиболее зна-

чимых факторов риска развития ВТЭ выделяют хирургическое вмешательство, травмы, длительную иммобилизацию, беременность, пожилой и старческий возраст, онкологию различной локализации [7,14].

В связи с вышесказанным своевременная диагностика ВТЭ приобретает первостепенное значение [5,12]. Отсутствие патогномичных симптомов ВТЭ обуславливает необходимость инструментальной диагностики, так же как и для исследования спинномозговой жидкости [3]. Однако недоступность такой диагностики в условиях неотложных состояний и в каждодневной практике, а также частота получаемых отрицательных результатов являются причиной использования тестов для обнару-

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, специалист отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб», [akinshina.opr@mail.ru](mailto:akinshina.opr@mail.ru)

жения маркеров тромбообразования, наиболее ценным из которых является D-димер [2]. D-димеры - продукты распада фибринового сгустка и неотъемлемый показатель прошедшей активации системы коагуляционного гемостаза, а их высокая концентрация в крови – непереносимое следствие тромботического состояния [10]. Определение D-димеров считается необходимым звеном диагностики венозной тромбоэмболии и включается в валидированный диагностический алгоритм после оценки клинической претестовой вероятности развития ВТЭ [1,10].

D-димер не является высокоспецифичным маркером, поэтому обнаружение его в повышенных концентрациях должно подтверждаться инструментальными методами диагностики. Однако высокая чувствительность D-димера (95-98%) определяет его важнейшее отрицательное предиктивное значение, позволяющее исключить тромбозы любой локализации при выявлении D-димера ниже порогового уровня [11,12].

Концентрацию D-димера определяют различными методами, и результаты, полученные с помощью них, могут отличаться. Это связано с различной эпитопной специфичностью антител, используемых в тестах, отсутствием единого калибратора и международного стандарта, возможностью использования двух единиц измерения D-димера [10]. Наиболее широко применяемой является фибриноген-эквивалентная единица (FEU, ФЭЕ), когда калибратором являются продукты деградации фибрина. Если в качестве калибратора используют очищенный D-димер, то результаты измеряются в единицах D-димера (DDU, ДДЕ). В зависимости от выбранного калибратора и по результатам апробации метода на клиническом материале каждый производитель устанавливает свой уровень порогового значения [12].

В лабораторной диагностике D-димера успешно применяются экспрессные и недорогие методы, способные с высокой точностью исключить ВТЭ во внебольничных условиях, не требующие специализированного оборудования. В связи с этим целью нашей работы являлась разработка иммунохроматографического теста для определения D-димера в образцах плазмы крови человека и оценка возможности его применения в сравнении с иммуноферментным анализом (ИФА).

**Материал и методы.** Иммунохроматографический анализ. В работе использовались мышиные моноклональные антитела к D-димеру человека (ООО «Биалекса», Москва) для тестовой зоны и козы антитела к IgG мыши («Имтек», Москва) для зоны контроля. В качестве калибратора для предварительного подбора концентраций антител в контрольной и тестовой линий с целью достижения необходимой чувствительности теста (400 нг/мл ФЭЕ) использовали рекомбинантный антиген D-димера (ООО «Биалекса») с известной концентрацией.

Изготовление иммунохроматографических тестов проводилось, как было описано ранее [4].

**Исследуемые образцы.** С помощью полученных тестов были исследованы образцы плазмы пациентов в возрасте старше 60 лет, пребывающих в различных ЛПУ Люберецкого района ( $n=622$ ). Все образцы были разделены на 3 группы:

I группа: 60-70 лет ( $n=73$ ); II группа: 71-80 лет ( $n=257$ ); III группа: 81-100 лет ( $n=292$ ).

Иммунохроматографический анализ (ИХА) проводили при комнатной температуре. В отверстие тест-кассеты

для образца вносили 1 каплю (40 мкл) пробы и 1 каплю буферного раствора (0,05М трисовый буфер (pH=7,2) с 0,1% БСА). Для каждого образца использовали отдельную тест-кассету. Результат анализа визуально контролировали через 10 мин после внесения пробы. Нижний предел визуального определения составлял 400 нг/мл ФЭЕ D-димера. Положительным (наличие D-димера выше уровня 400 нг/мл ФЭЕ) считался результат исследования с образованием двух различимых полос розового или красного цвета в контрольной и тестовой зонах. Отрицательный результат анализа (наличие D-димера ниже уровня 400 нг/мл ФЭЕ) фиксировали при появлении одной окрашенной полосы в области контрольной зоны. В случае отсутствия окрашивания полосы в зоне контроля результат анализа считался недействительным, и проводилось повторное исследование пробы. При положительном результате анализа образцу присваивали значения от «1+» до «3+» в зависимости от степени интенсивности окрашивания, где «1+» - слабое окрашивание тестовой линии; «3+» - максимальное окрашивание, по интенсивности равное таковому в контрольной зоне.

**Имуноферментная тест-система.** Для определения концентрации D-димера в исследуемых пробах плазмы крови пациентов использовалась иммуноферментная тест-система «D-димер-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). В основе метода лежит одностадийный «сэндвич» вариант твердофазного ИФА. Минимальная определяемая набором концентрация D-димера - 10 нг/мл. В тест-системе «D-димер-ИФА-БЕСТ» используются калибраторы на основе очищенного D-димера, поэтому получаемые с помощью набора значения концентрации производитель предлагает оценивать в единицах D-димера (DDU). Интерпретацию результатов анализа производитель предлагает проводить самостоятельно, учитывая, что при определении D-димера с помощью данного набора реагентов его концентрация в плазме 80% здоровых доноров находилась в диапазоне 0-250 нг/мл DDU и у 97% здоровых доноров - в диапазоне 0-285 нг/мл DDU.

На основании инструкции производителя пробы с концентрацией D-димера более 285 нг/мл DDU относили к положительным (концентрация D-димера выше нормы), пробы с концентрацией менее 250 нг/мл DDU – к отрицательным (концентрация D-димера не повышена). Образцы с концентрацией D-димера в диапазоне 250-285 нг/мл DDU расценивались как неопределенные. Анализ проб проводили согласно инструкции производителя.

**Результаты.** В иммуноферментной тест-системе «D-димер-ИФА-БЕСТ» было исследовано 622 образца плазмы крови людей старше 60 лет, разделенных на 3 группы. Более половины всех положительных результатов (52,4%) приходилось на пробы III группы. С увеличением возраста испытуемых возрастала доля образцов с содержанием D-димера выше 285 нг/мл (положительные): 43,8%, 78,2%, 82,5% в каждой группе соответственно (табл. 1).

В массиве положительных образцов с увеличением возраста пациентов наблюдалась также тенденция к возрастанию числа образцов и с наиболее высокими значениями концентрации D-димера (от 1000 нг/мл DDU и выше). Так, в первой возрастной группе такие пробы составили 21,9 % от общего числа положительных результатов в пределах группы, во второй - 42,5%, а в третьей - 64,7% (рис.1).

Таблица 1

Результаты исследования образцов плазмы крови в иммуноферментной тест-системе «D-димер-ИФА-БЕСТ» ( $n=622$ )

| Возрастные группы | Отрицательные<br>(менее 250 нг/мл DDU) | Неопределенные<br>(250-285 нг/мл DDU) | Положительные<br>(более 285 нг/мл DDU) |
|-------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| I ( $n=73$ )      | 37 (50,7%)                             | 4 (5,5%)                              | 32 (43,8%)                             |
| II ( $n=257$ )    | 57 (22,2%)                             | 13 (5,0%)                             | 187 (72,8%)                            |
| III ( $n=292$ )   | 42 (14,4%)                             | 9 (3,1%)                              | 241 (82,5%)                            |
| Итого ( $n=622$ ) | 136 (21,9%)                            | 26 (4,2%)                             | 460 (73,9%)                            |

Таблица 2

Результаты исследования проб в ИФА и ИХА ( $n=622$ )

| № группы | Концентрация D-димера |                     | Количество образцов |                           |
|----------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
|          | в нг/мл DDU           | в нг/мл ФЭЕ*        | в ИФА               | в ИХА (совпадающие с ИФА) |
| 1        | <200 нг/мл DDU        | < 400 нг/мл ФЭЕ     | 98                  | 98 (100%)                 |
| 2        | 200-1000 нг/мл DDU    | 400-2000 нг/мл ФЭЕ  | 281                 | 204 (72,6%)               |
| 3        | 1000-3000 нг/мл DDU   | 2000-6000 нг/мл ФЭЕ | 112                 | 109 (97,3%)               |
| 4        | > 3000 нг/мл DDU      | > 6000 нг/мл ФЭЕ    | 131                 | 131 (100%)                |

Примечание: \* – учитывая разницу единиц измерения концентрации D-димера в двух методах, использовали условный пересчет 1 нг/мл DDU  $\approx$  2 нг/мл ФЭЕ.

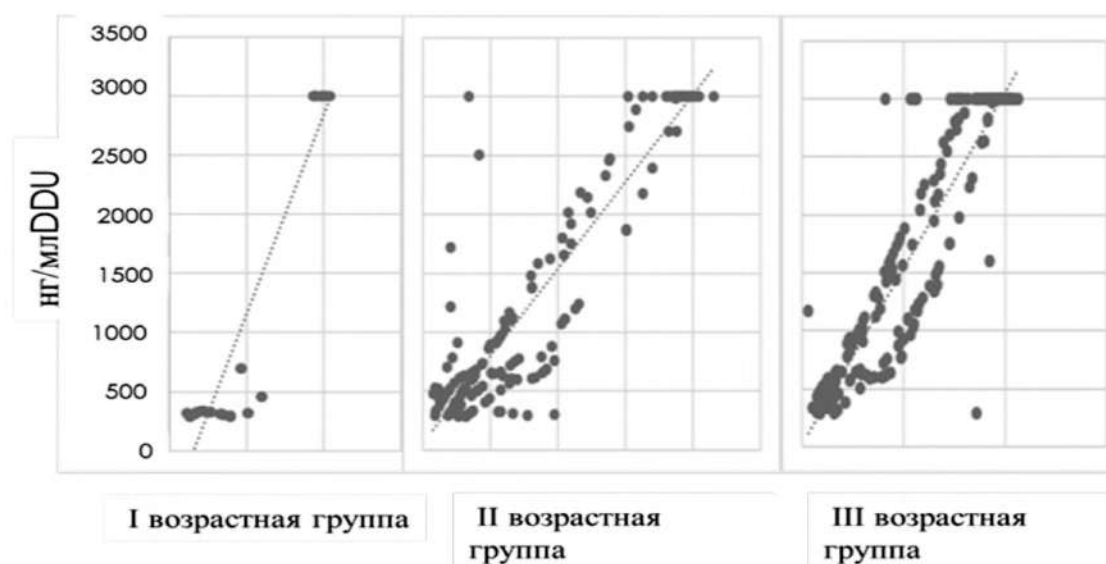


Рис. 1. Распределение положительных результатов (более 285 нг/мл DDU), выявленных в иммуноферментной тест-системе при исследовании плазмы крови пациентов трех возрастных групп ( $n=460$ ).

Полученные нами результаты полностью согласуются с литературными данными и подтверждают возрастное увеличение концентрации D-димера в крови [1, 2, 5, 6].

Образцы, охарактеризованные в ИФА были в дальнейшем исследованы в разработанной иммунохроматографической тест-системе «ИХА-Д-димер». В связи с отличным от ИФА пороговым уровнем (400 нг/мл ФЭЕ), а также с целью установления корреляции между концентрацией D-димера и интенсивностью окрашивания в ИХА, было выделено 4 группы проб с разным содержанием D-димера. Первую группу составили отрицательные образцы (с концентрацией D-димера менее 200 нг/мл DDU ( $n=98$ ), вторая, третья и четвертая группы содержали пробы с концентрацией D-димера в диапазонах 200-1000 нг/мл DDU ( $n=281$ ); 1000-3000 нг/мл DDU ( $n=112$ ) и более 3000 нг/мл DDU ( $n=131$ ) соответственно (табл. 2).

При исследовании образцов плазмы первой ( $n=98$ ) и

четвертой группы ( $n=131$ ) результаты двух методов полностью совпадали. Из третьей группы три пробы (2,7%) оказались отрицательными в ИХА. При исследовании образцов второй группы наблюдалось значительное совпадение результатов в ИФА и ИХА (72,6%). Для остальных образцов этой группы ( $n=77$ ) результаты ИХА были отрицательными. Среди проб, для которых были получены дискордантные результаты, большая часть (87,0%) содержала D-димер в диапазоне от 200 до 280 нг/мл DDU. Данный интервал является пограничным при дифференциации повышенных и нормальных значений концентрации D-димера. Получение различных результатов для проб с «пограничным» уровнем D-димера в двух методах может объясняться разницей в единицах измерения D-димера, их пересчете и в калибраторах, используемых для установления порогового уровня.

Для оценки возможной связи между концентрацией D-димера и степенью окрашивания тестовой полосы в

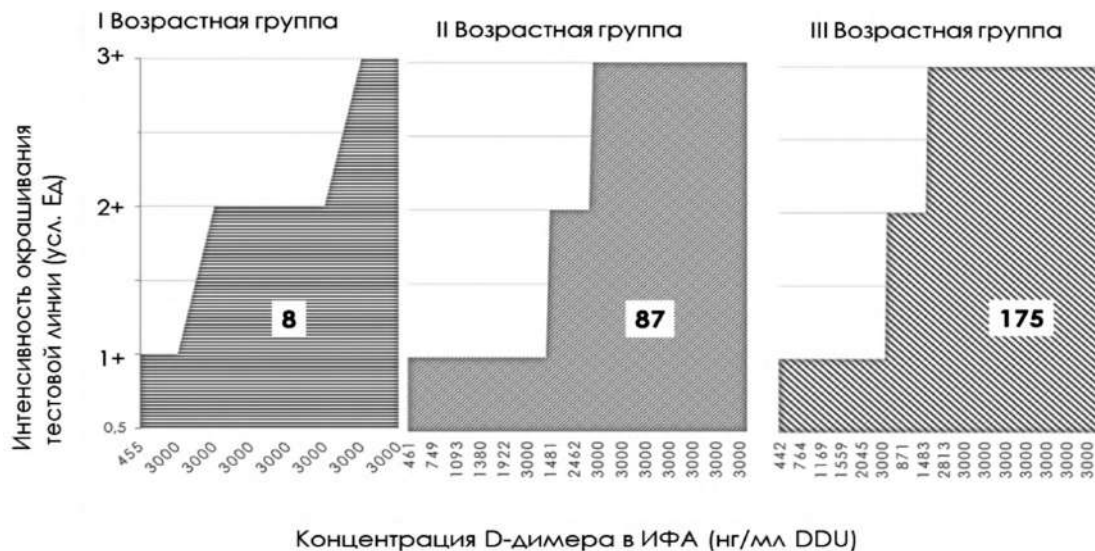


Рис. 2. Изменение интенсивности окрашивания тестовой линии в ИХА при исследовании образцов плазмы трёх возрастных групп ( $n=270$ ).

ИХА была отобрана группа образцов ( $n=270$ ), содержащих D-димер в количестве от 200 до 3000 нг/мл DDU. При исследовании в ИХА наблюдалось усиление интенсивности окрашивания (от 1+ до 3+) с увеличением концентрации D-димера в пробах. Для образцов из третьей возрастной группы, содержащей наибольшее число проб с высоким уровнем D-димера (около 3000 нг/мл DDU), отмечалось большее, чем в других группах, количество срабатываний с максимально интенсивным окрашиванием (на уровне 3+) в ИХА (рис 2.).

**Обсуждение.** В результате нашей работы был создан иммунохроматографический тест для определения D-димера и была проведена оценка его работы в сравнении с ИФА. При исследовании образцов плазмы крови продемонстрирована высокая корреляция результатов ИХА с результатами, полученными в ИФА, по отрицательным образцам (100%) и по образцам с концентрацией D-димера выше 1000 нг/мл DDU (98,8%). При анализе проб в обоих методах отмечалось нарастание уровня D-димера с увеличением возраста пациентов. При этом с увеличением концентрации D-димера в пробах наблюдалось возрастание интенсивности окрашивания тестовой полосы в ИХА.

Для группы проб с концентрацией аналита от 200 до 1000 нг/мл DDU отмечались дискордантные результаты, полученные в двух методах, прежде всего, при исследовании образцов с «пограничной» концентрацией D-димера. Расхождение в результатах анализа для таких проб могут объясняться различиями в используемых калибраторах и единицах измерения D-димера для каждого метода, а также различной специфичностью антител в составе теста. Для минимизации ложноположительных результатов необходимо использовать антитела, связывающиеся с эпитопами в составе молекулы D-димера и при этом остающиеся инертными по отношению к фибриногену. Для получения воспроизводимых результатов для эффективной диагностики тромбозов и мониторинга тромболитической терапии рекомендуется использовать тест-системы одного производителя и ин-

терпретировать результаты строго в соответствии с инструкцией по применению.

**Заключение.** Разработанный иммунохроматографический тест обеспечил совпадение результатов с ИФА в 87,1% и в 100% случаев - для образцов с повышенной (более 400 нг/мл ФЭЕ) и нормальной концентрацией D-димера соответственно. Полученные результаты позволяют рекомендовать применение иммунохроматографического теста для определения D-димера в качестве теста второй линии после оценки клинической претестовой вероятности тромбоза.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб» за оказанную помощь при проведении исследований.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7–14 см. REFERENCES)

1. Гильманов А.Ж. D-Димер: Что? Как? У кого? С какой целью? *Клинико-лабораторный консилум*. 2009; 31(6): 38-46.
2. Кишкун А.А. Лабораторная диагностика неотложных состояний. М.: Лабора; 2012: 271-9.
3. Марданлы С.Г., Первушин Ю.В., Иванова В.Н. Спинномозговая жидкость, лабораторные методы исследования и их клинико-диагностическое значение. Электроргорск: ЭКОлаб; 2011.
4. Никитина А.В., Акиншина Ю.А., Нишакова Н.Е., Амелина Е.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019. 65 (9):536-40.
5. Рабочая группа по диагностике и ведению острой эмболии лёгочной артерии Европейского общества кардиологов (ESC). Рекомендации ESC по диагностике и ведению пациентов с острой эмболией системы легочной артерии. *Российский кардиологический журнал*. 2015; 8(124):67-110.
6. Савельев В. С., Чазов Е. И., Гусев Е. И. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозов и тромбоэмболических осложнений. *Флебология*. 2010; 4(2): 1–37.

## REFERENCES

1. Gil'manov A. D-Dimer: Analyte, methods, targets, purposes. *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2009; 31(6): 38-46. (in Russian)
2. Kishkun A.A. laboratory diagnosis of emergency cases. Moscow: Labora; 2012:271-9. (in Russian)
3. Mardanly S. G., Pervushin Yu. V., Ivanova V. N. Spinal fluid, laboratory research methods and their clinical and diagnostic value. Spinnomozgovaja zhidkost', laboratornye metody issledovaniya i ih kliniko-diagnosticheskoe znachenie. Elektrogorsk: ECOLab; 2011. (in Russian)
4. Nikitina A.V., Akinshina Ju.A., Nishhakova N.E., Amelina E.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for detection of fecal occult blood. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2019. 65 (9):536-40. (in Russian)
5. The Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). ESC recommendations for the diagnosis and management of patients with acute pulmonary embolism. *Rossiyskiy kardiologicheskij zhurnal*. 2015; 8(124):67-110. (in Russian)
6. Savel'ev V.S., Chazov E. I., Gusev E. I. Russian clinical guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of venous thromboembolic complications. *Flebologiya*. 2010; 4(2): 1-37. (in Russian)
7. Anderson F.A.Jr., Spencer F.A. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation*. 2003; 107 (23): 9-16.
8. Heit J.A., The Epidemiology of Venous Thromboembolism in the Community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(3): 370-2.
9. Konstantinides S.V., Torbicki A., Agnelli G., Danchin N., Fitzmaurice D., Galie N. et al. 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J*. 2014; 35(43): 3033-69.
10. Lippi G., Cervellini G., Casagrande I., Morelli B., Testa S., Tripodi A. D-dimer testing for suspected venous thromboembolism in the emergency department. *Consensus document of AcEMC, CISMEL, SIBioC, and SIMeL. Clin. Chem. Lab. Med*. 2013; 52(5): 1-8.
11. Lippi G., Tripodi A., Simundic A.M. International Survey on D-Dimer Test Reporting: A Call for Standardization. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*. 2015; 41(3): 287-93.
12. Olson J.D., Adcock D.M., Bush T.A., de Moerloose P., Gardiner C., Giniard V.R. et al. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Quantitative D-Dimer for exclusion venous thromboembolic disease. *Approved Guideline*. 2011;31(6):1-31.
13. Silverstein M.D., Heit J.A., Mohr D.N., Petterson T.M., O'Fallon W.M., Melton L.J. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *3<sup>rd</sup> Arch.Intern. Med*. 1998; 158(6): 585-93.
14. Timp J.F., Braekkan S.K., Versteeg H.H., Cannegieter S.C. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*. 2013; 122 (10): 1712-23.

Поступила 15.09.19

Принята к печати 10.10.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Новиков Ю.А.<sup>1</sup>, Индутный А. В.<sup>2</sup>, Кравченко Е.Н.<sup>3</sup>

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПОРАЖЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ КАК ЭЛЕМЕНТ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ПОРАЖЕНИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ СИФИЛИСЕ

<sup>1</sup>Кафедра дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644001, Омск, Россия;

<sup>2</sup>Кафедра клинической лабораторной диагностики ДПО ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644001, Омск, Россия;

<sup>3</sup>БУЗ ОО «Клинический кожно-венерологический диспансер», 644001, Омск, Россия

*Цель: разработать прогностическую модель поражения нервной системы на основе определения концентрации интерлейкинов-23, IL-23, IL-12p40, глияльного фибриллярного кислого протеина (GFAP) в ликворе больных различными формами сифилиса. Проведено комплексное лабораторное обследование больных нейросифилисом и сифилисом без специфического поражения нервной системы, которые наблюдались в венерологическом отделении БУЗ ОО «Клинический кожно-венерологический диспансер» г. Омска. Всем пациентам проведено серологическое исследование крови, серологическое и клиническое исследование ликвора, иммунологическое исследование ликвора (интерлейкины – 23, IL-12p40, GFAP). На основании исследования IL-23, IL-12p40, GFAP, уровня белка и плеоцитоза в ликворе предложена прогностическая модель развития нейросифилиса у больных сифилисом без специфического поражения нервной системы.*

*Анализ иммунологических изменений в ликворе больных показал, что неотъемлемой частью диагностики нейросифилиса может быть и исследование ряда цитокинов и маркеров повреждения нервной ткани в ликворе как наиболее специфичных и достоверных, особенно при отсутствии клинической симптоматики со стороны ЦНС.*

**Ключевые слова:** нейросифилис; сифилис; GFAP; интерлейкин IL-23; интерлейкин 12p40; прогностическая модель; ликвор.

**Для цитирования:** Новиков Ю.А., Индутный А.В., Кравченко Е.Н. Иммунологические маркеры поражения нервной ткани как элемент прогностической модели поражения нервной системы при сифилисе. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 659-662

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-659-662>

Novikov Yu.A.<sup>1</sup>, Indutny A.V.<sup>2</sup>, Kravchenko E.N.<sup>3</sup>

IMMUNOLOGICAL MARKERS OF DEFEAT OF NERVOUS TISSUE AS THE ELEMENT OF PREDICTIVE MODEL OF DAMAGE OF NERVOUS SYSTEM AT SYPHILIS

<sup>1</sup>Department of a dermatovenereology and cosmetology «Omsk state medical university», 644001, Omsk, Russia;

<sup>2</sup>Department of clinical laboratory diagnostics «Omsk state medical university», 644001, Omsk, Russia;

<sup>3</sup>Clinical dermatovenereologic clinic, 644001, Omsk, Russia

*To develop predictive model of damage of nervous system on the basis of definition of concentration of interleukins-23, IL-23, IL-12p40 and also a glial fibrillar acid protein (GFAP) in liquor of patients with various forms of syphilis. Comprehensive laboratory examination of patients with neurosyphilis and syphilis without specific damage of nervous system who were observed in venereologic office of BOUZAS of OO «Clinical Dermatovenereologic Clinic» of Omsk is conducted. To all patients were carried out: a serological blood analysis, serological and clinical trial of liquor, and also immunological research of liquor (interleukins – 23, IL-12p40, and also GFAP). On the basis of the research IL-23, IL-12p40, GFAP, the level of protein and a pleocytosis in liquor the predictive model of development of neurosyphilis in patients with syphilis without specific damage of nervous system is offered. The analysis of immunological changes in liquor of patients showed that the research of a number of cytokines and markers of damage of nervous tissue to liquor as the most specific and reliable, especially in the absence of clinical symptomatology from central nervous system can be an integral part of diagnostics of neurosyphilis also.*

**Key words:** neurosyphilis; syphilis; GFAP; interleukin IL-23; interleukin 12p40; predictive model; liquor.

**For citation:** Novikov Yu.A., Indutny A.V., Kravchenko E.N. Immunological markers of defeat of nervous tissue as an element of predictive model of damage of nervous system at syphilis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 659-662 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-659-662>

**For correspondence:** Novikov Y.A., MD, PhDocent, doctor of medical Sciences, Professor, Department of dermatology and venereology and cosmetology; e-mail: buzoo.kkvd@mail.ru

### Information about authors:

Novikov Yu.A., <https://orcid.org/0000-0003-0230-6380>.

Indutny A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1951-5824>.

Kravchenko E.N., <http://orcid.org/0000-0001-8625-8237>.

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

Received 10.10.2019  
Accepted 14.10.2019

**Для корреспонденции:** Новиков Юрий Александрович, д-р мед. наук, доц., зав. каф. дерматовенерологии и косметологии; e-mail: buzoo.kkvd@mail.ru

Прогноз заболеваемости нейросифилисом на современном этапе свидетельствует о том, что количество случаев нейросифилиса в год возрастает примерно на 15-25% [6]. Обращает на себя внимание увеличение случаев менингovasкулярных форм раннего нейросифилиса, что свидетельствует о значительном сокращении сроков развития заболевания [5]. Участились случаи

злокачественного течения инфекции и доля больных со скрытым течением заболевания [5].

В литературе описываются преимущественно клинические случаи нейросифилиса, а не новые диагностические подходы [1]. Большинство современных методов диагностики нейросифилиса основаны на ИФА и предназначены для первичных скрининговых исследований [4]. Потребности практической медицины в отношении диагностики нейросифилиса обуславливают необходимость разработки дополнительных доступных высокоинформативных тестов, пригодных для решения сложных диагностических ситуаций, что подтверждает актуальность изучения данной проблемы.

**Материал и методы.** Проведено открытое, когортное, плацебо не контролируемое, сравнительное исследование методом одномоментного поперечного среза. Сформированы две группы: основная, больные нейросифилисом ( $n=46$ ), и группа сравнения ( $n=41$ ), больные сифилисом без поражения нервной системы. Набор клинического материала осуществлялся на базе венерологического отделения БУЗ ОО «Клинический кожно-венерологический диспансер» (БУЗОО «ККВД»). Для установления диагноза нейросифилиса использованы клинические, эпидемиологические, лабораторные данные (серологическое и клиническое исследование ликвора: цитоз, содержание белка, РМП, РИФц, ИФА, РПГА). Всем пациентам проведено иммунологическое исследование ликвора: интерлейкин-23, интерлейкин-12p40, глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP). Данные показатели рассматриваются многими учёными как маркёры повреждения нервной ткани, носящие в достаточной степени избирательный характер [2, 3].

Полученные данные обработаны с помощью методов системного анализа с использованием программ «Microsoft Excel», «Statistica 6.0», SPSS 16.0 согласно требованиям к проведению анализа медицинских данных на персональном компьютере Acer. Для составления прогноза использованы модули программы SPSS 16.0, ROC-анализ с построением ROC-кривых и анализом площади под кривыми (AUC), что помогло выявить наиболее значимые параметры, используемые в дальнейшем для прогнозирования. ROC-анализ оценивает взаимодействие чувствительности и специфичности каждого параметра, его диагностическую ценность. Кривая ROC отражает точность прогнозирования результатов теста: чем больше она выгнута, тем точнее прогноз. Площадь под кривой ROC для теста с нулевой степенью прогнозирования равна 0,5, для случая с максимальной степенью прогнозирования равна 1. Для расчёта вероятности развития поражения нервной системы у пациентов с сифилисом создана модель прогноза с помощью метода бинарной логистической регрессии, которая исследует зависимость дихотомических переменных от независимых переменных, имеющих любой вид шкалы. Использован пошаговый метод включения переменных в анализ [6].

**Результаты и обсуждение.** Для определения диагностических критериев и предикторов поражения нервной системы при сифилисе проведён комплексный анализ полученных результатов. Ликворологическое исследование является весьма информативным для диагностики нейросифилиса.

Помимо определения уровня белка и цитограммы ликвора, которые демонстрируют корреляционные связи средней степени с наличием поражения нервной системы, проведено исследование уровня GFAP,

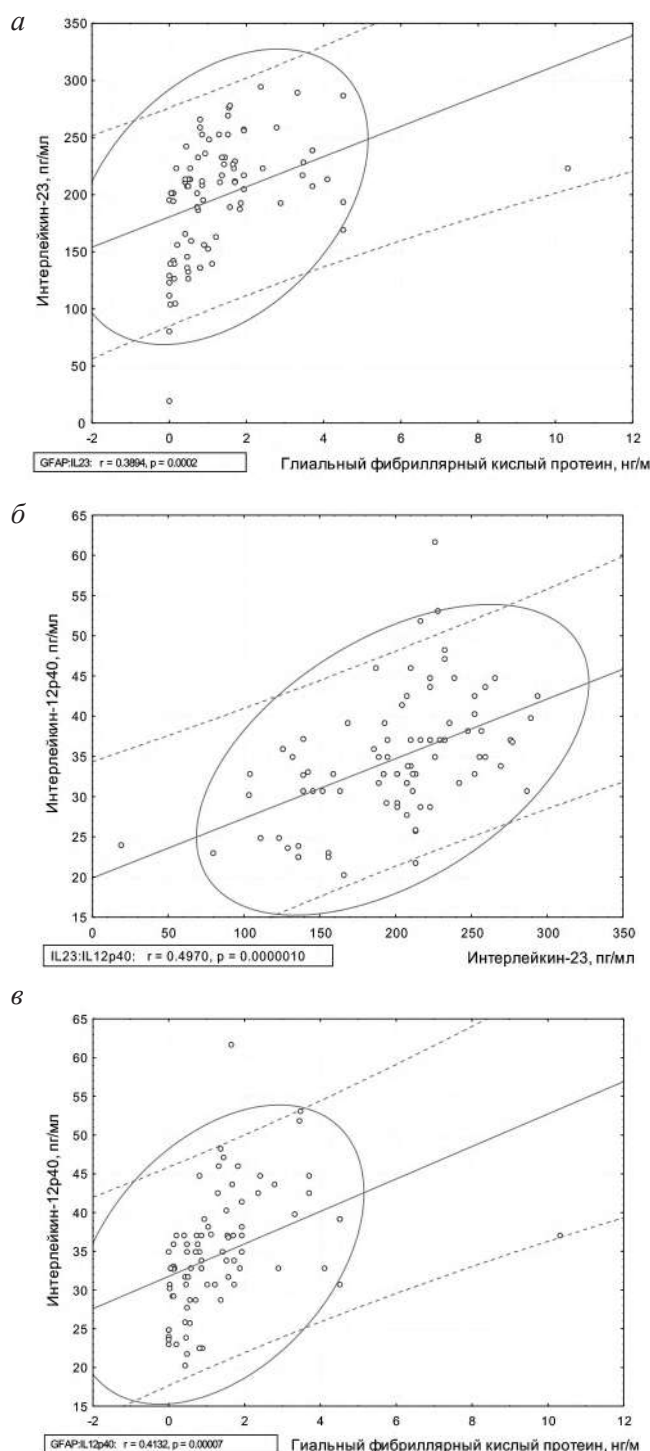


Рис. 1. Корреляционная связь между уровнями GFAP (а), ИЛ-23 (б), ИЛ-12p40 (в) в ликворе пациентов с сифилисом.

Таблица 1

ROC-анализ предикторов развития поражения нервной системы при сифилисе

| Показатель                                        | AUC (95% ДИ)           | p-level | Порог отсечения | Чувствительность (ДИ) % | Специфичность (ДИ) % |
|---------------------------------------------------|------------------------|---------|-----------------|-------------------------|----------------------|
| Белок, г/л                                        | 0,641<br>(0,525-0,758) | 0,024   | 0,315           | 45 (26-65)              | 67 (47-87)           |
| Цитоз, клеток в 1 мм <sup>3</sup>                 | 0,800<br>(0,705-0,896) | 0,0001  | 3,5             | 32 (17-48)              | 87 (74-99)           |
| Глиальный фибриллярный кис-<br>лый протеин, нг/мл | 0,979<br>(0,958-1,001) | 0,0001  | 0,839           | 73 (66-81)              | 77 (69-84)           |
| Интерлейкин-23 нг/мл                              | 0,862<br>(0,788-0,937) | 0,0001  | 207,8           | 65 (56-76)              | 66 (58-75)           |
| Интерлейкин-12p40                                 | 0,872<br>(0,801-0,942) | 0,0001  | 35,6            | 63 (52-73)              | 65 (56-74)           |

Таблица 2

Модель прогноза вероятности развития поражения нервной системы на основе показателя ИЛ-23 в ликворе пациентов с сифилисом

| Признак                          | Показатели анализа        |                           |    |                   |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|----|-------------------|
|                                  | B (Коэффициент регрессии) | S.E. (Стандартная ошибка) | df | Sig. (Значимость) |
| Интерлейкин-23                   | -0,045                    | 0,01                      | 1  | 0,000             |
| Constant                         | 8,817                     | 2,048                     | 1  | 0,000             |
| Chi-sq=44,4 df=1 p<0,0001        |                           |                           |    |                   |
| Корректность предсказания: 72,4% |                           |                           |    |                   |

ИЛ-23, ИЛ-12p40 в ликворе. У пациентов с нейросифилисом, вне зависимости от наличия клинических симптомов, уровни GFAP, ИЛ-23, ИЛ-12p40 в ликворе значительно превышают аналогичные показатели у пациентов без специфического поражения нервной системы. Это подтверждается данными корреляционного анализа о наличии связи высокой степени между уровнями данных показателей и поражением нервной системы ( $G=-0,96$ ,  $p=0,000001$ ,  $G=-0,73$ ,  $p=0,000001$ ,  $G=-0,77$ ,  $p=0,000001$  соответственно), а также между собой (рис. 1).

ROC-анализ с построением ROC-кривых и анализом площади под кривыми (AUC) подтвердил возможность прогнозирования поражения нервной системы при сифилисе на основании уровней белка, цитоза, GFAP, ИЛ-23, ИЛ-12p40 в ликворе пациентов (табл. 1, рис. 2).

Можно утверждать, что при уровне белка в ликворе более 0,315 г/л, GFAP более 0,839 нг/мл, ИЛ-23 более 207,8 пг/мл, ИЛ-12p40 более 35,6 пг/мл, цитозе более 3,5 клеточных элементов в 1 мм<sup>3</sup> существует высокая вероятность поражения нервной системы при сифилисе.

Разделив исходы на два возможных (бинарный признак): развитие поражения нервной системы и отсутствие поражения нервной системы при сифилисе, для составления прогноза использована бинарная логистическая регрессия. На основе результатов логистической регрессии непрерывных признаков с пошаговым включением в анализ построена прогностическая модель вероятности развития поражения нервной системы (табл. 2).

Вероятность ( $p$ ) поражения нервной системы при сифилисе на основании этой модели прогноза составляет:

$$p=1/(1+e^{8,817-ИЛ-23 \times 0,045}), \text{ где}$$

$e$  – основание натурального логарифма, математическая константа, равная примерно 2,718. Так при уровне ИЛ-23 в ликворе 290 пг/мл вероятность развития пора-

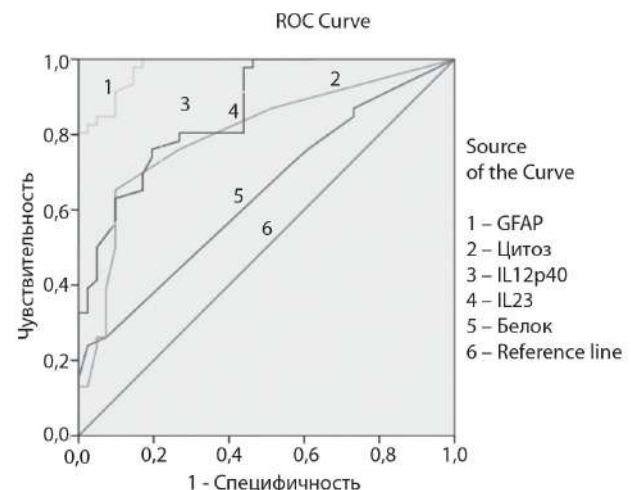


Рис. 2. ROC-кривая, построенная при анализе чувствительности и специфичности показателей ликвора у пациентов с сифилисом.

жения нервной системы при сифилисе составляет 0,126 или 12,6%, при уровне 120 пг/мл – 0,0318 или 3,18%.

Добавив в модель показатель уровня GFAP в ликворе, получены следующие результаты (табл. 3).

Добавление в модель параметра «Уровень GFAP в ликворе» увеличивает значимость модели. Вероятность ( $p$ ) развития поражения нервной системы на основании этой модели прогноза составляет:

$$p=1/(1+e^{20,8-1,08GFAP-0,058ИЛ-23}).$$

Так при уровне ИЛ-23 в ликворе 290 пг/мл и уровне GFAP 2 нг/мл вероятность развития поражения нервной системы при сифилисе составляет 0,139 или 13,9%, при уровнях 120 пг/мл и 1 нг/мл соответствен-

**Модель прогноза вероятности развития поражения нервной системы на основе показателей уровня ИЛ-23 и GFAP в ликворе пациентов с сифилисом**

| Признак                               | Показатели анализа        |                           |    |                   |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----|-------------------|
|                                       | В (коэффициент регрессии) | S.E. (стандартная ошибка) | df | Sig. (Значимость) |
| Глиальный фибриллярный кислый протеин | -1,08                     | 0,392                     | 1  | 0,006             |
| Интерлейкин-23                        | -0,058                    | 0,024                     | 1  | 0,016             |
| Constant                              | 20,8                      | 7,27                      | 1  | 0,004             |
| Chi-sq=102,8 df=2 p<0,0001            |                           |                           |    |                   |
| Корректность предсказания: 96,6%      |                           |                           |    |                   |

но – 0,045 или 4,5%. Модель, представленная в табл. 2, может с вероятностью до 96,6% предсказать вероятность поражения нервной системы при сифилисе.

Алгоритмы диагностики нейросифилиса должны носить комплексный характер и базироваться на всем арсенале клинико-лабораторных данных. Считаем, что неотъемлемой частью диагностики нейросифилиса может быть исследование ряда цитокинов и маркеров повреждения нервной ткани в ликворе как наиболее специфичных и достоверных, особенно при отсутствии клинической симптоматики со стороны ЦНС.

По результатам исследования прогнозируется успешное использование представленной прогностической модели при решении диагностических задач при нейросифилисе.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев Г.А., Фриго Н.В. Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. М.: Медицинская книга, 2004.
2. Новиков Ю.А., Охлопков В.А., Индутный А.В., Кравченко Е.Н. Интерлейкины-23, -12p40 как маркеры повреждения нервной ткани при нейросифилисе. *Иммунология*. 2018; 39 (5-6): 287-9.
3. Новиков Ю.А., Охлопков В.А., Новоселов В.С., Кидалов М.Б., Кравченко Е.Н. Маркеры повреждения нервной ткани в ликворе

- ре больных различными формами нейросифилиса. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2018; 21 (1): 61-4.
4. О совершенствовании серологической диагностики сифилиса. Приказ Минздрава РФ № 87 от 26.05. 2001. М.: Минздрав РФ; 2001.
5. Одинак О.М. Неврологические особенности течения сифилиса в современных условиях. Дисс. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург; 1999.
6. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. Учебник. 3-е изд. М.: ООО «Бином-Пресс»; 2008.

#### REFERENCES

1. Dmitriyev, G.A., Frigo N.V. Syphilis. Differential clinical laboratory diagnosis [Sifilis. Differentsial'nyi kliniko-laboratornyi diagnost]. Moscow: Meditsinskaya kniga; 2004. (in Russian)
2. Novikov Yu.A., Okhlopov V. A., Indutny A.V., Kravchenko E. N. Interleukins-23, -12p40 as markers of damage of nervous tissue at neurosyphilis. *Immunologiya*. 2018; 39 (5-6): 287-9. (in Russian)
3. Novikov Yu.A., Okhlopov V. A., Novoselov V.S., Kidalov M.B., Kravchenko E. N. Markers of damage of nervous tissue to liquor of patients with various forms of neurosyphilis; *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney*. 2018; 21 (1): 61-4. (in Russian)
4. About improvement of serological diagnostics the Syphilis .Order M.Z. Russian Federation № 87: 26. 05.2001. Moscow: Minzdrav Russian Federation; 2001. (in Russian)
5. Odnak O. M. Neurologic features of a course of syphilis in modern conditions medical sc Diss. St. Petersburg;1999. (in Russian)
6. Halafyan A.A. STATISTICA 6. Statistical analysis of data: textbook [Statiskichekiy analiz dannykh]. 3<sup>rd</sup> ed. Moscow: Binom-Press; 2008. (in Russian)

Поступила 10.10.19

Принята к печати 14.10.19

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Соснин Д. Ю.,<sup>1</sup> Гилева О. С.,<sup>1</sup> Сивак Е. Ю.,<sup>1</sup> Даурова Ф. Ю.,<sup>2</sup> Гибадуллина Н. В.,<sup>1</sup> Коротин С. В.<sup>1</sup>

## СОДЕРЖАНИЕ ВАСКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В СЛЮНЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, г. Пермь, Россия;

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия

Изучена концентрация васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР) в смешанной нестимулированной слюне и сыворотке крови у пациентов в норме и при генерализованном пародонтите. Основная группа (n=42) была представлена больными с генерализованным пародонтитом. Группу сравнения (n=36) составили пациенты без заболеваний тканей пародонта. Концентрацию ВЭФР определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческой тест – системы «VEGF – ИФА – БЕСТ» (А 8784) («Вектор – Бест», Россия). Медианы значений ВЭФР в слюне в 5,49 раза превышали значения для сыворотки крови в основной группе ( $p = 0,000000$ ) и в 7,01 раза в группе сравнения ( $p = 0,000000$ ). Концентрация ВЭФР в слюне больных основной группы превосходила аналогичные значения группы сравнения ( $p = 0,014857$ ); медиана и интерквартильный диапазон для основной группы составили 1098,45 (925,5; 1291) пг/мл, а для группы сравнения 1360,5 (998,9; 2062) пг/мл. Различия в концентрации ВЭФР для сыворотки отсутствовали ( $p = 0,775124$ ). Не выявлено достоверной корреляционной связи между содержанием ВЭФР в сыворотке крови и смешанной слюне. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для основной группы составил  $R=0,0184358$ , а для группы сравнения, соответственно,  $R=0,188932$ . Вероятным источником ВЭФР в слюне служат железы и клетки слизистой оболочки рта, а не процессы экссудации из сыворотки крови. Высокое содержание ВЭФР в слюне здоровых людей и снижение его уровня при пародонтите указывает на важную роль данного белка в процессах поддержания нормального состояния тканей пародонта и регенерации тканей слизистой оболочки рта.

**Ключевые слова:** васкулоэндотелиальный фактор роста; ВЭФР; пародонтит; слюна.

**Для цитирования:** Соснин Д. Ю., Гилева О. С., Сивак Е. Ю., Даурова Ф. Ю., Гибадуллина Н. В., Коротин С. В. Содержание васкулоэндотелиального фактора роста в слюне и сыворотке крови больных пародонтитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 663-668. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-663-668>

Sosnin D.Yu.,<sup>1</sup> Gileva O.S.,<sup>1</sup> Sivak E.Yu.,<sup>1</sup> Daurova F.Yu.,<sup>2</sup> Gibadullina N.V.,<sup>1</sup> Korotin S.V.<sup>1</sup>

### TNE CONTENT OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROW FACTOR IN SALIVA AND SERUM IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician Ye. A. Vagner Perm State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 614990, Perm, Russian Federation;

<sup>2</sup>Peoples Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russian Federation

To study the concentration of vasculoendothelial growth factor (VEGF) in mixed saliva and serum of patients in normal conditions and with generalized periodontitis. The main group (n = 42) was represented by patients with generalized periodontitis. The comparison group (n = 36) consisted of patients without periodontal tissue diseases. The concentration of VEGF was determined by the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial test-system "VEGF - IFA - BEST" (A-8784) ("Vector - Best", Russia). The median values VEGF in saliva were 5.49 times higher than the values for serum in the main group ( $p = 0.000000$ ) and 7.01 times in the comparison group ( $p = 0.000000$ ). The concentration of VEGF in the saliva of the examined main group exceeded the similar values of the comparison group ( $p = 0,014857$ ); the median and interquartile range for the main group was 1098.45 (925.5; 1291) pg/ml, and for the comparison group 1360.5 (998.9; 2062) pg/ml. There were no differences in the serum VEGF concentration ( $p = 0.775124$ ). No significant correlation was found between the serum VEGF content and the mixed saliva. The Spearman's rank correlation coefficient for the main group was  $R = 0,0184358$ , and for the comparison group, respectively,  $R = 0.188932$ . The source of VEGF in saliva are the glands and cells of the oral mucosa, and not the process of exudation from blood serum. The high content of VEGF in the saliva of healthy people and a decrease in its level during periodontitis indicates the important role of this protein in the processes of maintaining the normal state of periodontal tissues and reparation of tissues of the oral mucosa.

**Key words:** vascular endothelial growth factor; VEGF; periodontal diseases; saliva.

**For citation:** Sosnin D. Yu., Gileva O. S., Sivak E.Yu. Daurova F. Yu., Gibadullina N. V. Korotin S. V. The content of vascular endothelial grow factor in saliva and serum in patients with periodontitis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 663-668. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-663-668>

**For correspondence:** Sosnin D.Yu., Dr. Sci. Med., Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, e-mail: [sosnin\\_dm@mail.ru](mailto:sosnin_dm@mail.ru)

#### Information about authors:

Sosnin D.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-1232-8826>

**Conflict of interest.** The authors declare about sponsorship.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 26.04.2019  
Accepted 07.05.2019

Для корреспонденции: Соснин Дмитрий Юрьевич, д-р мед. наук, проф. каф. клин. лаб. диагностики ДПО; e-mail: [sosnin\\_dm@mail.ru](mailto:sosnin_dm@mail.ru)

**Введение.** По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, 2014) воспалительные заболевания пародонта – гингивит и пародонтит относятся к числу наиболее распространенных форм стоматологической патологии и выявляются у 70 - 90% взрослого населения планеты, в том числе и Российской Федерации [1,2]. Состояние тканей пародонта является индикатором общего здоровья человека, а патологические процессы в нем могут выступать факторами риска многих системных заболеваний [3-5].

Заболевания пародонта (пародонтит, пародонтоз) занимают одно из ведущих мест среди причин необратимой потери зубов [2-4], особенно у людей пожилого и старческого возраста [5-7].

Слюна является важнейшей из биологических жидкостей полости рта, характеризующейся множеством функций. Белковый состав этой биологической жидкости интенсивно исследуется [8,9]. Продemonстрировано диагностическое и прогностическое значение исследования белков слюны при заболеваниях пародонта [8, 10-12]. Развитие воспаления в пародонте протекает на фоне изменения состава и свойств основной жидкой биологической среды полости рта - ротовой жидкости, основным компонентом которой является смешанная слюна. Диагностический и прогностический потенциал салива-диагностики активно изучается применительно к воспалительным и неопластическим заболеваниям пародонта и слизистой оболочки полости рта, а также многим системным заболеваниям различного генеза [13-18].

В литературе приведены данные об обнаружении в тканях пародонта множества цитокинов, которые играют важную диагностическую роль и участвуют в патогенезе заболеваний пародонта [18-22]. В качестве перспективных биохимических маркеров, отражающих состояние системы микроциркуляции и особенности ангиогенеза анализируется содержание различных ростковых факторов в тканях и жидких биологических средах полости рта (стимулированной или нестимулированной смешанной слюне, десневой жидкости и др.), причем в последние годы особое внимание отводится васкулоэндотелиальному фактору роста (ВЭФР, *англ.* Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) или васкулотропину.

VEGF – наиболее мощный фактор роста [23-25]. Общие патофизиологические механизмы действия VEGF ассоциированы с увеличением сосудистой проницаемости (в 50.000 раз более выраженной для белков и жидкостей, чем у гистамина), стимуляцией ангиогенеза, пролиферации и миграции эндотелиоцитов, моноцитов и других клеток, что во многом определяет его роль в возникновении, прогрессировании (при осложненном течении) и разрешении различных воспалительных, дистрофических, неопластических процессов.

Мнения специалистов о роли VEGF в патогенезе заболеваний пародонта неоднозначны, чаще обсуждается его биполярное значение в развитии и поддержании воспалительного процесса в пародонте или его физиологическая ценность для поддержания здорового пародонта. Однако работы этого направления немногочисленны [20-22, 26], порой противоречивы, нуждаются в конкретизации применительно к методологии оценки фактора, стадии, этапа и способам лечения воспалительных заболеваний полости рта в различных популяционных группах.

Обращает на себя внимание, что большая часть клинко-биохимических исследований посвящены изучению содержания VEGF в сыворотке крови и указыва-

ют на увеличение его содержания при ряде системных воспалительно-дистрофических заболеваний, этиологически и патогенетически ассоциированных с гипоксией или активацией ангиогенеза, а также при различных формах онкопатологии [25-28].

При этом отмечается явный дефицит отечественных исследований, посвященных анализу содержания VEGF в слюне здоровых лиц и пациентов различного, в том числе стоматологического профиля. Так, поиск источников по электронной базе научной электронной библиотеки (<https://elibrary.ru>), проведенный соответственно по ключевым словам «слюна, ВЭФР» и «слюна, васкуло-эндотелиальный фактор роста», «слюна, VEGF», обнаружил лишь две публикации [22,29], из которых только в одной [22] приводились собственные данные о результатах исследования концентрации VEGF в слюне. Количество публикаций заданного поиска в библиотеке национального центра биотехнологической информации (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) больше, но и оно ограничено лишь десятками публикаций. Для сравнения, количество публикаций, посвященных анализу уровня VEGF в крови и тканях, исчисляется десятками тысяч. Работы, в которых приводятся данные о сравнительном содержании VEGF в сыворотке крови и в слюне в норме и при патологии полости рта, немногочисленны и посвящены преимущественно сравнительному анализу при опухолевых заболеваниях полости рта [21, 30-32]. Ограниченное число публикаций по проблеме сравнительного анализа содержания VEGF в биологических жидкостях организма человека при воспалительных заболеваниях полости рта обуславливает интерес к дальнейшим исследованиям VEGF в слюне у пациентов в норме и при заболеваниях пародонта.

**Цель исследования:** изучить концентрацию VEGF в смешанной слюне и сыворотке крови у пациентов в норме и при генерализованном пародонтите.

**Материал и методы.** Одномоментное обсервационное исследование типа «случай-контроль» выполнено с соблюдением этических принципов проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов, изложенных в Хельсинской декларации Всемирной организации здравоохранения (версия 2008 г.) и одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Пермского государственного медицинского университета имени академика Е. А. Вагнера» Минздрава Российской Федерации.

Концентрацию ВЭФР определяли в образцах сыворотки крови и слюны у 78 пациентов, в том числе 22 мужчин и 56 женщин, проходившие лечение в клиническом многопрофильном медицинском центре ПГМУ имени академика Е. А. Вагнера. Больные были разделены на две группы (табл. 1). В основную группу (группа 1) были включены больные ( $n=42$ ) с хроническим генерализованным пародонтитом легкой ( $n = 7$ ) и средней степени тяжести ( $n=35$ ), после рутинной санации полости рта и направленные на пародонтологическое лечение. Диагноз подтверждался результатами клинко-рентгенологического обследования.

Группу сравнения (группа 2) составили пациенты ( $n=36$ ) проходящие ежегодный диспансерный осмотр с участием стоматолога, имевшие санированную полость рта, хороший уровень гигиены и интактный пародонт.

В исследование не включали: лиц, перенесших острые инфекционные заболевания менее 3-х месяцев назад, беременных и женщин, кормящих грудью, пациентов обоего пола, страдающих алкоголизмом, а также

Таблица 1

Характеристика обследованных

| Характеристика пациентов                                                   | Основная группа<br>(n = 42) | Группа сравнения<br>(n = 36) |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Пол                                                                        | 13/29                       | 9/27                         |
| Средний возраст (M ± SD), годы                                             | 49,24 ± 11,51               | 45,39 ± 11,68                |
| Медиана возраста (Me) и интер-квартильный диапазон (25; 75 квартиль), годы | 51,5 (38; 58)               | 46,5 (36; 52)                |
| Min – Max (годы)                                                           | 26 – 76                     | 25 – 79                      |

Примечание. В числителе количество мужчин, в знаменателе – женщин.

курящих на момент исследования лиц, больных сахарным диабетом, пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации, с хроническими вирусными гепатитами, муковисцидозом, системными аутоиммунными заболеваниями. Также не включали в исследование лиц, получающих антибиотики, стероидные гормоны, бета-блокаторы, антикоагулянты и антиагреганты, блокаторы кальциевых каналов. Все обследуемые предоставили письменное информированное согласие на использование биоматериалов (сыворотки крови и слюны) для настоящего клинико-лабораторного исследования. Группы были сопоставимы по распределению полов (двусторонний критерий Фишера  $p=0,6201$ ) и не различались по возрасту (критерий Манна – Уитни  $U=582$ ;  $p=0,081157$ ) (табл. 1).

Смешанную нестимулированную слюну собирали утром, натощак, после промывания полости рта водой. Собирали слюну, секретировавшуюся и аккумулировавшуюся на дне полости рта пациента откуда ее отбирали стеклянной пипеткой и переносили в пластиковую пробирку. Процедуру повторяли несколько раз до получения объема слюны не менее 0,5 мл [33]. Кровь забирали путем венепункции кубитальной вены с использованием вакуумных систем для забора крови с активатором свертывания (Greiner VACUETTE®, Greiner Bio-one, Graz, Austria), сразу после сбора слюны.

Сыворотку крови получали путем центрифугирования забранных образцов при 3000 об/мин не позднее чем через 60 мин после забора крови. Образцы смешанной слюны также подвергали центрифугированию в аналогичных условиях.

Концентрацию VEGF в сыворотке крови и супернатанте смешанной слюны определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческой тест – системы для определения концентрации VEGF в сыворотке крови «VEGF – ИФА – БЕСТ» (А 8784) («Вектор – Бест», Россия). Оптическую плотность проб регистрировали на вертикальном фотометре StatFax 3200 (Awareness, США). Правильность определения концентрации VEGF контролировали по результатам измерения внутреннего стандарта, значения которого составили 610,4 и 636,6 пг/мл при диапазоне допустимых значений 553-747 пг/мл.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA v. 7 (StatSoftInc., США). Для каждого массива данных рассчитывали параметры описательной статистики: среднюю арифметическую (M), стандартное отклонение (SD), а также медиану (Me) и интерквартильный диапазон (25-75 перцентилей). С помощью критерия Шапиро-Уилка оценивали распределение результатов внутри выборки и на основании полученных результатов для дальнейшей статистической обработки полученных результатов использовали методы непараметрической статистики. Для сравнения концентрации ВЭФР в парных образцах сыворотки крови и слюны использовали критерий Вилкоксона. Для сравнения 2 независимых выборок применяли U-критерий Манна - Уитни. Количественную оценку линейной связи между двумя случайными величинами определяли с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

За максимально приемлемую вероятность ошибки первого рода ( $p$ ) принимали величину уровня статистической значимости равную или меньшую 0,05.

**Результаты.** Уровень VEGF в смешанной слюне в несколько раз превысил содержание этого белка в сыворотке крови (табл. 2). Различия между значениями меди-

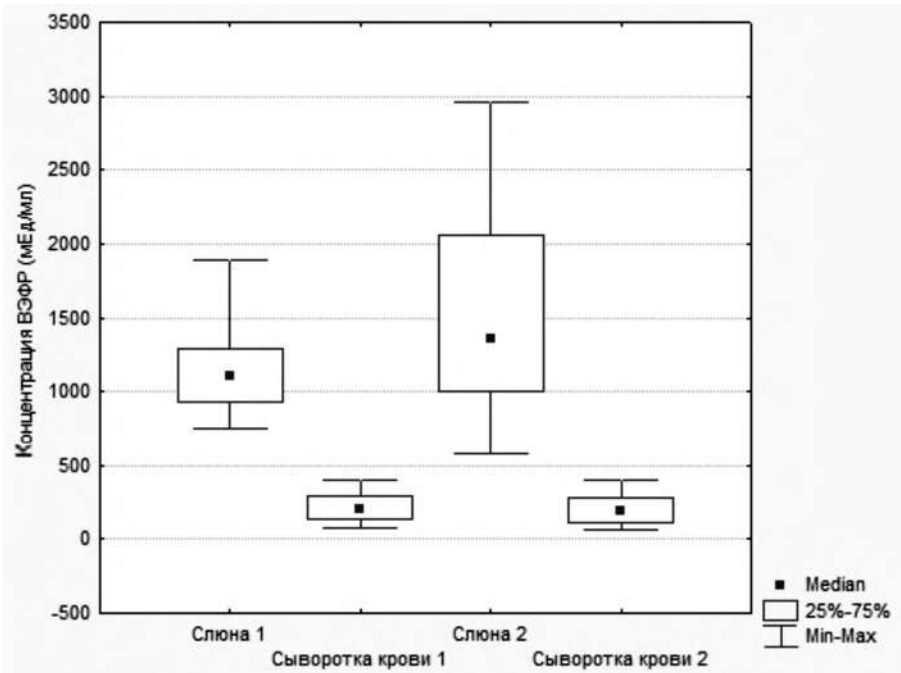


Рис. 1. Концентрация васкулоэндотелиального фактора роста в биологических жидкостях обследованных (1 – основная группа; 2 – группа сравнения).

Таблица 2

Содержание васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) у обследованных

| Показатель                     | Основная группа                                        | Группа сравнения                                        | p (критерий Манна-Уитни)  |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------|
| VEGF (пг/мл) в смешанной слюне | 1179,3 ± 313,1<br>1098,45 (925,5 ; 1291)               | 1504,8 ± 578,7<br>1360,5 (998,9 ; 2062)                 | U = 513,0<br>p = 0,014857 |
| VEGF (пг/мл) в сыворотке крови | 753,5 – 1897<br>207,4 ± 92,8<br>199,95 (136,1 ; 290,7) | 578,6 – 2963<br>203,8 ± 100,6<br>193,95 (109,2 ; 285,4) | U = 727,5<br>p = 0,775124 |
| p (критерий Вилкоксона)        | 72,2 – 396,7<br>p = 0,000000                           | 61,4 – 405,1<br>p = 0,000000                            | -                         |

Примечание. В числителе: среднее значение ± стандартное отклонение (M ± SD), в знаменателе: медиана и интерквартильный диапазон (Ме и 25% квартиль, 75% квартиль), под дробью Мин – Макс результаты.

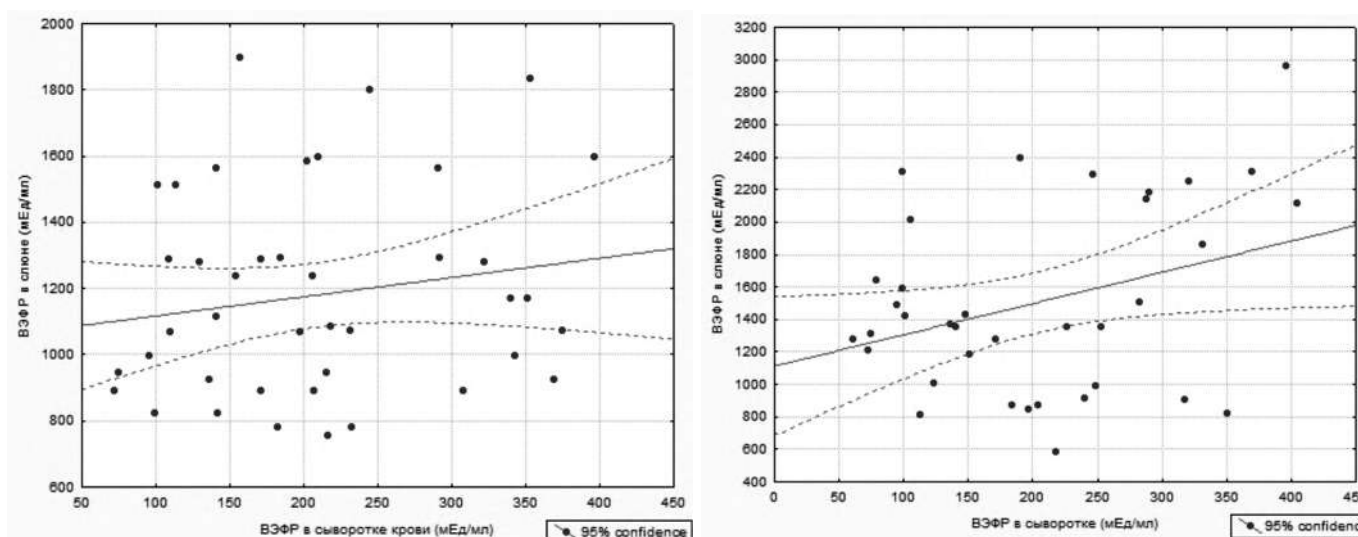


Рис. 2. Графики линейной регрессии зависимости содержания васкулоэндотелиального фактора в слюне и крови для основной группы (а), для группы сравнения (б).

ан в основной группе составили 5,49 раз ( $p=0,000000$ ), а в группе сравнения в 7,01 раз ( $p=0,000000$ ) (рис. 1). Нами не зарегистрировано ни одного случая, когда бы содержание VEGF в слюне было ниже его сывороточной концентрации.

Межгрупповые различия в концентрации VEGF для слюны имели статистически значимый характер ( $U = 513,0$ ;  $p = 0,014857$ ), медиана значения в основной группе на 19,26% была меньше аналогичной величины группы сравнения. В сыворотке крови различия отсутствовали ( $U = 727,5$ ;  $p = 0,775124$ ) и медианы концентрацией практически совпадали (см. табл. 2).

При оценке корреляционных связей между уровнем VEGF в сыворотке крови и слюне статистически значимой связи не выявлено, коэффициент ранговой корреляции Спирмена для основной группы составил  $R=0,0184358$ , а для группы сравнения, соответственно,  $R=0,188932$ . Указанные закономерности описываются графиками линейной регрессии, представленными на рис. 2.

**Обсуждение.** Ряд цитокинов и факторов роста участвуют в стимуляции регенерации соединительной ткани и слизистой оболочки полости рта. Так в тканях пародонта обнаружено почти 40 цитокинов, в том числе интерлейкины, нейротрофические факторы и различные факторы ро-

ста (VEGF, тромбоцитарный фактор роста, плацентарный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста, эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов и другие) [34,35]. При этом содержание большинства цитокинов значительно отличается между здоровыми и пораженными участками пародонта. Многие из цитокинов обнаружены в слюне или зубодесневой жидкости [35,36].

VEGF является одним из наиболее мощных факторов роста, регулирующим пролиферацию клеток эндотелия и участвующим в образовании сосудистой сети [37-39]. По мнению ряда авторов пародонтит можно рассматривать как хроническое воспалительное заболевание, при котором происходят изменения в сосудах десны, важным звеном патогенеза которых является ангиогенез. Образование новых сосудов потенциально может способствовать развитию воспаления, усилить синтез и накопление цитокинов, молекул адгезии и других факторов воспаления [22].

В ряде публикаций приведены данные о концентрации VEGF только в биологических жидкостях полости рта, в том числе, десневой жидкости [20-22, 30-32, 40-42]. Результаты сравнительных исследований сыворотки крови и жидкостей, формирующихся в полости рта описаны в меньшем числе работа [43, 44].

Результаты сравнительных исследований свидетельствуют о более высоком содержании VEGF в слюне в сравнении с сывороткой крови, и подтверждают результаты приведенные в литературе [30, 31, 43, 44]. Так, K.J. *Błochowiak* и соавт. [43] указывают на более высокое содержание ВЭФР в слюне в сравнении с сывороткой крови, причем эти закономерности выявлены как у здоровых людей, так и у пациентов с различными вариантами синдрома Шегрена, различия были статистически значимыми для всех групп обследованных. Авторы описывают аналогичное соотношение VEGF между слюной и сывороткой крови у пациентов с опухолями слюнных желез, причем наиболее высокие значения установлены для слюны больных злокачественными опухолями слюнных желез [44]. Развитие гингивита, обусловленного нарушением гигиенических мероприятий полости рта протекает со снижением концентрации ВЭФР в слюне [21].

Противоположной динамикой характеризуется динамика VEGF в десневой жидкости. В работе A.R. Pradeep и соавт. [41] приводятся данные о более низком уровне VEGF в этой биологической жидкости в сравнении с сывороткой крови. Воспаление тканей пародонта характеризуется увеличением концентрации этого белка в зубодесневой жидкости, что по мнению авторов, отражает увеличение проницаемости тканей пародонта и стимулирует процессы неангиогенеза [20, 22, 40, 41].

При интерпретации данных результатов следует учитывать, что различия могут быть обусловлены несколькими причинами. Во первых, известно, что VEGF в ходе альтернативного сплайсинга первичного белкового транскрипта может формировать множество различных изоформ, состоящих из разного количества аминокислот (121, 145, 165, 189 и 206 аминокислотных остатков) [45]. Производители при создании тест-систем для ИФА могут использовать моноклональные антитела, реагирующие с различными изоформами VEGF. Кроме того авторы анализируемых публикаций исследовали различные жидкости: зубодесневую жидкость, смешанную нестимулированную слюну, стимулированную слюну, применяли разные методики забора материала, что может оказывать влияние на результаты [46].

Вероятно VEGF в биологических жидкостях полости рта имеет различное происхождение. В слюну VEGF продуцируется железами слизистой оболочки полости рта, а не проникает пассивно из крови. Это доказывается более высокой, в сравнении с кровью, концентрацией этого белка в слюне. Кроме того в пользу этого свидетельствует отсутствие корреляции содержания этого белка между слюной и сывороткой крови.

Высокое содержание VEGF указывает на физиологические функции этого фактора роста. Одной из возможных функций является стимуляция пролиферации клеток слизистой оболочкой полости рта, которая как известно является одной из наиболее быстро обновляющихся тканей организма человека, а также процессов васкулогенеза при формировании и моделировании тканей лицевого скелета человека. Его снижение в слюне у больных пародонтитом может указывать на то, что воспалительные заболевания пародонта сопровождаются местным снижением уровня VEGF в слюне.

#### Выводы:

1. Концентрация VEGF (пг/мл) в смешанной слюне здоровых лиц с санированной полостью рта и интактным пародонтом в 7,01 раз превышает содержание этого

белка в сыворотке крови и составляет  $1504,8 \pm 578,7$  пг/мл против  $203,8 \pm 100,6$  пг/мл ( $p = 0,000000$ ).

2. Хронический генерализованный пародонтит протекает на фоне статистически значимого снижения VEGF в смешанной нестимулированной слюне (пг/мл); медианы концентрации различались на 19,26% ( $p = 0,014847$ ), без изменения содержания в сыворотке крови ( $p = 0,775124$ ).

3. Статистически значимое превышение уровня VEGF в смешанной слюне значений в сыворотке крови, отсутствие корреляционной связи между содержанием VEGF в этих биологических жидкостях указывает на местную продукцию этого белка железами участвующими в формировании смешанной слюны.

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5, 7, 9 – 16, 19-21, 23, 24, 26-28, 30-32, 34-49 см. REFERENCES)

1. Гажва С.И., Гулуев Р.С. Распространенность и интенсивность воспалительных заболеваний пародонта (обзор литературы). «Обозрение. Медтехника». *Стоматология*. 2012; 1(75): 13-4.
2. Янушевич О.О., Кузьмина Э.М., Кузьмина И.Н., Петрина Е.С., Бенья В.Н., Лопатина А.В. Стоматологическая заболеваемость населения России. Заболевания пародонта и слизистой оболочки полости рта. М.: МГМСУ; 2009.
3. Гилева О.С., Смирнова Е.Н., Позднякова А.А., Либик Т.В. Особенности диагностики и лечения ксеростомического синдрома при заболеваниях пародонта и слизистой оболочки полости рта у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. *Русский медицинский журнал*. 2016; 24 (20): 1340-5.
4. Орехова Л.Ю., Атрушкевич В.Г., Михальченко Д.В., Горбачева И.А., Лапина Н.В. Стоматологическое здоровье и полиморбидность: анализ современных подходов к лечению стоматологических заболеваний. *Пародонтология*. 2017; 84; 22(3): 15-7.
6. Кананович Т.Н., Воронина И.Е. Проблема состояния тканей пародонта у лиц пожилого с старческого возраста. *Современная стоматология*. 2018; 90(1): 30.
8. Куцевляк В.Ф., Лахтин Ю.В. Заболевания тканей пародонта у взрослого населения, живущего в условиях ксеростомического синдрома гипермикрозлементоза. *Вестник стоматологии*. 2010; 70(1): 15-8.
17. Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская О.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: БИНОМ; 2014.
18. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Семенова Е.А., Светлакова Е.Н., Береснева Н.С., Мандра Ю.В. и др. Значение некоторых интерлейкинов в патогенезе пародонтита. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2017; 14(1): 35-9.
22. Мудров В.П., Нелюбин В.Н., Воробьева Е.С., Лысюк Е.Ю., Мяндинов М.С., Фоменков И.С., и др. Применение ростовых факторов в терапии пародонтита. *Медицинская иммунология*. 2018; 20(3): 439-44.
25. Завьялова О.В., Спиваковский Ю.М., Захарова Н.Б., Черненко Ю.В., Злобина О.В. Ангиогенез и васкулоэндотелиальный фактор роста, роль в патологии ЖКТ. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 2014; 110(10): 77-82.
29. Бачурина А.С., Бойко Н.В., Оксенюк О.С. Динамика цитокинов в слюне у детей с аденоидами и аденоидитами. *Российская ринология*. 2017; 25(3): 42-5.
33. Соснин Д.Ю., Гилева О.С., Мозговая Л.А., Сивак Е.Ю., Белева Н.С., Кривцов А.В. и др. NT – proBNP в слюне и сыворотке крови в норме и при пародонтите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(3): 164-8.

#### REFERENCES

1. Gajhva S.I., Guluev R.S. The prevalence and intensity of inflammatory periodontal diseases. «Obzrenie Medtehnika». *Stomatologiya*. 2012; 1(75): 13-4. (in Russian)
2. Yanushevich O.O., Kuz'mina E.M., Kuz'mina I.N., Petrina E.S., Benya V.N., Lopatina A.V. Dental morbidity of the population of

- Russia. Periodontal and oral mucosa diseases. Moscow: MGMSU; 2009. (in Russian)
3. Gileva O.S., Smirnova E.N., Pozdnjakova A.A., Libik T.V. Features of diagnosis and treatment of xerostomy syndrome in periodontal diseases and oral mucosa in patients with type 2 diabetes. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 24 (20): 1340-5. (in Russian)
4. Orekhova L.Yu., Atrushkevich V.G., Mihal'chenko D.V., Gorbacheva I.A., Lapina N.V. Dental health and polymorbidity: an analysis of modern approaches to the treatment of dental diseases. *Parodontologiya*. 2017; 84; 22(3): 15-7. (in Russian)
5. Ferreira M.C., Dias-Pereira A.C., Branco-de-Almeida L.S., Martins C.C., Paiva S.M. Impact of periodontal disease on quality of life: a systematic review. *J. Periodontol Res*. 2017; 52(4): 651-5.
6. Kananovich T.N., Voronina I.E. The problem of the condition of periodontal tissues in the elderly from old age. *Sovremennaya stomatologiya*. 2018; 90(1): 30. (in Russian)
7. Lopez R., Hujoel P., Belibasakis G.N. On putative periodontal pathogens: an epidemiological perspective. *Virulence*. 2015; 6(3): 249-57.
8. Kutsevyak V.F., Lakhtin Yu.V. Diseases of periodontal tissues in the adult population living under conditions of unstable anthropogenic hypermicroelementosis. *Vestnik stomatologii*. 2010; 70(1): 15-8. (in Russian)
9. Kinane D.F., Stathopoulou P.G., Papapanou P.N. Periodontal diseases. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017; 3: 17038.
10. Persson G.R. Dental geriatrics and periodontitis. *Periodontol*. 2000; 2017; 74(1): 102-15.
11. López R., Smith P.C., Göstemeyer G., Schwendicke F. Ageing, dental caries and periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol*. 2017; 44 (18): 145-2.
12. Lorenzo-Pouso A.I., Pérez-Sayáns M., Bravo S.B., López-Jornet P., García-Vence M., Alonso-Sampedro M. et al. Protein-Based Salivary Profiles as Novel Biomarkers for Oral Diseases. *Dis. Markers*. 2018; 6141845.
13. Ghallab N.A. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: Review of the current evidence. *Arch. Oral Biol*. 2018; 87: 115-24.
14. Taylor J.J. Protein biomarkers of periodontitis in saliva. *ISRN Inflamm*. 2014; 593151.
15. Schulz B.L., Cooper-White J., Punyadeera C.K. Saliva proteome research: current status and future outlook. *Crit. Rev. Biotechnol*. 2013; 33(3): 246-59.
16. Milanowski M., Pomastowski P., Ligor T., Buszewski B. Saliva - Volatile Biomarkers and Profiles. *Crit. Rev. Anal. Chem*. 2017; 47(3): 251-66.
17. Vavilova T.P., Yanushevich O.O., Ostrovskaya O.G. Saliva. Analytical capabilities and perspectives xSlyuna. Analiticheskie vozmozhnosti I perspektivy]. Moscow: BINOM; 2014. (in Russian)
18. Bazarnyy V.V., Polushina L.G., Semenova E.A., Svetlakova E.N., Beresneva N.S., Mandra Yu.V. et al. The value of some interleukins in the pathogenesis of periodontitis. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2017; 14(1): 35-9. (in Russian)
19. Gupta M., Chaturvedi R., Jain A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine*. 2013; 61(3): 892-7.
20. Afacan B., Öztürk V.Ö., Paşalı C., Bozkurt E., Köse T., Emingil G. Gingival crevicular fluid and salivary HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and TNF- $\alpha$  levels in periodontal health and disease. *J. Periodontol*. 2018; 12: 1-10.
21. Belstrøm D., Damgaard C., Könönen E., Gürsoy M., Holmstrup P., Gürsoy U.K. Salivary cytokine levels in early gingival inflammation. *J. Oral Microbiol*. 2017; 9(1): 1364101.
22. Mudrov V.P., Neljubin V.N., Vorob'eva E.S., Lysjuk E.Ju., Mjandiev M.S., Fomenkov I.S. et al. The use of growth factors in the treatment of periodontitis. *meditsinskaya immunologiya*. 2018; 20(3): 439-44. (in Russian)
23. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med*. 2003; 9(6): 669-76.
24. Hu K., Olsen B.R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 2016; 91: 30-8.
25. Zav'jalova O.V., Spivakovskij Ju.M., Zaharova N.B., Chernenkov Ju.V., Zlobina O.V. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor, the role in the pathology of the gastrointestinal tract. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastrojenterologiya*, 2014; 110(10): 77-82. (in Russian)
26. Lee H.Y., Min K.H., Lee S.M., Lee J.E., Rhee C.K. Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in young male asthma patients. *Korean J. Intern. Med*. 2016; 32(2): 295-301.
27. Ramakrishnan S., Anand V., Roy S. Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2014; 9(2): 142-60.
28. Chen Y., Mathy N.W., Lu H. The role of VEGF in the diagnosis and treatment of malignant pleural effusion in patients with non small cell lung cancer (Review). *Mol. Med. Rep*. 2018; 17(6): 8019-30.
29. Bachurina A.S., Bojko N.V., Oksenjuk O.S. Dynamics of cytokines in saliva in children with adenoids and adenoiditis. *Rossiyskaya rinologiya*. 2017; 25(3): 42-5. (in Russian)
30. Upile T., Jerjes W., Kafas P., Harini S., Singh S.U., Guyer M. et al. Salivary VEGF: a non-invasive angiogenic and lymphangiogenic proxy in head and neck cancer prognostication. *Int. Arch. Med*. 2009; 2(1): 12.
31. Polz-Dacewicz M., Strycharz-Dudziak M., Dworżański Ja., Stec A., Kocot Jo. Salivary and serum IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. *Infectious Agents and Cancer*. 2016; 11(1): 45.
32. Andisheh-Tadbir A., Hamzavi M., Rezvani G., Ashraf M.J., Fattahi M.J., Khademi B. et al. Tissue expression, serum and salivary levels of vascular endothelial growth factor in patients with HNSCC. *Braz. J. Otorhinolaryngol*. 2014; 80(6): 503-7.
33. Sosnin D. Yu., Gileva O.S., Mozgovaja L.A., Sivak E.Ju., Beleva N.S., Krivcov A.V. et al. NT - proBNP in saliva and serum in normal conditions and periodontitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(3): 164-8. (in Russian)
34. Sakai A., Ohshima M., Sugano N., Otsuka K., Ito K. Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid using a cytokine antibody array. *J. Periodontol*. 2006; 77(5): 856-64.
35. Ribeiro C.C.C., Pachêco C.J.B., Costa E.L., Ladeira L.L.C., Costa J.F., da Silva R.A et al. Proinflammatory cytokines in early childhood caries: Salivary analysis in the mother/children pair. *Cytokine*. 2018; 107: 113-7.
36. Citrin D.E., Hitchcock Y.J., Chung E.J., Frandsen J., Urick M.E., Shield W. et al. Determination of cytokine protein levels in oral secretions in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancies. *Radiat Oncol*. 2012; 7: 64.
37. Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M.S., Ehrlich H.P., Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg. Res*. 2009; 153(2): 347-58.
38. Yehya A.H.S., Asif M., Petersen S.H., Subramaniam A.V., Kono K., Majid A. et al. Angiogenesis: Managing the Culprits behind Tumorigenesis and Metastasis. *Medicina (Kaunas)*. 2018; 54(1): 8.
39. Siveen K.S., Prabhu K., Krishnankutty R., Kuttikrishnan S., Tsakou M., Alali F.Q et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges. *Curr. Vasc. Pharmacol*. 2017; 15(4): 339-51.
40. Prapulla D.V., Sujatha P.B., Pradeep A.R. Gingival crevicular fluid VEGF levels in periodontal health and disease. *J. Periodontol*. 2007 Sep; 78(9): 1783-7.
41. Pradeep A.R., Prapulla D.V., Sharma A., Sujatha P.B. Gingival crevicular fluid and serum vascular endothelial growth factor: their relationship in periodontal health, disease and after treatment. *Cytokine*. 2011; 54(2): 200-4.
42. Keswani S.G., Balaji S., Le L.D., Leung A., Parvadia J.K., Frischer J. et al. Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013; 21(4): 554-62.
43. Błochowiak K.J., Trzybulska D., Olewicz-Gawlik A., Sikora J.J., Nowak-Gabryel M., Kocięcki J. et al. Levels of EGF and VEGF in patients with primary and secondary Sjögren's syndrome. *Adv. Clin. Exp. Med*. 2018; 27(4): 455-61.
44. Błochowiak K., Sokalski J., Goluśńska E., Trzybulska D., Witmanowski H., Bodnar M. et al. Salivary levels and immunohistochemical expression of selected angiogenic factors in benign and malignant parotid gland tumours. *Clin. Oral Investig*. 2019; 23:995-1006.
45. Peach C.J., Mignone V.W., Arruda M.A., Alcobia D.C., Hill S.J., Kilpatrick L.E. et al. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19(4): pii: E1264.
46. Nazar Majeed Z., Philip K., Alabsi A.M., Pushparajan S., Swaminathan D. Identification of Gingival Crevicular Fluid Sampling, Analytical Methods, and Oral Biomarkers for the Diagnosis and Monitoring of Periodontal Diseases: A Systematic Review. *Dis Markers*. 2016; 2016:1804727.

Поступила 26.04.19

Принята к печати 07.05.19

© АЛЛАХВЕРДИЕВ В.А., 2019

Аллахвердиев В.А.

## КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-1В В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ОСТРЫХ ЯЗВЕННЫХ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ

Азербайджанский медицинский университет, 1022, Баку, Азербайджан

Целью исследования явилось изучение клинко-иммунологическое обоснование эффективности рекомбинантного интерлейкина-1β при хирургическом лечении больных с острых гастродуоденальных язвенных кровотечениях. Приведены результаты применения рекомбинантного интерлейкина-1β в комплексе базисных консервативных мероприятий при хирургическом лечении ОГДЯК. Язва желудка была у 20, двенадцатиперстной кишки – у 84, сочетанная язва – у 16 больных. По А.А. Шалимову с кровопотерей легкой степени госпитализирован 27, средней степенью – 62 и тяжелой степенью – 31 пациент. По J. Forrest у 29 выявлено активное кровотечение (F Ia, F Ib), у 67 – нестабильный гемостаз (F IIa, F IIb, F IIc) и у 24 – (стабильный гемостаз). F III. В рамках дифференцированной индивидуально-активной тактики, больные оперированы в экстренном (21), срочном (38) и отсроченном (35) порядке, а 26 человек перенесли ранние плановые операции. Больным основной группы (63) после операции в комплекс базисных терапевтических мероприятий дополнительно включили рекомбинантный интерлейкин-1β с учетом степени кровопотери и иммунных нарушений. Больные группы сравнения (57) до и после операции получили общепринятую стандартную базисную терапию без иммунокоррекции. В сравнительном аспекте доказано, что в послеоперационном периоде, на фоне стандартных консервативных мероприятий, применение рекомбинантного интерлейкина-1β положительно влияя на устранение вторичного иммунодефицитного состояния и цитокинового дисбаланса, значительно улучшает результаты хирургического лечения.

**Ключевые слова:** острые гастродуоденальные язвенные кровотечения; иммунитет; цитокиновый дисбаланс; цитокиноотерапия.

**Для цитирования:** Аллахвердиев В.А. Клинко-лабораторное обоснование эффективности рекомбинантного интерлейкина-1β в хирургическом лечении острых язвенных гастродуоденальных кровотечений. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 669-672. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-669-672>  
Allahverdiyev V.A.

### THE EFFICACY OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-1B IN SURGICAL TREATMENT OF ACUTE ULCER-ATIVES GASTRODUODENAL BLEEDINGS

Department of General Surgery of Azerbaijan Medical University, Baku

There was reported the results of the use of recombinant interleukin-1β in basic conservative measures in the surgical treatment of acute gastroduodenal ulcer bleeding. Gastric ulcer were in 20 patients, duodenal ulcer in 84 patients and combined ulcers in 16 patients. According to A.A. Shalimov hospitalized patients with mild blood loss were 27, moderate degree - 62 and severe degree - 31 patients. According to J. Forrest, 29 showed active bleeding (F Ia, F Ib), in 67 - unstable hemostasis (F IIa, F IIb, F IIc) and in 24 - F III. Within the framework of differentiated individual-active tactics, patients were operated in emergency (21), urgent (38), delayed (35), and 26 people underwent early planned operations. Patients in the main group (63) after the operation, was included recombinant interleukin-1β to the basic therapeutic measures additionally, taking into account the degree of blood loss and immune disorders. Patients of comparison group (57) before and after surgery received standard basic therapy without immunocorrection. In a comparative aspect, it has been proved that in postoperative period on the background of standard conservative measures, the use of recombinant interleukin-1β positively influences elimination of the secondary immunodeficiency and cytokine imbalance significantly improves the results of surgical treatment.

**Key words:** acute gastroduodenal ulcer bleeding; immunity; cytokine imbalance; cytokine therapy.

**For citation:** Allahverdiyev V.A. The efficacy of recombinant interleukin-1β in surgical treatment of acute ulcerative gastroduodenal bleedings. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 669-672 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-669-672>

**For correspondence:** Allahverdiyev Vidadi Agababa, doctorant at the Department of General Surgery; e-mail: [vidadi.allahverdiyev.71@mail.ru](mailto:vidadi.allahverdiyev.71@mail.ru)

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 03.08.2019  
Accepted 16.09.2019

**Введение.** Острые язвенные гастродуоденальные язвенные кровотечения (ОГДЯК) и в настоящее время остаются актуальной проблемой современной гастроэнтерологии [5, 12, 13]. Несмотря на применение современных

антисекреторных и антихеликобактерных препаратов, среди осложнений язвенной болезни (ЯБ) кровотечение встречается в 42-47% [4]. Летальность при ОГДЯК, по-прежнему, остается в пределах 6-16% [9, 11].

Исследованиями последних лет установлена значительная роль иммунных нарушений, в том числе цитокинового статуса в развитии ЯБ и ОГДЯК [3, 7, 8].

**Для корреспонденции:** Аллахвердиев Видади Агабаба оглы, докторант каф. общей хирургии; e-mail: [vidadi.allahverdiyev.71@mail.ru](mailto:vidadi.allahverdiyev.71@mail.ru)

Работами ряда авторов установлено лечебное действие рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  при гнойно-воспалительных заболеваниях длительно незаживающих ран трофических язв [1, 2].

Исходя из этого, по нашему мнению, включение в комплекс терапевтических мероприятий при хирургическом лечении ОГДЯК рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  – бета-лейкина в качестве иммуностимулятора и цитокинсодержащего препарата, позволит в некоторой степени устранить нарушения в иммунном и цитокиновом статусах и тем самым улучшить результаты хирургического лечения ОГДЯК.

Целью данного исследования является изучение клинико – иммунологическое обоснование эффективности рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  при хирургическом лечении больных с ОГДЯК.

**Материал и методы.** Обследовано 120 больных с ОГДЯК, из них 98 (81,7%) мужчин и 22 (18,3%) женщины в возрасте от 16 до 75 лет. Источником кровотечения была у 20 больных ЯБ желудка, у 84 – ЯБ двенадцатиперстной кишки (ДПК) и у 16 сочетанная язва.

По А.А. Шалимову кровопотеря легкой степени наблюдалась у 27, средней тяжести – у 62 и тяжелой степени – у 31 больного [6].

В стационаре при поступлении при первичном эндоскопическом исследовании выявлен источник геморагии, локализации и размеры язвы, а также оценено состояние гемостаза по J. Forrest [10]. У 29 больных выявлены признаки продолжающегося активного кровотечения (F1a, F1b), у 67 – нестабильный гемостаз (F1a, F1b, F1c) и у 24 больных – устойчивость гемостаза была оценена F1П. Эндоскопические методы гемостаза были применены в случаях продолжающегося кровотечения, неустойчивого гемостаза и высокого риска возобновления геморагии. У 3 больных с помощью эндоскопического гемостаза остановить кровотечение не удалось, а у 7 больных возник рецидив кровотечения.

В рамках дифференцированной индивидуально-активной тактики 21 больной оперирован в неотложном порядке в первые 2 ч после поступления в связи с невозможности остановки кровотечения эндоскопическим путем (F1a и F1b), рецидива геморагии и сочетания перфорации язвы с кровотечением.

В течение первых 72 ч после госпитализации сохранение высокого риска рецидива кровотечения была показанием к срочному оперативному вмешательству у 38 больных.

Показанием к отсроченным операциям у 35 больных в сроки 2-4 сут после госпитализации было сохранение реальной угрозы рецидива кровотечения.

26 больной на 10-18 сут после стабилизации гемостаза на фоне компенсации последствий острой кровопотери перенес ранние плановые операции. У этих больных показаниями к операции были хроническая каллезная язва, длительный язвенный анамнез, подозрение на малигнизацию, неэффективность неоднократных курсов консервативной терапии с частыми рецидивами, пенетрация язвы и выраженный стеноз привратника. Методы операции выбирали с учетом локализации и характера язвы, степени кровопотери и операционно-анестезиологического риска, тяжести состояния пациента. У большинства больных проводили условно-радикальные операции.

Клинический материал был разделен на 2 группы. Первую (сравнительную) составили 57 больных, полу-

чивших до и после операции стандартную консервативную терапию без иммунокоррекции. Во вторую (основную) группу были включены 63 больных, которым в послеоперационном периоде на фоне традиционной консервативной терапии назначали рекомбинантный интерлейкин-1 $\beta$  (регистрационный номер Р.№000222/01 от 20.12.07). Препарат назначали с учетом противопоказаний, дозу и продолжительность курса выбирали индивидуально в зависимости от объема кровопотери, глубины нарушений в иммунном и цитокиновом статусах: при кровопотере легкой степени – по 0,5мкг ежедневно (всего 3 суток), при средней тяжести – в течение 3 сут по 1мкг ежедневно, при тяжелой – в течении 5 сут по 1мкг ежедневно. Выбранную дозу препарата непосредственно перед введением растворяли в 1мл изотонического раствора натрия хлорида, доводя до объема 100-500 мл в зависимости от дозы и вводили в вену капельным путем в течение 2-3 ч. При внутривенном введении препарата побочные эффекты и осложнения не отмечались.

У всех больных при поступлении и на 3, 7 и 14-е сутки после операции в периферической крови проводили иммунофенотипирование лимфоцитов непрямым иммунофлюоресцентным методом с помощью моноклональных антител к молекулам различных CD-рецепторов: CD3+, CD4+, CD8+, CD19+. Также подсчитали соотношение CD4+/CD8+, определяли уровень IgA, M, G и ЦИК в сыворотке крови. Фагоцитарную активность нейтрофилов изучали путем определения ФИ и ФЧ.

Концентрацию про- и противовоспалительных цитокинов - TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1, 2, 4, 6, 8, 10 в сыворотке крови в динамике определяли методом ИФА. Также вычисляли соотношение TNF $\alpha$ /IL-10 и IL-2/IL-4.

Аналогичные данные 15 здоровых лиц приняли за норму.

Для статистической обработки полученных цифровых данных использовали параметрический (Уилкокксон – Манна – Уитни) метод.

**Результаты и обсуждение.** У больных обеих групп при поступлении в иммунном и цитокиновом статусах выявлен дисбаланс, глубина которого напрямую зависела от тяжести кровопотери. У больных сравнительной группы при кровопотере легкой степени до операции содержание CD3+- на 22,3% ( $p<0,001$ ), CD4+- на 18,6% ( $p<0,01$ ), CD4+/CD8+- на 27,3% ( $p<0,001$ ), ФИ – на 12,7% ( $p<0,01$ ) было меньше, а CD8+- на 8,6%, CD19+- на 31,1% ( $p<0,001$ ), IgA – на 15,0%, IgM – на 21,0%, IgG – на 27,6% ( $p<0,001$ ), ЦИК – на 46,3% ( $p<0,001$ ) и ФЧ – на 40,5% ( $p<0,01$ ) больше по сравнению с нормой. В то же время у этих больных на фоне статистически значимого повышения уровня TNF $\alpha$  в 3,9 раза, IFN $\gamma$  – в 3,2 раза, IL-1 – в 7,9 раза, IL-2 – в 7,2 раза, IL-4 – в 4,6 раза, IL-6 – в 19 раз, IL-8 – на 81,7%, наблюдалось снижение концентрации IL-10 на 33,3% по сравнению с нормальным значением. Индексы соотношения TNF $\alpha$ /IL-10 в 6,3 раза ( $p<0,01$ ) и IL-2/ IL-4 на 67,8% ( $p<0,001$ ) превосходили нормальные показатели. В послеоперационном периоде наблюдалась тенденция к нормализации изученных показателей иммунитета, однако к концу срока наблюдения оставались далеко от нормальных величин. Спустя 3 суток после операции прослеживалась аналогичная тенденция в отношении изученных цитокинов. Вместе с тем, на 14-е сутки, на фоне нормализации концентрации IL-10, содержание TNF $\alpha$  достоверно было больше нормы в 3,9 раза, IFN $\gamma$  – в 3 раз, IL-1 – в 4,3 раза, IL-2 – в 12,1 раза, IL-6 – 12 раз, IL-8 – на 69,3%. Содержание провоспалительного цито-

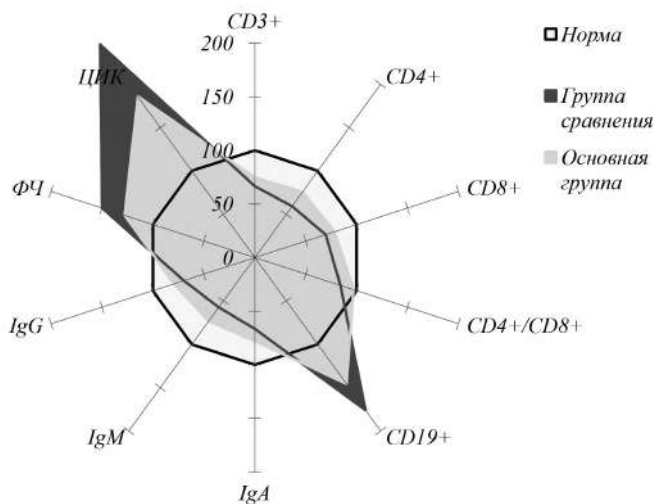


Рис. 1. Сравнительная оценка показателей иммунитета на 14-е сутки после операции при тяжелой степени кровопотери.

кина IL-4 в сыворотке крови в течение всего послеоперационного периода по сравнению с исходным показателем увеличилось в 6,0 раз ( $p_0 < 0,001$ ).

Включение рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  в общепринятую базисную консервативную терапию при кровопотере легкой степени к концу срока наблюдения привело к нормализации изученных показателей иммунитета. У этих больных основной группы на 14-е сутки после операции содержание IL-10 нормализовалось, а концентрация TNF $\alpha$  была на 46,6% ( $p_1 < 0,01$ ), IFN $\gamma$  – на 42,2% ( $p_1 < 0,01$ ), IL-1 – на 56,6% ( $p_1 < 0,001$ ), IL-2 – на 64,4% ( $p_1 < 0,001$ ), IL-4 – на 66,6% ( $p_1 < 0,001$ ), IL-6 – на 60,0% ( $p_1 < 0,01$ ), IL-8 – на 24,1% соответственно меньше аналогичных показателей группы сравнения.

У больных группы сравнения при кровопотере средней тяжести до операции имела место глубокое нарушение как в клеточном, так и в гуморальном звеньях иммунитета: статистически достоверно содержание CD3+ снижено на 31,3%, CD4+ – на 32,2%, CD8+ – на 18,2%, CD4+/CD8+ – на 19,4%, ФИ – на 17,5%, IgA – на 25,9%, IgM – на 22%, IgG – на 25,4%, наоборот, уровень CD19+ – повышен на 63,9%, ЦИК – в 2,2 раза и ФЧ – на 62,8% по отношению к показателям здоровых лиц. У этих больных наблюдался глубокий дисбаланс в цитокиновом статусе: концентрация TNF $\alpha$  достоверно была больше в 6,6 раза, IFN $\gamma$  – в 6 раз, IL-1 – в 10,4 раза, IL-2 – в 9,2 раза, IL-4 – в 6,8 раза, IL-6 – в 10,7 раза и IL-8 – в 2,7 раза, а содержание IL-10 на 45,6% меньше нормального показателя. Спустя 3-е суток после операции происходило постепенное незначительное уменьшение выраженности вторичного иммунодефицитного состояния. В первые 3 сут после операции концентрация IFN $\gamma$ , IL-1, IL-6 и IL-8, в течение первых 7 сут уровень TNF $\alpha$  и IL-4 достоверно повышался, а в дальнейшем наблюдалось содержание их секреции. К концу срока наблюдения уровень IL-10 на 32,5% ( $p < 0,05$ ) оставался ниже, а TNF $\alpha$  в 5,6 раза ( $p < 0,001$ ), IFN $\gamma$  – в 3,6 раза ( $p < 0,001$ ), IL-1 – в 7,2 раза ( $p < 0,001$ ), IL-2 – в 13,9 раза ( $p < 0,001$ ), IL-4 – 16,1 раза ( $p < 0,001$ ), IL-6 – 9,2 раза ( $p < 0,001$ ), IL-8 – в 2,0 раза ( $p < 0,001$ ) больше показателя здоровых лиц.

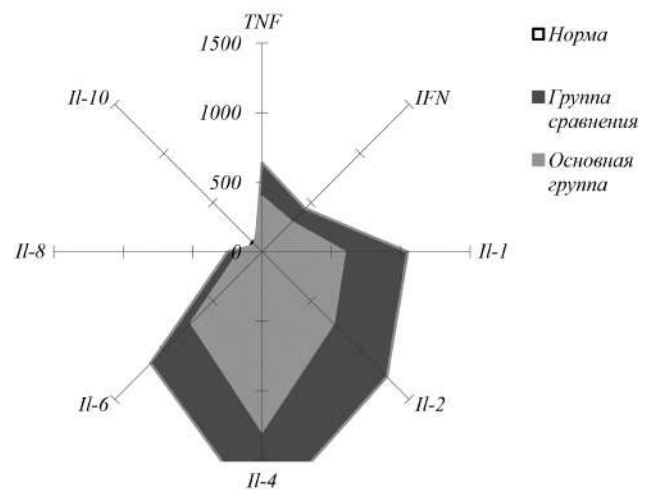


Рис. 2. Влияние рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  на показатели цитокинового статуса на 14-е сутки после операции при кровопотере тяжелой степени.

У больных основной группы благодаря иммунокорректирующему действию рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  на 14-е сутки после операции статистически достоверно содержание CD3+ – на 16,0%, CD4+ – на 22,6%, CD8+ – на 10,5%, ФИ – на 9,2%, IL-10 – на 30,7% было больше, и наоборот, уровень CD19+ – на 21,8%, ЦИК – на 27,0%, TNF $\alpha$  – на 34,4%, IFN $\gamma$  – на 26,4%, IL-1 – на 50%, IL-2 – на 57,8%, IL-4 – 33,5%, IL-6 – на 35,4%, IL-8 – на 34,9% соответственно меньше, чем в группе сравнения.

У больных обеих групп на фоне тяжелой степени кровопотери отмечалось глубокое вторичное иммунодефицитное состояние и цитокиновый дисбаланс. Так у больных группы сравнения отмечено статистически достоверное снижение уровня CD3+ – на 45,1%, CD4+ – на 45,7%, CD8+ – на 32,7%, ФИ – на 25,9%, IgA – на 37,1%, IgM – на 44,9%, IgG – на 30,4%, IL-10 – на 54,8%, и наоборот, повышение содержания CD19+ – на 88,4%, ЦИК – в 3,1 раза, ФЧ – на 75,4%, TNF $\alpha$  – в 7,2 раза, IFN $\gamma$  – 7,1 раза, IL-1 – в 11,4 раза, IL-2 – в 9,9 раза, IL-4 – в 7,7 раза, IL-6 – в 8,2 раза, IL-8 – в 3,0 раза по сравнению с нормой.

Сравнительная оценка показателей Т- и В- звеньев иммунитета, а также цитокинового профиля после операции при тяжелой степени кровопотери в динамике показало, что на фоне комплексных базисных лечебных мероприятий применение рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  оказало в значительной степени позитивное влияние на устранение вторичного иммунодефицитного состояния (рис. 1.) и цитокинового дисбаланса (рис.2).

В послеоперационном периоде умерли 6 больных (5%): 4 – в группе сравнения (7%) и 2 – в основной группе (3,2%). Проведение дифференцированной системной цитокинотерапии рекомбинантным интерлейкином-1 $\beta$  дало возможность снизить частоту послеоперационных осложнений с 22,8% до 9,5%.

**Выводы.** При острых гастродуоденальных язвенных кровотечениях развивается дисбаланс в иммунном и цитокиновом статусах глубина которого зависит от тяжести кровопотери. Хирургическое вмешательство при острых гастродуоденальных язвенных кровотечениях на фоне базисной консервативной терапии не устраняет нарушений иммунного и цитокинового статуса. Применение рекомбинантного интерлейкина-1 $\beta$  в дифференци-

рованной дозе является патогенетически обоснованным и позволяет сократить сроки восстановления иммунного и цитокинового дисбаланса и тем самым улучшить результаты хирургического лечения.

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Варюшина Е. А. Провоспалительные цитокины в регуляции процессов воспаления и репарации: Автореф. дис... д-ра биол. наук. Санкт Петербург; 2012.
2. Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 $\beta$  на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка. *Цитокины и воспаление*, 2012; 11(1): 64-9.
3. Гаджиев Дж.Н., Сушков С.В., Аллахвердиев В.А., Климова Л.Б., Гаджиев Н.Дж. Иммунные нарушения при острых язвенных гастродуоденальных кровотечениях. *Хирургия им. Н.И. Пирогова*, 2015; 6: 32-4.
4. Кубышкин В.А., Петров Д.Ю., Смирнов А.В. Методы эндоскопического гемостаза в лечении язвенных гастродуоденальных кровотечений. *Хирургия им. Н.И. Пирогова*, 2013; 9: 67 – 72.
5. Королев М.П. Гастродуоденальные кровотечения как проблема urgentной хирургии. *Вестник хирургии*, 2011; 2: 52-4.
6. Шалимов А.А., Саенко В.Ф. Хирургия пищеварительного тракта. Киев: *Здоров'я*; 1987.
7. Шапкин Ю.Г., Чалык Ю.В., Калужный А.И. Перспективность аутоиммунных тестов для прогнозирования течения и оценки эффективности проводимого лечения язв желудка и двенадцатиперстной кишки, сопровождающихся кровотечением. *Анналы хирургии*, 2011; 4: 55-8.
8. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А., Капранова Н.П. Язвенная болезнь - иммунодефицит с инфекционным синдромом. *Аллергология и иммунология*, 2007; 8(1): 139-44.
9. Botianu A., Matei D., Tantau M., Acalovschi M. Mortality and need of surgical treatment in acute upper gastrointestinal bleeding: a one year study in a tertiary center with a 24 hours week endoscopy call: Has anything changed. *Chirurgia (Bucur)*, 2013; 108 (3): 312-8.
10. Forrest J.A., Fiulayson N.D., Shearmen D.J. Endoscopy in Gastrointestinal bleeding. *J. The Lancet*. 1974; 304: 394-7.
11. Holster I.L., Kuipers E.J. Management of akute non variceal upper gastrointestinal bleeding: current policies and future perspectives. *World J. Gastroenterol*. 2012; 18 (11): 1202-7.
12. Lanos A., Upper G. Bleeding-associated mortality: challenges to improving a resistant outcome. *Am. J. Gastroenterol*. 2010; 105: 90-2.
13. Sung J.J., Tsoi K.K., Ma T.K., Yung M.Y., Lau J.Y., Chiu P.W. Causes of mortality in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective cohort study of 10428 cases. *Am. J. Gastroenterol*, 2011; 110: 138-44.

## REFERENCES

1. Varyushina E.A. Pro-inflammatory cytokines in the regulation of inflammation and repair processes: Diss. St. Petersburg; 2012. (in Russian)
2. Varyushina E.A., Aleksandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of topical application of recombinant human interleukin-1 $\beta$  on the repair of ulcerative lesions of the gastric mucosa. *Isitokiny i vospaleniye*. 2012; 11 (1): 64-9. (in Russian)
3. Gadzhiev J.N., Sushkov S.V., Allahverdiev V.A., Klimova L.B., Gadzhiev N.J. Immune disorders in acute ulcerative gastroduodenal bleeding. *Khirurgiya im. N.I. Pirogova*. 2015; 6: 32-4. (in Russian)
4. Kubyshekin V.A., Petrov D.Yu., Smirnov A.V. Methods of endoscopic hemostasis in the treatment of ulcerative gastroduodenal bleeding. *Khirurgiya im. N.I. Pirogova*. 2013; 9: 67-72. (in Russian)
5. Korolev M.P. Gastroduodenal bleeding as a problem of urgent surgery. *Vestnik khirurgii*. 2011; 2: 52-4. (in Russian)
6. Shalimov A.A., Sayenko V.F. Digestive tract surgery. Kiev : *Zdorov'ya*; 1987. (in Russian)
7. Shapkin Yu.G., Chalyk Yu.V., Kalyuzhny A.I. The prospect of autoimmune tests for predicting the course and evaluating the effectiveness of the treatment of gastric ulcers and duodenal ulcers, accompanied by bleeding. *Annaly khirurgii*. 2011; 4: 55-8. (in Russian)
8. Nesterova I.V., Shvydchenko I.N., Romenskaya V.A., Kapranova N.P. Peptic ulcer - immunodeficiency with infectious syndrome. *Allergologiya i immunologiya*. 2007; 8 (1): 139-44. (in Russian)
9. Botianu A., Matei D., Tantau M. Acalovschi M. Mortality and need of surgical treatment in acute upper gastrointestinal bleeding: a one year study in a tertiary center with a 24 hours week endoscopy call: Has anything changed. *Chirurgia (Bucur)*, 2013; 108 (3): 312-8.
10. Forrest J.A., Fiulayson N.D., Shearmen D.J. Endoscopy in Gastrointestinal bleeding. *J. The Lancet*. 1974; 304: 394-7.
11. Holster I.L., Kuipers E.J. Management of akute non variceal upper gastrointestinal bleeding: current policies and future perspectives. *World J. Gastroenterol*. 2012; 18 (11): 1202-7.
12. Lanos A., Upper G. Bleeding-associated mortality: challenges to improving a resistant outcome. *Am. J. Gastroenterol*, 2010; 105: 90-2.
13. Sung J.J., Tsoi K.K., Ma T.K., Yung M.Y., Lau J.Y., Chiu P.W. Causes of mortality in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective cohort study of 10428 cases. *Am. J. Gastroenterol*. 2011; 110: 138-44.

Поступила 03.08.19

Принята к печати 16.09.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Гусейнова А.С.

## ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И КАЛЬЦИЙРЕГУЛИРУЮЩИХ ГОРМОНОВ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Азербайджанский медицинский университет, 1022, Баку, Азербайджан

Целью исследования явилось изучение уровня некоторых цитокинов (IL-2, IL-6, IL-8 TNF $\alpha$ ) и кальцийрегулирующих гормонов (кальцитонина, паратгормона, 25(OH)D) в крови больных ревматоидным артритом (РА) в зависимости от серопозитивности по ревматоидному фактору (РФ) и оценка роли выявленных нарушений в патогенезе костных потерь при этой патологии. С этой целью обследовано 74 пациента с РА (59 женщин, 15 мужчин) в возрасте от 27 до 71 лет. По признаку наличия или отсутствия РФ в сыворотке крови больные были подразделены на 2 группы: серонегативный и серопозитивный РА. В контрольную группу вошли 16 практически здоровых лиц (13 женщин, 3 мужчин). Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о влиянии серологического варианта РА на сывороточные уровни провоспалительных цитокинов и кальцийрегулирующих гормонов: более выраженные изменения обнаружены при серопозитивном РА. Выявленная в обеих группах больных высокая продукция IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  и паратгормона, несомненно, вносит определенный вклад в механизмы костных потерь при РА. Одним из факторов, усугубляющих течение болезни, является наличие у больных независимо от наличия РФ гиповитаминоза D, что указывает на необходимость использования препаратов этого витамина в комплексном лечении заболевания.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит; провоспалительные цитокины; кальцитонин; паратгормон; витамин D.

**Для цитирования:** Гусейнова А.С. Особенности изменения цитокинового профиля и кальцийрегулирующих гормонов при ревматоидном артрите. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 673-676. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-673-676>

Huseynova A.S.

### CHANGES THE CYTOKINE PROFILE AND CALCIUM-REGULATING HORMONES IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Azerbaijan Medical University, 1022, Baku, Azerbaijan

The aim was to study the level of some cytokines (IL-2, IL-6, IL-8 TNF $\alpha$ ) and calcium regulating hormones (calcitonin, parathyroid hormone, 25 (OH) D) in the blood of patients with rheumatoid arthritis (RA) depending on rheumatoid factor (RF) and the assessment of the role of the revealed violations in the pathogenesis of bone loss in this pathology. For this purpose, 74 patients with RA (59 women, 15 men) aged from 27 to 71 were examined. On the basis of RF in the blood serum, the patients were divided into 2 groups: seronegative and seropositive RA. The control group included 16 healthy individuals (13 women, 3 men). The results obtained that the serological variant of RA affects the serum levels of proinflammatory cytokines and calcium-regulating hormones: more pronounced changes were found in seropositive RA. The high production of IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and parathyroid hormone detected in both groups of patients undoubtedly contributes to the mechanisms of bone loss in RA. In both groups we detected hypovitaminosis D. This results recommended to use this vitamin in the complex treatment of RA.

**Key words:** rheumatoid arthritis, inflammatory cytokines, calcitonin, parathormon, vitamin D.

**For citation:** Huseynova A.S. Changes the cytokine profile and calcium-regulating hormones in rheumatoid arthritis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64(11) 673-676. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-10-673-676>

**For correspondence:** Huseynova Asmaya Saftar, PhD student of Department of Biochemistry; e-mail: [ilhama.kerimova@bk.ru](mailto:ilhama.kerimova@bk.ru)

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 23.07.2019

Accepted 16.09.2019

**Введение.** Ревматоидный артрит (РА) является одним из наиболее распространённых и тяжелых хронических заболеваний суставов. Его частота в общей популяции составляет 1%, а у людей старше 65 лет достигает 3%. Через 10 лет после дебюта РА более 50% больных становятся инвалидами по причине заболевания, полностью утрачивая трудоспособность [1,7].

Несмотря на значительный прогресс в лечении РА, продолжительность жизни больных существенно ниже, чем в популяции, что объясняется как тяжестью течения

самого заболевания, так и его сочетанием с сердечно-сосудистой патологией, развитием серьезных инфекций, амилоидоза и вторичного остеопороза.

Проблеме остеопороза при РА в последнее время уделяется значительное внимание, так как от 28 до 77% больных имеют остеопенический синдром и остеопороз. Остеопороз при ревматоидном артрите относится к вторичным метаболическим остеопатиям, обусловленным нарушением процессов костного ремоделирования, которое ведет к прогрессивному снижению минераль-

**Для корреспонденции:** Гусейнова Асмая Сафтар кызы, докторант каф. биохимии; e-mail: [ilhama.kerimova@bk.ru](mailto:ilhama.kerimova@bk.ru)

ной плотности костной ткани как около пораженного сустава, так и во всем организме в целом. Факторами риска развития остеопороза, ассоциированными с РА, считаются хроническое воспаление, активность и длительность заболевания, деструктивные изменения в суставах, снижение функциональной активности, прием ряда лекарственных препаратов, негативно влияющих на метаболизм костной ткани [4,5,14].

Предполагается, что развитие ревматоидного воспаления и остеопороза при РА имеет общие патогенетические пути, где основная роль отводится нарушению соотношения про- и противовоспалительных цитокинов. Цитокины на тканевом уровне ответственны за развитие воспалительной реакции, а затем за регенерацию тканей. При системном воспалении цитокины оказывают влияние практически на все органы и системы организма, включая и процессы ремоделирования кости [11,12].

Наряду с цитокиновым дисбалансом в прогрессировании остеопенического синдрома немаловажную роль играют изменения в гормональном статусе больных. Как известно, костное ремоделирование находится под контролем основных кальцийрегулирующих гормонов – паратгормона (ПТГ), кальцитонина и активных метаболитов витамина D [1, 3].

Целью настоящего исследования явилось изучение уровня некоторых цитокинов и кальцийрегулирующих гормонов в крови больных РА в зависимости от серопозитивности по ревматоидному фактору (РФ) и оценка роли выявленных нарушений в патогенезе костных потерь при этой патологии.

**Материал и методы.** Обследовано 74 пациента РА (59 женщин, 15 мужчин) в возрасте от 27 до 71 лет, которые по признаку наличия или отсутствия РФ в сыворотке крови были подразделены на 2 группы: серонегативный и серопозитивный РА. В контрольную группу вошли 16 практически здоровых лиц (13 женщин, 3 мужчин).

Для оценки цитокинового статуса в крови всех лиц, вошедших в контингент исследования, были определены уровни цитокинов IL-2, IL-6, IL-8, TNF-α. В качестве кальцийрегулирующих гормонов определяли концентрацию кальцитонина, паратгормона, а также активный метаболит витамина D – 25(OH)D.

Концентрацию цитокинов, гормонов и витамина D устанавливали иммуноферментным методом анализа на микрострипповом фотометре для иммуноферментного анализа STAT FAX 303 Plus (США). При этом использовались наборы реактивов фирмы «Vector-Best» (Российская Федерация) для определения цитокинов, фирмы «IBL» (Япония) для определения содержания кальцито-

нина и паратгормона. Уровень витамина D оценивали по содержанию 25(OH)D посредством набора реактивов фирмы «Bioactiva Diagnostica» (Германия). Отметим, что 25(OH)D обладает длительным периодом полураспада, поэтому является наилучшим серологическим маркером для оценки статуса витамина D в организме.

Содержание РФ устанавливали турбидиметрическим методом посредством коммерческого набора фирмы «Linear» (Испания).

**Результаты и обсуждения.** Из 74 больных РА положительные титры РФ были обнаружены в сыворотке крови 53 пациентов (71,6%), средняя концентрация РФ у них составила  $55,2 \pm 1,08$  Ед/мл. У 21 пациента (28,4%) диагностировался серонегативный вариант РА, средняя концентрация РФ в этой группе составила  $9,36 \pm 0,28$  Ед/мл.

При исследовании цитокинового профиля у больных с серонегативным вариантом РА выявлено достоверное повышение концентрации провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6 и IL-8 по отношению к контролю соответственно в 2,5 раз ( $p < 0,05$ ), в 1,32 раз ( $p < 0,05$ ) и в 1,57 раз ( $p < 0,001$ ) (табл. 1).

Уровни изученных интерлейкинов при серопозитивном РА более значимо превышали контрольные значения: IL-2 в 3,4 раз ( $p < 0,01$ ), IL-6 в 1,77 раз ( $p < 0,001$ ) и IL-8 в 1,68 раз ( $p < 0,001$ ). При этом достоверных различий между двумя группами больных РА в уровне IL-2 и IL-8 не установлено, однако концентрация IL-6 при серопозитивном РА в 1,34 раз ( $p < 0,01$ ) превысила значения этого показателя в серонегативной группе.

Определение концентрации TNF-α у больных РА показало статистически достоверное повышение его уровня по сравнению с контролем: в 2,52 раз ( $p < 0,01$ ) в серопозитивной и в 2,16 раз ( $p < 0,05$ ) в серонегативной по РФ группе. При этом не выявлено статистически значимых различий между группами в содержании этого показателя.

Таким образом, у больных РА вне зависимости от серопринадлежности по РФ отмечаются изменения в цитокиновой системе, проявляющиеся повышением уровня провоспалительных цитокинов. Активация системы цитокинов, вероятно, играет критическую роль в периртикулярной и системной костной потере при РА. Провоспалительные цитокины, инициирующие воспалительный процесс, и в первую очередь, TNF-α и IL-8 признаны мощными стимуляторами костной резорбции, оказывающими влияние на остеокластогенез через остеобластную линию клеток [11,12].

При РА TNF-α продуцируется макрофагами синовиальной жидкости, и его биологическая активность опо-

Таблица 1

Цитокиновый статус у больных РА в зависимости от серопринадлежности по РФ

| Показатели   | Контроль,<br><i>n</i> =16      | Серонегативный РА,<br><i>n</i> =21   | Серопозитивный РА,<br><i>n</i> =53     |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| IL-2, пг/мл  | $0,58 \pm 0,35$<br>(0-5,80)    | $1,46 \pm 0,25^*$<br>(0,84-6,1)      | $1,97 \pm 0,18^{**}$<br>(0,93-7,65)    |
| IL-6, пг/мл  | $2,73 \pm 0,19$<br>(1,60-4,5)  | $3,6 \pm 0,27^*$<br>(1,25-6,18)      | $4,83 \pm 0,34^{***\#}$<br>(2,00-12,2) |
| IL-8, пг/мл  | $2,48 \pm 0,15$<br>(1,30-3,64) | $3,88 \pm 0,24^{***}$<br>(2,62-7,24) | $4,15 \pm 0,30^{***}$<br>(1,8-10,6)    |
| TNF-α, пг/мл | $0,75 \pm 0,28$<br>(0,10-4,84) | $1,62 \pm 0,32^*$<br>(0,63-7,2)      | $1,89 \pm 0,2^{**}$<br>(0,72-9,4)      |

Примечание: \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  - по сравнению с контролем; # -  $p < 0,01$  - при сравнении групп больных РА.

Таблица 2

**Кальцийрегулирующие гормоны у больных РА в зависимости от серопринадлежности по РФ**

| Показатели         | Контроль,<br>n=16        | Серонегативный РА,<br>n=21 | Серопозитивный РА,<br>n=53 |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Кальцитонин, пг/мл | 3,31±0,24<br>(0,78-5,0)  | 5,08±0,31*<br>(2,8-7,8)    | 5,36±0,28*<br>(3,0-8,4)    |
| Паратгормон, пг/мл | 40,5±1,94<br>(26,0-63,0) | 58,9±1,89*<br>(33,7-75,4)  | 65,3±1,52*#<br>(35,0-82,0) |
| 25(ОН)D            | 37,5±1,67<br>(30,3-48,7) | 23,8±1,27*<br>(12,3-34,8)  | 20,4±0,95*#<br>(10,8-32,0) |

Примечание: \* -  $p < 0,001$  - по сравнению с контролем; # -  $p < 0,05$  - при сравнении групп больных РА.

средуется связыванием со специфическими рецепторами, экспрессированными на нейтрофилах, эндотелиоцитах, фибробластах, кератиноцитах и т.д. TNF- $\alpha$  запускает механизм активации факторов транскрипции, которые, в свою очередь, индуцируют апоптоз и регулируют активность генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8) и других медиаторов воспаления [10,11].

IL-6 является важным медиатором регуляции хронического воспаления и остеокластопосредованной костной резорбции. Выявлена связь IL-6 и его растворимых рецепторов со способностью моноцитов и макрофагов дифференцироваться в остеокласты при РА. Гиперпродукция TNF- $\alpha$ , IL-6 и других цитокинов приводит к дисбалансу в системе трансмембранных рецепторов и их лигандов RANKL/RANK/OPG, что сопровождается гиперэкспрессией RANKL – мощного индуктора костной резорбции. OPG (остеопротегерин) – “ложный” растворимый рецептор для RANKL, который ингибирует остеокластогенез, блокируя связывание RANKL с RANK. Соотношение RANKL/OPG составляет главную детерминанту развития и прогрессирования костно-деструктивных изменений в суставах [2,6,9].

Результаты нашего исследования по изучению уровня кальцийрегулирующих гормонов в крови у больных РА отражены в табл. 2. Как видно из таблицы, установлено повышение концентрации кальцитонина в 1,53 раз ( $p < 0,001$ ) в серонегативной группе и в 1,62 раз ( $p < 0,001$ ) в серопозитивной группе по отношению к контролю. При этом достоверных различий в содержании этого показателя между группами больных РА не выявлено.

Исследование уровня ПТГ в сыворотке крови больных серонегативным РА показало его увеличение в 1,46 раз ( $p < 0,001$ ) по сравнению со здоровыми лицами. Концентрация этого гормона при серопозитивном РА превысила контрольные значения в 1,61 ( $p < 0,001$ ) раз и оказалась в 1,11 раз ( $p < 0,05$ ) выше соответствующего показателя в серонегативной группе.

В ходе наших исследований для оценки статуса витамина D в крови всех пациентов с РА и лиц контрольной группы мы определяли концентрацию 25(ОН)D. Отметим, что 25(ОН)D обладает длительным периодом полураспада, поэтому является наилучшим серологическим маркером для оценки статуса витамина D в организме. Уровень витамина D ниже 20 нг/мл расценивали как его дефицит, уровень в пределах от 20 до 30 нг/мл – как его недостаточность, а уровень в диапазоне 30-50 нг/мл – как нормативные значения.

Исследование 25(ОН)D в сыворотке крови лиц контрольной группы выявило колебание его уровня в

пределах от 30,3 до 48,7 нг/мл, что в среднем составило 37,5±1,67 нг/мл. Значения этого показателя у больных РА оказались достоверно ниже значений здоровых лиц и среднее содержание 25(ОН)D в группе больных с серонегативным РА составило 23,8±1,27 нг/мл, что в 1,57 раз ( $p < 0,001$ ) ниже контроля. В данной группе из 21 больного недостаточность витамина обнаружена у 12-ти, а дефицит – у 4 человек.

Серопозитивный РА сопровождался более выраженным гиповитаминозом D. Средний уровень 25(ОН)D в этой группе составил 20,4±0,95 пг/мл, что оказалось в 1,84 раз ( $p < 0,001$ ) ниже контрольных значений и в 1,17 раз ( $p < 0,05$ ) ниже значений в серонегативной группе. В данной группе из 53 пациентов недостаточность 25(ОН)D выявлена в 17 случаях, а дефицит – в 28 случаях.

Роль кальцитонина в процессах костного ремоделирования полностью не установлена. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что этот гормон препятствует остеолитическому действию ПТГ, кальцитриола и других веществ, повышающих костную резорбцию. Под действием кальцитонина нарушается внутренняя структура остеокластов, что оказывает ингибирующее влияние на их цитоплазматические функции [3]. Полагаем, что повышение кальцитонина у больных РА может быть компенсаторной защитной реакцией организма в ответ на увеличение резорбции кости.

Как известно, из кальцийрегулирующих гормонов наибольший вклад в регуляцию процессов костного метаболизма вносит ПТГ. Действие этого гормона на остеокласты осуществляется не напрямую, а через остеобласты. ПТГ стимулирует секрецию коллагеназы остеобластами, который растворяет протективный слой матрикса и подготавливает поверхность кости для остеокластической резорбции. Установлено, что активирующее действие ПТГ на зрелые остеокласты опосредовано также цитокинами. Предполагается, что стимулированные ПТГ остеобласты выделяют цитокины, активизирующие остеокласты и их предшественники. Этот процесс сопровождается рассасыванием костного матрикса и поступлением его компонентов в кровь [1,3,5].

Влияние витамина D на костную ткань также тесно связано с активностью ПТГ, поскольку кальцитриол в физиологических дозах без ПТГ не может влиять на транспорт кальция и фосфора. Витамин D усиливает как минерализацию кости (за счет стимуляции всасывания этих микроэлементов в кишечнике), так и остеокластическую резорбцию кости. Под действием действием его основного активного метаболита - кальцитриола ингибируется секреция ПТГ: напрямую (через синтез в остеоцитах фактора роста фибробластов-23 (FGF23))

и опосредованно (за счет возрастания уровня кальция в крови). Этот механизм объясняет, почему гиповитаминоз D вызывает вторичный гиперпаратиреоз [1,13].

Установлено, что кроме участия в кальций-фосфорном обмене, витамин D оказывает плеiotропное действие на многие физиологические процессы в организме, так как 1 $\alpha$ -гидроксилирование 25(OH)D до кальцитриола происходит не только в почках, но и во многих тканях. Местнопродуцируемый в клетках иммунной системы витамин D необходим для оптимального противовоспалительного ответа моноцитов и подавления экспрессии провоспалительных цитокинов, включая ФНО- $\alpha$ , IL-2, IL-6, ИЛ-8, ИФН- $\gamma$  и т.д. В ряде работ выявлена отрицательная корреляция витамина D с активностью РА. Предполагается, что активная форма витамина подавляет процессы разрушения хряща через ИЛ-1 $\beta$ -опосредованную продукцию металлопротеиназ матрикса. [8,13].

Учитывая все вышеуказанное можно предположить, что низкий уровень этого витамина в организме может стать индуктором воспаления и предиктором разрушения хрящевой ткани при РА.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о влиянии серологического варианта РА на сывороточные уровни провоспалительных цитокинов и кальцийрегулирующих гормонов: более выраженные изменения обнаружены при серопозитивном РА. Выявленная в обеих группах больных высокая продукция IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  и ПТГ, несомненно, вносит определенный вклад в механизмы костных потерь при РА. Одним из факторов, усугубляющих течение болезни, является наличие у больных независимо от наличия РФ гиповитаминоза D, что указывает на необходимость использования препаратов этого витамина в комплексном лечении заболевания.

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-14 см. REFERENCES)

1. Ермолаева М.В., Сокрыт О.П., Гейко И.А., Синяченко О.В., Перепала А.В., Такташов Г.С. и др. Остеотропные гормоны при ревматоидном артрите и остеоартрозе. *Проблемы остеологии*. 2016; 19(1): 8-14.
2. Корой П.В., Саритхала В.Д., Ягода А.В. Взаимосвязь молекул адгезии с дисбалансом медиаторов костного метаболизма при ревматоидном артрите. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2018; 20(1): 77-81.

3. Маклецкая И.В., Бобров А.И. Физиологические аспекты регуляции костного метаболизма. *Бюллетень Северного Государственного Медицинского Университета*, выпуск XXV, 2010; 2: 67-8.
4. Островский А.Б., Оттева Э.Н., Тарнавская Т.С. Остеопороз при ревматоидном артрите. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2012; 4: 142-4.

#### REFERENCES

1. Ermolaeva M.V., Sokrut O.P., Geiko I.A., Sinyachenko O.V., Perepala A.V., Taktashov G.S. et al. Osteotrophic hormones in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Problemy osteologii*. 2016; 19(1): 8-14. (in Russian)
2. Koroy P.V., Sarithala V.D., Yagoda A.V. Relationship of adhesion molecules with imbalance of mediators of bone tissue metabolism in rheumatoid arthritis. *Zdorov'ye i obrazovaniye v XXI veke*. 2018; 20(1): 77-81. (in Russian)
3. Makletskaya I.V., Bobrov A.I. Physiological aspects of the regulation of bone metabolism. *Byulleten' Severnogo Gosudarstvennogo Universiteta*. Vypusk XXV, 2010; 2 (25): 67-8. (in Russian)
4. Ostrovskiy A.B., Otteva E.N., Tarnavskaya T.S. Osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 4: 142-4. (in Russian)
5. Bellan M., Pirisi M., Sainaghi P.P. Osteoporosis in rheumatoid arthritis: role of the vitamin D/parathyroid hormone system. *Rev Bras Reumatol*, 2015; 55(3):256-63.
6. Fonseca J.E., Santos M.J., Canhao H., Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev*. 2009; 8: 538-42.
7. Ghazi M., Kolt S., Briot K., Fechtenbaum J., Paternotte S., Roux C. Prevalence of vertebral fractures in patients with rheumatoid arthritis: revisiting the role of glucocorticoids. *Osteoporosis Int*. 2012; 23(2): 581-7.
8. Gil A., Plaza-Diaz J., Mesa M.D. Vitamin D: Classic and novel actions. *Ann Nutr Metab*. 2018; 72(2): 87-95.
9. Gonzales-Alvaro I., Ortiz A.M., Tomero E.G., Balsa A., Orte J., Laffon A., Garcia-Vicuna R. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Ann. Rheum. Dis*. 2007; 66(12): 1675-1678.
10. Marotte H., Miossec P. Biomarkers to prediction of TNF- $\alpha$  response in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2010; 77(4): 297-305.
11. Mateen S., Zafar A., Moin S., Khan A.Q., Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinica Chimica Acta*. 2016; 455: 161-171.
12. Rahman A. Regulators of cytokine signaling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2007; 46: 1745-6.
13. Sainaghi P.P., Gibbin A. Vitamin D, inflammation and osteoporosis in rheumatoid arthritis. *The Open Rheumatol J*. 2018; 12: 261-78.
14. Sarkis K.S., Salvador M.B., Pinheiro M.M. Association between osteoporosis and rheumatoid arthritis in women: a cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*. 2009; 127(4): 216-222.

Поступила  
Принята к печати

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ахунов В.М.<sup>1</sup>, Сизова Ж.М.<sup>1</sup>, László Galgóczi<sup>2</sup>, Ахунова А.М.<sup>3</sup>, Лаврентьева Т.П.<sup>4</sup>

## РОЛЬ ЭРИТРОЦИТОВ В МЕХАНИЗМАХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ КРОВИ ПРИ ИНФЕКЦИИ ГРИБОМ РОДА *PAECILOMYCES*

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский Государственный Медицинский Университет им И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет. 119021, Москва, Россия;

<sup>2</sup>University of Szeged, FSCI, Department of Microbiology, Венгрия;

<sup>3</sup>ГБУЗ ГКБ им С.С.Юдина ДЗМ Минздрава РФ, 115487, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ГБУЗ Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) ДЗМ города Москвы, 115580, Москва Россия

Актуальность исследования обусловлена выявлением в цитоплазме эритроцитов у пациентов с аллергией и бронхиальной астмой при пециломикозе тканевых форм гриба *Paecilomyces variotii* или их цитоскелетов.

Цель исследования: изучить роль эритроцитов в механизмах неспецифической защиты организма хозяина в условиях хронической персистирующей инфекции крови грибом рода *Paecilomyces*. Обследованы 84 пациента с активацией пециломикозной инфекции в крови в возрасте от 16 до 72 лет (муж. - 39, жен. - 45). В качестве методов исследования использовались лабораторные, биохимические, аллерго-иммунологические и микробиологические исследования. Идентификация культур грибов осуществлялась фенотипически и с использованием филогенетического анализа. Установлен новый вид кислородозависимого механизма цитотоксичности эритроцитов, который определен их специфическими биологическими свойствами: за счет содержащегося в них кислорода, являющегося постоянным источником активных форм кислорода, возникающих при неферментативном окислении гемоглобина в метгемоглобин. Образующиеся при этом супероксид анион-радикал ( $O_2^-$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксил радикал ( $OH^\cdot$ ) обладают мощным бактерицидным действием, который, по-видимому, реализуется при захвате и погружении грибных клеток в цитоплазму эритроцитов, или в замкнутой полости, образованной ими вокруг крупных грибных клеток. В условиях хронической инфекции крови тканевыми формами грибов рода *Paecilomyces* кислородозависимая цитотоксичность эритроцитов за счет активированных форм кислорода, образующихся при неферментативном окислении гемоглобина в метгемоглобин, является главным механизмом санации крови от возбудителя инфекции при пециломикозе.

Ключевые слова: *Paecilomyces variotii*; фунгемия; пециломикоз; эритроциты; кислородозависимая цитотоксичность эритроцитов; лейкопения.

Для цитирования: Ахунов В.М., Сизова Ж.М., László Galgóczi, Ахунова А.М., Лаврентьева Т.П. Роль эритроцитов в механизмах неспецифической защиты крови при инфекции грибом рода *Paecilomyces*. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 677-680. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-677-680>.

Akhunov V.M., Sizova Zh.M., László Galgóczi, Akhunova A.M., Lavrentyeva T.P.

### ROLE OF ERYTHROCYTES IN MECHANISMS OF NONSPECIFIC PROTECTION OF BLOOD IN INFECTION CAUSED BY THE FUNGUS OF GENUS *PAECILOMYCES*

<sup>1</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>University of Szeged, FSCI, Department of Microbiology, Hungary;

<sup>3</sup>S.S. Yudin Municipal Clinical Hospital of the RF Ministry of Public Health, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Diagnostic Centre (Centre of Laboratory Studies), Moscow Department of Healthcare, Moscow, Russia

*Paecilomyces variotii* is a commonly occurring species in air and food, and it is also associated with many types of human infections. Tissue forms of the fungus *Paecilomyces variotii* or their cytoskeletons were revealed in the cytoplasm of erythrocytes in patients with allergy and bronchial asthma in paecilomycosis. Our study was aimed at investigating the role of red blood cells in the mechanisms of the nonspecific protection of the host in conditions of chronic persistent infection of the blood with the fungus of the genus *Paecilomyces*. We examined a total of eighty-four 16-to-72-year-old patients (39 men and 45 women) presenting with activation of paecilomycosis infection in blood. We used laboratory, biochemical, allergic-and-immunological and microbiological methods of study. Fungal cultures were identified phenotypically and by means of phylogenetic analysis. Our findings are suggestive of a new type of the oxygen-dependent mechanism of cytotoxicity of erythrocytes, which is caused by permanent formation of reactive oxygen species as a result of non-enzymatic oxidation of haemoglobin to methaemoglobin. The resulting superoxide anion radical ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ) exhibit a powerful bactericidal action which is, probably, activated when the fungal cells are captured and immersed in the erythrocyte cytoplasm or in a closed cavity formed by RBCs around large fungal cells. In conditions of chronic blood infection with tissue forms of fungi of the genus *Paecilomyces* oxygen-dependent cytotoxicity of erythrocytes is the main mechanism of readjustment of blood from the infectious agent of *Paecilomycosis*.

Key words: *Paecilomyces variotii*, fungemia; paecilomycosis; erythrocytes; oxygen-dependent cytotoxicity of red blood cells; leukemia.

**For citation:** Akhunov V.M., Sizova Zh.M., László Galgóczi, Akhunova A.M., Lavrentyeva T.P. Role of erythrocytes in mechanisms of nonspecific protection of blood in infection caused by the fungus of genus *Paecilomyces*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostica). 2019; 64 (11): 677-680. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-677-680>

**For correspondence:** Akhunov V.M., candidate of medical sciences, assistant, department of medical and social examination, emergency and outpatient therapy, Institute of Vocational Education; e-mail: [vaahunov@mosmedzdrav.ru](mailto:vaahunov@mosmedzdrav.ru)

Для корреспонденции: Ахунов Василий Михайлович, канд.мед.наук, ассистент кафедры МСЭ, неотложной и поликлинической терапии института профессионального образования; e-mail: [vaahunov@mosmedzdrav.ru](mailto:vaahunov@mosmedzdrav.ru)

**Information about authors:**

Akhunov V.M., <https://orcid.org/0000-0002-8348-3532>

**Financing.** The study had no sponsor support.

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

**Acknowledgments.** In memory of the first researchers and developers of the problem of N.A. Dekhkan-Khodzhaeva, T.P. Sizova, Z.E. Becker, M.A. Gazihodzhaeva, T.A. Naddachina, V.I. Shustova and O.I. Morozova dedicated.

Received 06.08.2019

Accepted 18.10.2019

**Введение.** Эритроциты – красные кровяные тельца – безъядерные форменные элементы крови, осуществляют транспорт  $O_2$  и  $CO_2$ , который выполняют с участием гемоглобина. Помимо участия в тканевом дыхании, эритроциты поддерживают кислотно-щелочное равновесие в крови, выполняют питательную и защитную функции. С помощью рецепторов они адсорбируют на своей поверхности и транспортируют аминокислоты, антитела, токсины и ряд лекарственных веществ [1]. В условиях паразитемии обнаружена способность эритроцитов разрушать внутриклеточные формы *Plasmodium* и *Babesia* [2]. Кроме того, у больных с аллергией и бронхиальной астмой в цитоплазме эритроцитов были выявлены тканевые формы *Paecilomyces* sp. или их цитоскелеты [3]. Эти наблюдения указывают на участие эритроцитов в цитотоксическом механизме неспецифической защиты крови при хронических инфекциях крови и, в том числе, при пециломикозе.

Грибы рода *Paecilomyces* [4-11] и близкий к ним аскомицет *Metarhizium viride* (ранее известный как *P. viridis*) [12,13], обнаружены у человека и рептилий в форме носительства или с признаками поражения кожи, слизистых оболочек, бронхолегочной системы и системного висцерального микоза.

*P. variotii* – возбудитель врожденной хронической персистирующей инфекции крови, биологические свойства которого и ускоренный жизненный цикл развития не позволяют его активному выделению из биологического материала от пациентов при использовании методов стандартного обследования [14]. Обладает диморфизмом и условно-патогенными свойствами. Тканевые паразитические формы гриба полиморфны, представлены сферами и дрожжеподобными клетками. Размеры его зрелых тканевых паразитических форм в большинстве наблюдений варьируют от 5 до 29 мкм в диаметре, но встречаются и более крупные формы, достигающие 130 мкм в диаметре. Главным резервуаром пециломикозной инфекции в природе является почва, а в организме человека – кровь. Главный путь передачи инфекции – трансплацентарный [15,16]. Резистентность к пециломикозной инфекции в организме хозяина осуществляется механизмами неспецифической защиты и специфического иммунитета. Иммунитет при пециломикозе нестерильный [3,17].

Цель исследования: изучить роль эритроцитов в механизмах неспецифической защиты организма хозяина в условиях хронической персистирующей инфекции крови грибом рода *Paecilomyces*.

**Материал и методы.** Обследованы 84 пациентов с активацией пециломикозной инфекции в крови в возрасте от 16 до 72 лет. Из них 39 – мужчин и 45 – женщин. Поводом для их обращения к аллергологу были

высыпания на кожных покровах, зуд кожи, кашель или приступы удушья. Развитию кожных или респираторных симптомов предшествовали кратковременное повышение температуры тела до 38-40°C, озноб, слабость, потливость, головные и мышечные боли, увеличение отдельных групп лимфатических узлов; или небольшое недомогание, повышенная потливость, сонливость и приступы озноба в вечернее время.

В данной группе пациентов, с выявленной активацией пециломикозной инфекцией в крови, находились: 39 пациентов с бронхолегочной астмой, 14 – с крапивницей, 8 – с нейродермитом, 1 – с синдромом Лайелла, 2 – с листовидной формой пузырчатки, 7 – с сепсисом, 4 – с атипичной пневмонией, 1 – с острым миелобластным лейкозом, 5 – с гиперэозинофильным синдромом, 2 – лейкомоидной реакцией эозинофильного типа, 1 – хроническим лимфолейкозом.

В программу обследования пациентов входили клинические, цитологические, лабораторные, биохимические, аллерго-иммунологические и микробиологические исследования. Диагноз пециломикоз ставили на основании результатов экспресс-диагностики пециломикоза путем микроскопического выявления и прямого количественного определения зрелых сферул в образце крови [18], а также культурального исследования. Выделение чистой культуры гриба осуществлялось по методу А.М. Ахуновой [14]. Взятие образцов крови от пациента осуществляют непосредственно в момент исследования. Идентификация культур грибов была осуществлена фенотипически и методами молекулярного исследования [19,20]. Для аллерго-иммунологического обследования использовали наборы для диагностики аллергических заболеваний и установления спектра причинно-значимых аллергенов внешней среды и гриба *Paecilomyces* spp. фирмы Dr. Fook laboratorien GmbH (Германия). Мазки крови фиксировались в спирт-формалиновой смеси и окрашивались по Гимза-Романовскому, гематоксилином и эозином, а также специфическими окрасками на тканевые формы грибов [21]. Цитологический состав мазков периферической крови изучали в световом микроскопе.

**Результаты.** Проведенный филогенетический анализ клинических штаммов грибов, выделенных из крови пациентов с аллергическими симптомами и бронхиальной астмой на фоне активации пециломикозной инфекции в крови, показал, что они имеют 100% сходство с

*Paecilomyces* sp. Количественное содержание зрелых сферул (округлые тельца с двухконтурной капсулой и заключенными в ней эндоспорами) в образцах крови пациентов колебалось от 16000 до 55000 (в среднем  $17580 \pm 326$  при норме  $3417 \pm 433$ ;  $p < 0,001$ ) в 1 мкл крови. Цитологический анализ мазков периферической крови во всех полях зрения выявлял обилие мелких тканевых

форм (эндоспоры, молодые клетки), которые располагались на клеточных мембранах эритроцитов или в их цитоплазме, чаще всего в виде цитоскелетов (рис. 1, а, б, см. обложку). Вокруг крупных грибных клеток обнаружено формирование замкнутой полости с оболочкой из склеенных между собой эритроцитов, в виде кольца, внутри которого первоначально, среди гемолизированных эритроцитов, обнаруживаются цитоскелеты тканевых форм гриба (рис. 1, в, см. обложку). Процесс завершается полным лизисом внутреннего содержимого полости с гомогенизацией и уплотнением ее стенки из эритроцитов, по-видимому, за счет отложения продуктов отхода завершено лизиса грибных клеток (рис. 1, г, см. обложку). Подобные кольца цитолиза, образованные вокруг крупных грибных клеток, встречаются в крови у всех пациентов с активацией пециломикозной инфекции в крови, но в разном количестве и степени такого проявления. Так, например, в мазках периферической крови пациентов с аллергией и бронхиальной астмой лизис тканевых форм гриба был завершённым (рис. 1, г), тогда как у больных с лейкемией (рис. 2, а), преимущественно встречались двойные кольца цитолиза из эритроцитов с незавершённым лизисом грибных клеток (рис. 2, б, в, г, см. обложку). Образование двойных колец цитолиза из эритроцитов у больных с лейкемией может свидетельствовать об ослаблении кислородзависимой цитотоксичности эритроцитов при данном виде патологии, вследствие чего длительное воздействие высокого уровня грибных клеток в крови может инициировать развитие данного заболевания.

В эксперименте при заражении 6 - 8-дневных развивающихся куриных эмбрионов, в область желточного мешка суспензией из клеток мицелия *P. variotii* в мазках периферической крови погибших и живых эмбрионов были обнаружены тканевые клетки гриба (рис. 3, а, см. обложку) и кольца цитолиза эритроцитов с завершённым лизисом грибных клеток или на разных этапах проявления этого процесса (рис. 3, б, см. обложку). Следовательно, кислородзависимый механизм цитотоксичности эритроцитов с образованием замкнутой полости из склеенных между собой эритроцитов, представленных в мазках периферической крови в виде колец цитолиза, заложен и реализуется в онтогенезе у различных представителей животного мира с периода эмбрионального развития.

**Обсуждение.** Гриб *Paecilomyces variotii* (anamorph *Byssoschlamys spectabilis*) повсеместно распространен в почве различных географических зон. Встречается в воздухе жилых помещений, загрязняет корм для животных, а также, вследствие повышенной жароустойчивости, пастеризованные пищевые продукты, является причиной многих заболеваний, поражая различные органы и системы [4]. В последние годы *P. variotii* признан одним из новых возбудителей оппортунистического микоза [4, 21 - 23]. Иммуитет при пециломикозе нестерильный. Резистентность хозяина к инфекции грибом рода *Paecilomyces* формируется за счет механизмов неспецифической защиты и специфического иммунитета, в тесной взаимосвязи его клеточного и гуморального звеньев [3].

Нами установлен новый вид кислородзависимого механизма цитотоксичности эритроцитов, который определен их специфическими биологическими свойствами: за счет содержащегося в них кислорода, являющегося постоянным источником активных форм кислорода, возникающих при неферментативном окислении гемо-

глобина в метгемоглобин. Образующиеся при этом супероксид анион-радикал ( $O_2^-$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксил радикал ( $OH^\cdot$ ) обладают мощным бактерицидным действием, который, по-видимому, реализуется при захвате и погружении грибных клеток в цитоплазму эритроцитов, а также в образованные ими замкнутые полости, состоящие из склеенных между собой эритроцитов.

Жизненный цикл развития паразитической формы *P. variotii* от эндоспоры до зрелой сферулы составляет 6 часов, с быстрым накоплением возбудителя в крови и развитием симптомов инфекции и интоксикации. Защитная реакция организма хозяина на данном этапе развития инфекции характеризуется умеренным или выраженным лейкоцитозом за счет палочкоядерной нейтрофилии и моноцитоза, с осуществлением фагоцитарных функций. И только к 4-7 дню начала активации пециломикозной инфекции в крови возникает специфический иммунный ответ с реализацией антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности крупных нефагоцитируемых размеров грибных клеток с участием эозинофилов и/или лимфоцитов (NK) [3, 24]. Кроме того, выявлена повышенная активация CD3+/CD16+56 (NKT-клеток) и CD3+/CD8+ (цитотоксических Т-лимфоцитов), которые обладают механизмом цитотоксического воздействия [25].

**Заключение.** Таким образом, основополагающая роль в санации крови от возбудителя пециломикозной инфекции, по-видимому, принадлежит механизмам неспецифической защиты и, главным образом, опосредованным кислородзависимой цитотоксичностью эритроцитов за счет активированных форм кислорода, образующихся в нем при неферментативном окислении гемоглобина в метгемоглобин. Именно кислородзависимая цитотоксичность эритроцитов играет важную роль в цитолизе грибных клеток при пециломикозе.

**Благодарности.** Памяти первых исследователей и разработчиков проблемы пециломикоза Н.А. Дехкан-Ходжаевой, Т.П. Сизовой, З.Э. Беккер, М.А. Газиходжаевой, Т.А. Наддачиной, В.И. Шустовой и О.И. Морозовой посвящается.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

ЛИТЕРАТУРА. (пп. 2, 4, 6-13, 18-20, 22, 23  
см. REFERENCES)

1. Биохимия крови. Учебник для вузов. Биохимия. Северин Е.С., ред. М.: GEOTAR-Media; 2006.
3. Ахунов В.М., Сизова Ж.М., Ахунова А.М., Лаврентьева Т.П., Айзина Н.Л. Клинико-иммунологическая характеристика и лабораторная диагностика бронхиальной астмы при пециломикозе. *Клиническая лабораторная диагностика* 2017; 62(11):693-8.
5. Ахунов В.М., Сизова Ж.М. Распространенность бронхиальной астмы пециломикозной этиологии и возможности фармакотерапии в амбулаторно-поликлинических условиях. *Биомедицина*. 2010; (3): 28-9.
14. Ахунова А. М. Лабораторная диагностика пециломикоза. *Лабораторное дело*. 1991;(4):55-8.
15. Абдухалик-заде Г.А. Роль *Paecilomyces* в развитии внутриутробной пневмонии. Дисс... канд. мед. наук. Самарканд; 1997.
16. Ахунова А.М., Абдухалик-заде Г.А., Абдусаломов А.А., Атакулов Б.М. Бекирова Т.Л., Хайдарова Г.М., Саидова С.М. Данные эпидемиологического обследования на пециломикоз рожениц и новорожденных Самаркандского региона. В кн.: Успехи меди-

- цинской микологии. Т. 10. Сергеев Ю.В., ред. М.: Национальная академия микологии; 2007.
17. Ахунова А. М., Шустова В.И. Клиническая и иммунологическая характеристика пециломикоза. *Клиническая медицина*. 1991;69(3): 64-7.
  21. Хмельницкий О.К. Гистологическая диагностика поверхностных и глубоких микозов. Ленинград: Медицина; 1973.
  24. Хайтов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР – Медиа; 2006.
  25. Ахунов В.М., Сизова Ж.М., Ахунова А.М., Лаврентьева Т.П. Патогенез миокардита у больных бронхиальной астмой при Пециломикозе. *Клиническая медицина*. 2017; 95(1):66-71.
  12. Sigler L, Gibas CFC, Kokotovic B, Bertelsen MF. Disseminated mycosis in veiled chameleons (*Chamaeleo calyptatus*) caused by *Chamaeleomyces granulomatis*, a new fungus related to *Paecilomyces viridis*. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(9):3182-92.
  13. Schmidt V., Klasen L., Schneider J., Hübel J., Pees M. Characterization of *Metarhizium viride* Mycosis in Veiled Chameleons (*Chamaeleo calyptatus*), Panther Chameleons (*Furcifer pardalis*), and Inland Bearded Dragons (*Pogona vitticeps*) Clinicfor Birds and Reptiles, *J. Clin. Microbiol.* 2017; March; 55(3): 832843.
  16. Akhunova A.M. Laboratory diagnosis of *Paecilomyces* infections. *Laboratornoe delo*. 1991;(4): 55-8. (in Russian)
  17. Abduhalikzade G.A.. The Role of *Paecilomyces* in the Development of Intrauterine Pneumonia. Diss. Samarkand; 1997. (in Russian)
  18. Akhunova A.M., Abduhalikzade G.A., Abdusalyamov A.A., Atakulov B.M., Bekirova T.L., Khaydarova G.M., Saidova S.M. Data of the epidemiologic study on maternal and neonatal paecilomycosis in the Samarkand region. In: Advances of Medical Mycology [Uspekhi meditsinskoy mikologii]. Sergeev Yu.V., ed. Moscow: Natsional'naya akademiya mikologii; 2007. (in Russian)
  19. Akhunova A.M., Shustova V.I. Clinical and immunological characteristics of paecilomycosis. *Klinicheskaya meditsina*. 1991;69(3): 64-7. (in Russian)
  20. Akhunov V.M. Features of Bronchial Asthma with *Paecilomyces*. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing; 2014. (in Russian)
  21. Samson R.A., Houbbraken J., Varga J., Frisvad J.C. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*. 2009; 22: 14–27.
  22. Jos Houbbraken Paul E. Verweij Anthonius J. M. M. Rijs Andrew M. Borman and Robert A. Samson. Identification of *Paecilomyces variotii* in Clinical Samples and Settings. *J. Clin. Microbiol.* 2010; Aug; 48(8): 2754–61.
  23. Khmel'nitsky O.K. Histological diagnosis of superficial and deep mycoses {Gistologicheskaya diagnostika poverkhostnykh i glubokikh}. Leningrad: Meditsina; 1973. (in Russian)
  24. Aguilar C., Pujol I., Sala J., Guarro J. Antifungal susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42(7):1601-4.
  25. Pastor F.J., Guarro J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces lilacinus* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006;12(10): 948-60.
  26. Khaitov R.M. Immunology: textbook for medical students. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)
  27. Akhunov V. M., Sizova Zh. M., Akhunova A. M., Lavrientieva T. P. Pathogenesis of myocarditis in patients with bronchial asthma in *Paecilomyces*. *Klinicheskaya meditsina*. 2017; 95(1): 66-71. (in Russian)
  1. Biochemistry of Blood. In: Biochemistry. Manual for higher education facilities. [Biokhimiya krovi. Severin E.S., ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)]
  2. Clark I. A., Richmond J. E., Wills E. J. and Allison A. C. Intraerythrocytic death of the parasite in mice recovering from infection with *Babesia microti*. *Parasitology*. 1977; 75: 189.
  3. Akhunov V. M., Sizova Zh. M., Akhunova A. M., Lavrientieva T. P., Aizina N. L. Clinic-immunological characteristics and laboratory diagnosis of bronchial asthma in paecilomycosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(11): 693-698. (in Russian)
  4. S. de Hoog J. Guarro J. Gene M. J. Figueras. Atlas of Clinical Fungi. 2<sup>nd</sup> ed., Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht. The Netherlands; 2000.
  5. Akhunov V.M., Sizova Z.M. The prevalence of asthma of the *Paecilomyces* etiology and possible pharmacotherapy for outpatients. *Biomeditsina*. 2010;5(3): 28-9. (in Russian)
  6. Swami T., Pannu S., Kumar M., Gupta G. Chronic invasive fungal rhinosinusitis by *Paecilomyces variotii*: A rare case report. *Indian J. Med. Microbiol.* 2016; Jan.-Mar.;34(1):103-6.
  7. Bellanger AP, Cervoni JP, Faucher JF, Weil-Verhoeven D, Ginot M, Deconinck E, Grenouillet F. *Paecilomyces variotii* Fungemia in a Patient with Lymphoma Liver Transplant. *Mycopathologia*. 2017; Aug;182(7-8): 761-5.
  8. Heshmatnia J, Marjani M, Mahdavian SA, Adimi P, Pourabdollah M, Tabarsi P. et al. *Paecilomyces formosus* Infection in an Adult Patient with Undiagnosed Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Immunol.* 2017. May;37(4): 342-6.
  9. Kuboi T, Okazaki K, Inotani M, Sugino M, Sadamura T, Nakano A, Kobayashi S, Ota A, Nishimura K, Yaguchi T. A case of cutaneous *Paecilomyces formosus* infection in an extremely premature infant. *J. Infect. Chemother.* 2016 May;22(5): 339-41.
  10. Skiada B, Pavleas I, Drogari-Apiranthitou M. Rare fungal infectious agents: a lurking enemy. *F1000 Res*. 2017; 6:1917. Doi: 10.12688/f1000research.11124.1
  11. Steiner B, Aquino VR, Paz AA, da Rocha Silla LM, Zavascki A, and Goldani LZ. *Paecilomyces variotii* as an Emergent Pathogenic Agent of Pneumonia. *Case Reports in Infectious Diseases*. 2013; 5:: 273848.

Поступила 10.10.19  
Принята к печати 20.10.19

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Харсеева Г.Г.<sup>1</sup>, Алиева А.А.<sup>1</sup>, Алексеева Л.П.<sup>2</sup>, Мангутов Э.О.<sup>1</sup>, Шовкун Л.А.<sup>1</sup>

### ЦИТОПАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ В СОСТАВЕ БИОПЛЕНКИ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия;  
<sup>2</sup>ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, Россия

При колонизации носоглотки токсигенными штаммами возбудителя дифтерии происходит выделение токсина, способствующего гибели эпителиальных клеток. У бактерионосителей развития клинической картины заболевания не происходит. Это связано с особенностями состояния их иммунной системы, особенностями продукции дифтерийного экзотоксина коринебактериями в составе биопленки. Цель - определение характера цитопатического действия *C. diphtheriae* в составе биопленки на культуре клеток CHO-K1. Исследованы планктонные и биопленочные (120- и 720-час.) культуры штаммов: *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665, *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox<sup>+</sup>* № 269, *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, выделенный от больного с диагнозом «дифтерия ротоглотки локализованная» *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» тох-геном. Биопленочные (120- и 720-ч) культуры штаммов возбудителя дифтерии получали по методике Watnik. ЦПД штаммов коринебактерий исследовали на культуре клеток CHO-K1 с учётом в инвертированном микроскопе. При исследовании ЦПД планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий установлено, что количество живых клеток CHO-K1 уже через 24 ч было незначительным ( $25,3 \pm 1,2\%$ ) и резко уменьшилось ( $2,5 \pm 0,5\%$ ) через 72 ч культивирования. Под воздействием биопленочных и, особенно, 720-ч культур обнаружена иная динамика ЦПД: количество живых клеток через 24 ч оставалось значительным ( $82,5 \pm 2,2\%$ ), при 72-часовом снижалось до  $25,0 \pm 3,0\%$ . При исследовании фильтратов планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» тох-геном выявлены аналогичные закономерности. Количество живых клеток CHO-K1 при воздействии фильтрата 720-час. биопленочной культуры было значительно выше ( $p \leq 0,05$ ), чем при исследовании токсигенных штаммов коринебактерий. Рассматривая характер ЦПД обнаружили, что для планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий свойственно изменение монослоя клеток, проявляющееся их истончением и удлинением. При исследовании 720-часовых биопленочных культур при 72-ч экспозиции обнаружено появление большого количества округлённых клеток (63-69%). Для ЦПД, формирующегося под воздействием фильтратов планктонных и биопленочных культур *C. diphtheriae* с «молчащим» тох-геном, штаммов недифтерийных коринебактерий, характерно округление клеток и формирование симпластов. В составе биопленки интенсивность ЦПД токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» тох-геном снижалась. ЦПД, проявляющееся истончением и удлинением клеток CHO-K1, связано с действием дифтерийного экзотоксина, округление - ферментов коринебактерий и, по всей видимости, фрагментов поверхностных структур - адгезинов. Пониженное выделение токсина и ферментов за пределы матрикса биопленки *C. diphtheriae* является важной причиной «бессимптомности» носительства при дифтерии.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; цитопатическое действие; планктонные и биопленочные культуры.

Для цитирования: Харсеева Г.Г., Алиева А.А., Алексеева Л.П., Мангутов Э.О., Шовкун Л.А. Цитопатическое действие возбудителя дифтерии в составе биопленки. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 681-685.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-681-685>

Kharseeva G. G.<sup>1</sup>, Alieva A. A.<sup>1</sup>, Alekseeva L. P.<sup>2</sup>, Mangutov Ye. O.<sup>1</sup>, Shovkun L. A.<sup>1</sup>

CYTOPATHIC EFFECT OF DIPHTHERIA PATHOGEN IN THE COMPOSITION OF BIOFILM

<sup>1</sup>Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russian Federation;

<sup>2</sup>Rostov-on-Don Plague Control Research Institute; 344002, Rostov-on-Don, Russian Federation

When the nasopharynx is colonized with toxigenic strains of the diphtheria pathogen, toxin is released, which contributes to the death of epithelial cells. But in bacterial carriers, the development of the clinical picture of the disease does not occur. This is due to the peculiarities of the state of their immune system, as well as the peculiarities of the production of diphtheria exotoxin by corynebacteria in the biofilm. **Goal.** Determining the nature of the cytopathic effect of *C. diphtheriae* as part of a biofilm in CHO-K1 cell culture. The planktonic and biofilm (120- and 720-hour) cultures of the strains were studied: *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665, *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox<sup>+</sup>* № 269, *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* isolated from a patient with a diagnosis Localized oropharyngeal diphtheria *C. diphtheriae gravis* with a silent tox-gene. Biofilm (120- and 720-hour) cultures of diphtheria pathogen strains were obtained according to the Watnik method. The cytopathic effect of corynebacterial strains was studied on a CHO-K1 cell culture, taking into account in an inverted microscope. When studying the cytopathic effect of planktonic cultures of toxigenic strains of corynebacteria, it was found that the number of living CHO-K1 cells after 24 hours was insignificant ( $25.3 \pm 1.2\%$ ) and sharply decreased ( $2.5 \pm 0.5\%$ ) after 72 hours of cultivation. Under the influence of biofilm and, especially, 720-hour cultures, a different cytopathic effect dynamics was found: the number of living cells after 24 hours remained significant ( $82.5 \pm 2.2\%$ ), while at 72-hour it decreased to  $25.0 \pm 3.0\%$ . In the study of filtrates of planktonic and biofilm cultures of *C. diphtheriae* strain with a «silent» tox-gene, similar patterns were revealed. However, the number of live CHO-K1 cells

when exposed to the filtrate of a 720-hour biofilm culture was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than when studying toxigenic strains of corynebacteria. Considering the nature of the cytopathic action, it was found that planktonic cultures of toxigenic strains of corynebacteria are characterized by a change in the cell monolayer, manifested by their thinning and elongation. The study of 720-hour biofilm cultures at 72-hour exposure revealed the appearance of a large number of rounded cells (63-69%). The cytopathic effect, formed under the influence of filtrates of planktonic and biofilm cultures of *C. diphtheriae* with a «silent» tox-gene, as well as strains of non-diphtheria corynebacteria, is characterized by rounding of cells and the formation of symplasts. In the biofilm, the intensity of the cytopathic effect of toxigenic *C. diphtheriae* strains and *C. diphtheriae* strain with a silent tox-gene decreased. CPD, manifested by thinning and lengthening of CHO-K1 cells, is associated with the action of diphtheria exotoxin, and rounding is associated with corynebacterial enzymes and, apparently, fragments of surface structures - adhesins. Decreased release of toxin and enzymes beyond the *C. diphtheriae* biofilm matrix is a significant cause of the «asymptomatic» carriage of diphtheria.

**Key words:** *Corynebacterium diphtheriae*; cytopathic effect; planktonic and biofilm cultures.

**For citation:** Kharseeva G. G., Alieva A. A., Alekseeva L. P., Mangutov Ye. O., Shovkun L.A. Cytopathic effect of diphtheria pathogen in the composition of biofilm. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 681-685 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-681-685>

**For correspondence:** Kharseeva Galina Georgievna; e-mail: galinagh@bk.ru

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

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

Received 05.09.2019  
Accepted 19.09.2019

Главным фактором патогенности *C. diphtheriae* является дифтерийный экзотоксин, который играет ключевую роль в патогенезе дифтерии и развитии осложнений. Попадая в организм человека, возбудитель дифтерии может вызывать развитие, как манифестированных форм инфекции, так и бессимптомных. В межэпидемический период, когда клинически выраженные формы дифтерии не регистрируются, эпидемический процесс поддерживается за счёт бактерионосителей [1]. При бактерионосительстве процесс колонизации эпителия верхних дыхательных путей ведёт к формированию биоплёнки. В составе биоплёнки адгезивность коринебактерий увеличивается, а инвазивность уменьшается [2]. При колонизации носоглотки токсигенными штаммами возбудителя дифтерии происходит выделение дифтерийного токсина, способствующего гибели эпителиальных клеток [3]. Развития клинической картины заболевания у бактерионосителей не происходит. Это связано с особенностями состояния их иммунной системы (высокий уровень анитоксического иммунитета и низкий – антибактериального, пониженный местный иммунитет) [3; 4]. С другой стороны, существенную роль в этом процессе могут играть и особенности продукции дифтерийного экзотоксина коринебактериями в составе биоплёнки.

Цель исследования - определение характера цитопатического действия *C. diphtheriae* в составе биоплёнки на культуре клеток

**Материал и методы.** Исследованы планктонные и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры штаммов: *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665, *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 6765, *C. diphtheriae mitis tox<sup>+</sup>* № 269, полученные из ГИСК им. Л. А. Тарасевича; *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, выделенный от больного с диагнозом «дифтерия ротоглотки локализованная» бактериологической лабораторией ФГКУ «1002 ЦГСЭН» Минобороны России г. Ростова-на-Дону; *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» tox-геном (отрицательный в тесте Элека и положительный при определении гена дифтерийного токсина в ПЦР), предоставленный МБУЗ «ГБ № 1 им. Н. А. Семашко Ростова-на-Дону». Исследованы планктонные культуры штаммов недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum* – 2 шт., *C. tuberculostearicum* - 1

шт., *C. propinquum* – 5 шт., *C. xerosis* – 1 шт., *C. accolens* – 1 шт., *C. amycolatum* – 1 шт.), выделенные от практически здоровых лиц.

Биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры штаммов возбудителя дифтерии получали по методике Watnik [5]. Определение токсигенности в тесте Элека (реакция преципитации в агаре) проводили в соответствии с указаниями [6]. Для тестирования гена дифтерийного токсина использовали ПЦР со специфическими праймерами, комплементарными двум участкам гена дифтерийного токсина, с помощью программы Vector NTI. Праймеры синтезированы в НПО «Литех» (Москва).

Исследованы фильтраты планктонных и биоплёночных (120 и 720 ч) культур штаммов коринебактерий (использовали мембранные фильтры фирмы «Millipore» (США) с размером пор 0,45 мкм), которые титровали в 96-луночном планшете в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и вносили в лунки с клетками СНО-К1 по 0,05 мл, предварительно удалив питательную среду. Каждый образец фильтрата культур коринебактерий исследовали в 7-8 повторах. Планшет инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 72 ч при температуре +37° С, влажности - 90% и концентрации CO<sub>2</sub> - 5%. Учёт производили через 24, 48, 72 часа.

Цитопатическое действие (ЦПД) исследованных культур штаммов коринебактерий на культуру клеток СНО-К1 учитывали в инвертированном микроскопе. Определяли количество жизнеспособных и изменённых клеток в инвертированном микроскопе по морфологическим и деструктивным изменениям в виде истончения, удлинения, округления, образования симпластов. Регистрацию результатов проводили с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Для этого лунки с интактной культурой клеток СНО-К1 (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию фильтратов исследованных культур коринебактерий (опыт) фиксировали на предметном столике. Клетки фотографировали через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз без дополнительного окрашивания.

Концентрацию токсина (Lf/мл) в исследованных фильтратах планктонных и биоплёночных культур штаммов

коринебактерий определяли в соответствии с рекомендациями, изложенными в общей фармакопейной статье [7].

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы *STATISTICA 12.0* (*StatSoftInc*, США) и *MedCalc* (версия 9.3.5.0).

**Результаты.** Все исследованные культуры коринебактерий предварительно протестированы в ПЦР и тесте Элека. Положительными в ПЦР оказались все планктонные и биоплёночные культуры штаммов *C. diphtheriae*, отрицательными – штаммов недифтерийных коринебактерий. В тесте Элека токсигенность проявили все планктонные и биоплёночные культуры штаммов *C. diphtheriae*, за исключением *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим *tox*-геном») и штаммов недифтерийных коринебактерий.

Исследование динамики ЦПД планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий показало (см. таблицу), что количество живых клеток СНО-К1 уже через 24 ч было незначительным ( $25,3 \pm 1,2\%$ ), уменьшилось до  $10,0 \pm 3,2\%$  через 48 ч, до  $2,5 \pm 0,5\%$  - через 72 часа. При исследовании фильтратов биоплёночных культур динамика ЦПД иная: количество живых клеток при 24-часовом воздействии оставалось значительным, при 72 ч - резко снижалось. При 72 ч экспозиции наибольшее количество живых клеток ( $p \leq 0,05$ ) обнаружено при исследовании фильтратов 720-часовых биоплёночных культур коринебактерий ( $25,0 \pm 3,0\%$ ). При рассмотрении ЦПД каждого из исследованных токсигенных штаммов коринебактерий (рис. 1) обнаружено, что к 72-му ч воздействия количество живых клеток наименьшее у планктонных и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox*<sup>+</sup> (циркулирующий) и *C. diphtheriae mitis tox*<sup>+</sup> № 269.

Результаты реакции флоккуляции показали, что содержание дифтерийного экзотоксина в фильтратах планктонных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* ( $50,0 \pm 0,2$  Лф/мл) не отличалось от такового по сравнению с 120-час. биоплёночными культурами, но выше ( $p \leq 0,05$ ), чем у 720-часовых биоплёночных ( $36,9 \pm 0,2$  Лф/мл). В фильтратах культур штаммов *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим *tox*-геном») и штаммов недифтерийных коринебактерий дифтерийный экзотоксин в реакции флоккуляции не обнаружен.

При исследовании фильтратов планктонных и биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном (см. табл. 1) выявлены аналогичные за-

кономерности ЦПД. Количество живых клеток СНО-К1 при воздействии фильтрата 720-часовой биоплёночной культуры значительно выше ( $p \leq 0,05$ ), чем при исследовании таких же культур токсигенных штаммов коринебактерий. Фильтраты планктонных культур штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от практически здоровых обследованных, по сравнению с аналогичными культурами возбудителя дифтерии, оказывали менее выраженное ЦПД на клетки СНО-К1. Способность недифтерийных коринебактерий, не продуцирующих токсин, оказывать ЦПД на клетки СНО-К1 свидетельствует о том, что этот эффект может быть вызван не только токсином, но и другими имеющимися у них субстанциями.

При рассмотрении характера ЦПД обнаружено, что для планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий свойственно изменение монослоя клеток, проявляющееся их истончением и удлинением (рис. 2). При исследовании 720-часовых биоплёночных культур при 72-ч экспозиции (см. рис. 1, 2) обнаружено появление большого количества округлённых клеток (63-69%). Для ЦПД, формирующегося под воздействием фильтратов планктонных и биоплёночных культур *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном, штаммов недифтерийных коринебактерий, характерно округление клеток и формирование симпластов.

**Обсуждение.** ЦПД на клетки СНО-К1 оказывали как токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, так и штамм *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном и недифтерийные коринебактерии, выделенные от практически здоровых лиц. ЦПД штаммов *C. diphtheriae* более выражено, чем недифтерийных коринебактерий. При исследовании биоплёночных культур коринебактерий и, особенно, 720-часовой, интенсивность ЦПД ( $p \leq 0,05$ ) значительно снижалась.

Обнаружены существенные различия характера ЦПД различных культур и штаммов коринебактерий. ЦПД планктонных и биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* проявлялось истончением и удлинением клеток СНО-К1, что, по всей видимости, обусловлено действием дифтерийного экзотоксина. У 720-часовых биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* при некотором снижении уровня выделения токсина, что показали результаты реакции флоккуляции, помимо истончения и удлинения клеток наблюдалось и округление. Это свидетельствует о снижении интенсивности выделения дифтерийного токсина штаммами *C. diphtheriae* в составе биоплёнки по сравнению с планктонными культурами. Это может быть связано, с одной стороны, с формированием межмикробного матрикса, препятствующего выделению токсина за его пределы. С другой, - со снижением интенсивности процессов метаболизма и синтеза факторов патогенности бактериями в составе биоплёнки. При разрушении биоплёнки с последующим пересевом культуры возбудителя на сыровороточный агар, интенсивность выделе-

Динамика ЦПД фильтратов планктонных и биоплёночных культур коринебактерий

| Исследованные штаммы                                                                                                                                                                                                                               | Культура                 | Количество живых клеток СНО-К1 (%) |           |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------|-----------|
|                                                                                                                                                                                                                                                    |                          | 24 ч                               | 48 ч      | 72 ч      |
| Токсигенные штаммы ( <i>C. diphtheriae gravis tox</i> <sup>+</sup> (циркулирующий), <i>C. diphtheriae gravis tox</i> <sup>+</sup> № 665, <i>C. diphtheriae gravis tox</i> <sup>+</sup> № 6765, <i>C. diphtheriae mitis tox</i> <sup>+</sup> № 269) | Планктонная              | 25,3±1,2                           | 10,0±3,2  | 2,5±1,0   |
|                                                                                                                                                                                                                                                    | 120-часовая биоплёночная | 86,6±2,2*                          | 17,5±5,0  | 2,5±1,2   |
|                                                                                                                                                                                                                                                    | 720-часовая биоплёночная | 82,5±2,2*                          | 52,5±2,6* | 25,0±3,0* |
| <i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -геном)                                                                                                                                                                                      | Планктонная              | 7,5±1,2                            | 0         | 0         |
|                                                                                                                                                                                                                                                    | 120-часовая биоплёночная | 85,0±5,3*                          | 91,7±5,0* | 0         |
|                                                                                                                                                                                                                                                    | 720-часовая биоплёночная | 82,1±3,4*                          | 79,3±4,5* | 83,2±4,3* |
| Недифтерийные коринебактерии (n=11)                                                                                                                                                                                                                | Планктонная              | 57,3±3,3                           | 32,2±2,1  | 23,6±2,3  |

Примечание. \* - показана достоверность различий ( $p \leq 0,05$ ) между планктонными и биоплёночными культурами штаммов коринебактерий при каждой экспозиции культивирования

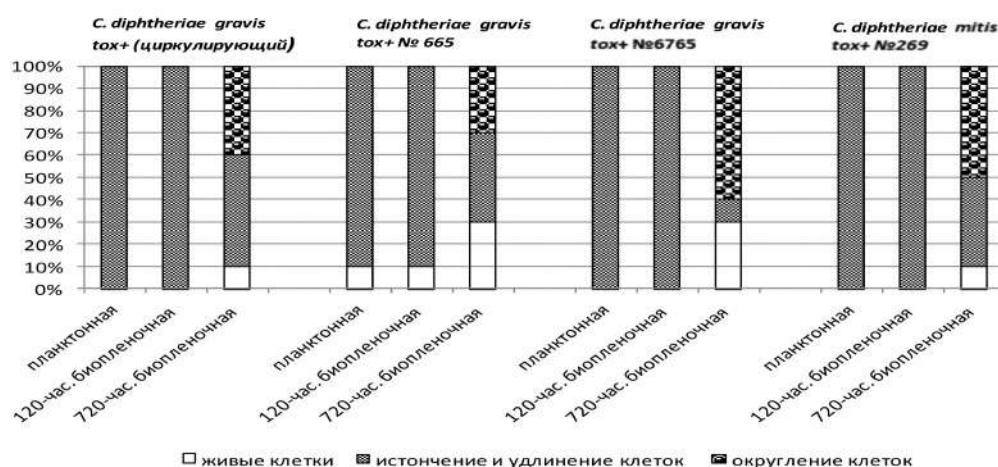


Рис. 1. Характер ЦПД планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* (экспозиция - 72 часа).

ния токсина восстанавливалась. Обнаруженные закономерности имеют и патогенетическое значение: небольшое количество токсина, выделяемое за пределы биоплёнки у бактерионосителей, успешно блокируется анитоксическими антителами и развития клинических проявлений дифтерии не происходит [1]. Причина «бессимптомности» носительства при дифтерии состоит не только в том, что у бактерионосителей, как правило, имеется высокий уровень анитоксических антител, что позволяет полностью нейтрализовать токсин. Важное значение имеет и тот факт, что в их организме формируется биоплёнка и, как следствие этого, количество выделяемого токсина возбудителем за пределы матрикса снижается.

Для планктонных и биопленочных культур штаммов, не продуцирующих дифтерийный экзотоксин

(*C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном и недифтерийных коринебактерий) характерно ЦПД в виде округления клеток СНО-K1 и образования симпластов. Наблюдавшееся нами изменение клеток СНО-K1 в виде округления у биопленочных культур не связано с действием токсина, а может быть обусловлено ферментами коринебактерий (протеаза, нейраминидаза и др.), фрагментами поверхностных структур – адгезинов, проникших через поры бактериальных фильтров. На способность поверхностных структур коринебактерий

оказывать повреждающий эффект указывают и другие авторы [8]. Учитывая, что адгезивная активность *C. diphtheriae* в составе биоплёнки увеличивается, изменение характера ЦПД в виде округления у 720-час. биопленочных культур токсигенных штаммов коринебактерий может происходить под влиянием их адгезии на клетках СНО-K1, что и способствует их округлению. При исследовании биопленочных и, особенно 720-час. культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном количество изменённых в виде округления клеток СНО-K1 значительно меньше ( $p \leq 0,05$ ), чем у планктонных культур коринебактерий. Округление клеток СНО-K1 с последующим образованием симпластов могло быть результатом как патогенного действия коринебактерий, так и метаболических процес-

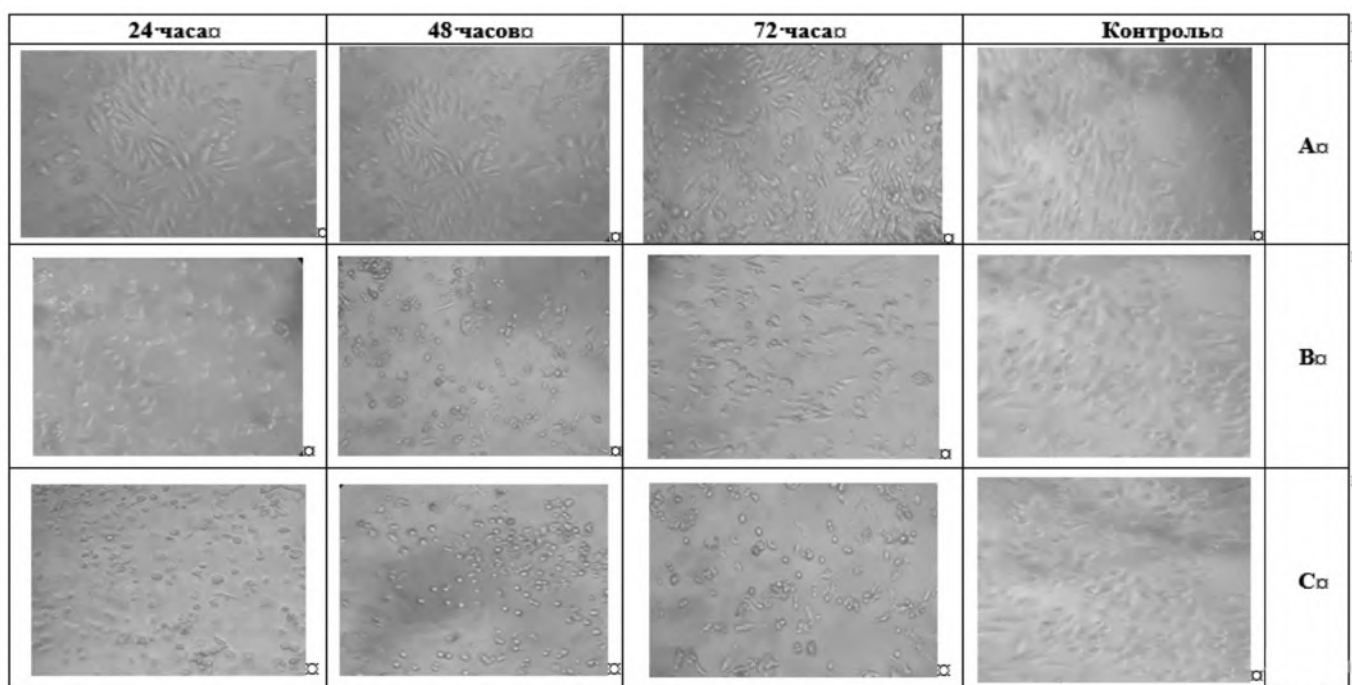


Рис.2. Характер ЦПД планктонных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А), *C. diphtheriae gravis* (с молчащим *tox*- геном) (В) и недифтерийных коринебактерий (С).

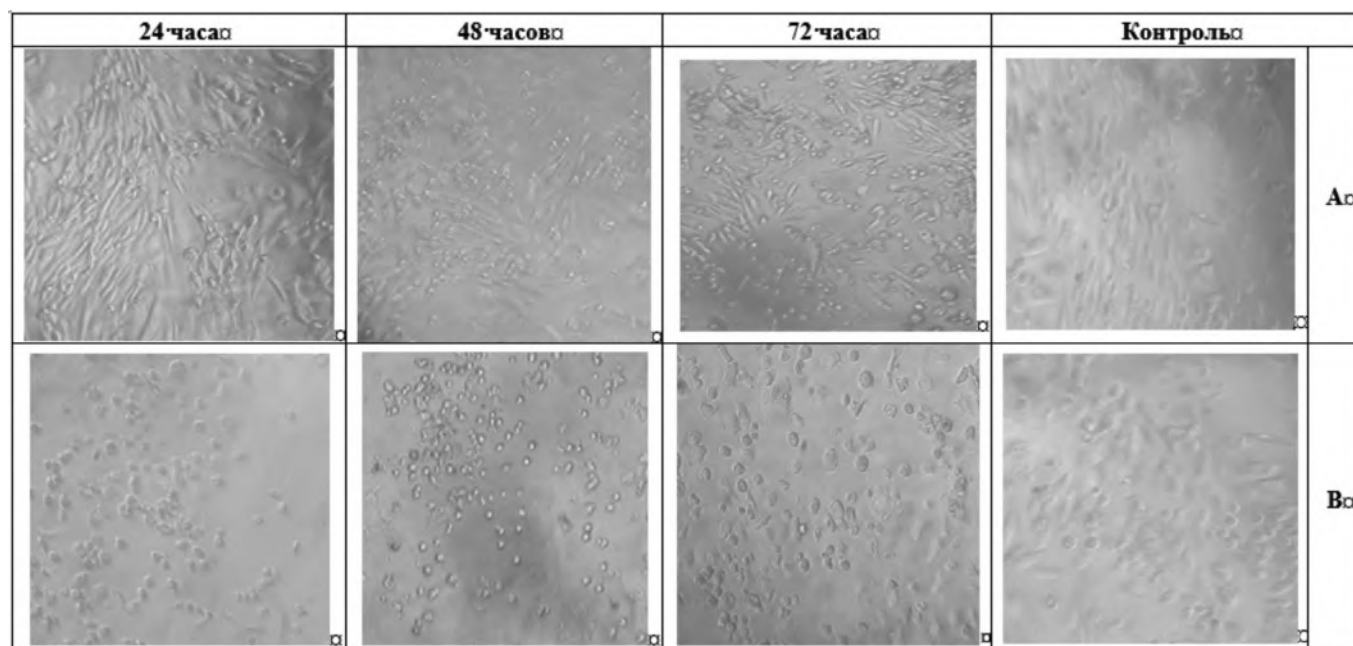


Рис. 3. Характер ЦПД 720-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А) и *C. diphtheriae gravis* (с молчащим tox-геном) (В).

Ув.х 100 раз без дополнительного окрашивания.

сов, интенсивность которых у них резко снижается в составе биоплёнки.

**Заключение.** В составе биоплёнки интенсивность ЦПД токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» tox-геном снижалась, что свидетельствует о малой интенсивности выделения факторов патогенности и замедлении метаболических процессов. ЦПД в виде истончения и удлинения клеток СНО-К1, связано с действием дифтерийного экзотоксина, округление – с действием ферментов коринебактерий, и, возможно, фрагментов поверхностных структур – адгезинов. Пониженное выделение токсина и ферментов за пределы матрикса биоплёнки *C. diphtheriae* является важной причиной «бессимптомности» носительства при дифтерии.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Дифтерийное бактерионосительство. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 60-70.
2. Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Лабущкина А.В., Воронина Н.А., Тюкавкина С.Ю. Способность к адгезии и инвазии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. *Проблемы медицинской микологии*. 2017; 2 (19): 32.
3. Кветная А.С., Иванов В.В., Корженевская Г.Б., Родионова О.В., Быченко Д.С., Волкова М.О. Адаптационные механизмы формирования бактерионосительства *Corynebacterium diphtheriae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 4: 31-6.
4. Шмелева Е.А., Макарова С.И., Батурина И.Г., Корженкова М.П., Чистякова Г.Г., Ксенофонтowa М.П. Специфические антитела и их роль в формировании противодифтерийного иммунитета. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2005; 1: 38-43.
5. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. of Bacteriol.* 2000; 182(10): 2675-9.

6. Лабораторная диагностика дифтерии. Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2013.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации XII. М.: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»; 2008.
8. Weerasekera D., Möller J., Kraner E., Antunes K. A., Matos-Guaraldi A.L., Burkovski A. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiologi*. 2019. doi: 10.1099/mic.0.000820

#### REFERENCES

1. Kostyukova N.N., Bechalo V.A. Diphtheria Carriage. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2018; 17(5): 60-70. (in Russian)
2. Alieva A.A., Kharseeva G.G., Labushkina A.V., Voronina N.A., Tjukavkina S.Ju. The ability to adhesion and invasion of typical and biofilm cultures of toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2017; 2 (19): 32.
3. Kvetnaja A.S., Ivanov V.V., Korzhenevskaja G.B., Rodionova O.V., Bychenko D.S., Volkova M.O. Adaptive mechanisms of the formation of the bacteriocarrier *Corynebacterium diphtheriae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 4: 31-6. (in Russian)
4. Shmeleva E.A., Makarova S.I., Baturina I.G., Korzhenevskaja M.P., Chistjakova G.G., Ksenofontova M.P. Specific antibodies and their role in the formation of anti-diphtheria immunity. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2005; 1: 38-43. (in Russian)
5. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. of Bacteriol.* 2000; 182(10): 2675-9.
6. Laboratory diagnosis of diphtheria. Methodical instructions. Moscow: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebнадзора; 2013. (in Russian)
7. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XII. Moscow: Nauchnyi tsentr sredstv ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya; 2008. (in Russian)
8. Weerasekera D., Möller J., Kraner E., Antunes K.A., Matos-Guaraldi A.L., Burkovski A. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiologi*. 2019. - doi: 10.1099/mic.0.000820

Поступила 05.09.19

Принята к печати 19.09.19

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЕРИФИКАЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, Россия

На основании экспериментальных исследований при 10-кратных разведениях двух разных по молекулярно-генетической характеристике штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа получены комплексные данные одновременного учета трех показателей их верификации (титра вируса, ИФА и ПЦР-РВ). Эффективность выявления генетического маркера в ПЦР по сравнению с ИФА для слабопатогенного штамма, имеющего дефекты в генетической структуре, была выше в 10 раз, а для высокопатогенного штамма – в 5000 раз. Одновременно положительные результаты в обеих реакциях относительно двух штаммов выявляли при титре вируса не менее, чем  $1-1,5 \log TCID_{50}$ , т.е. этот уровень вируса в пробе определен как эпидемически значимый. Предложен алгоритм проведения исследований по верификации ВКЭ: 1. Клеи, собранные с растительности, могут быть исследованы в ИФА или в ПЦР. Все положительные результаты можно суммировать и считать вирусопорностью иксодовых клещей; 2. Все пробы с положительными результатами только в ПЦР или ИФА необходимо исследовать в двух реакциях, чтобы получить подтверждение возможной инфекционности возбудителя; 3. Для получения быстрого комплексного результата зараженности снятых клещей с пациентов или крови после укуса клеща исследования необходимо проводить сразу одновременно в двух реакциях в ИФА и ПЦР; 4. Выделение вируса проводить в биологических пробах (клеи, собранные с растительности, клещи, снятые с пациентов, кровь больных и с подозрением на КЭ, млекопитающие) только при совпадающих результатах в ПЦР и ИФА. Таким образом, такой подход к верификации вируса КЭ в клеще или в крови пациентов позволит улучшить достоверность лабораторной диагностики, выявляя не только маркеры ВКЭ, но и предопределяя инфекционность возбудителя, что может явиться основанием для назначения ранней интенсивной противовирусной терапии.

**Ключевые слова:** ИФА; ПЦР-РВ; концентрация (титр) высоко- и низко- патогенных штаммов вируса КЭ.

**Для цитирования:** Леонова Г.Н. Сравнительный анализ эффективности методов верификации вируса клещевого энцефалита. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 686-689. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>

Leonova G.N.

### COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS EFFICIENCY OF VIRIFICATION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITE VIRUS

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

Based on experimental studies with 10-fold dilutions of two the strains TBEV of the Far Eastern subtype, different in molecular-genetic characteristic complex data of simultaneously taking into account three indicators of their verification (virus titer, ELISA and PCR-RT) were obtained. The efficiency of detecting a genetic marker in PCR compared with ELISA for a weakly pathogenic strain with defects in the genetic structure was higher by a factor of 10, and for a highly pathogenic strain by a factor of 5,000. At the same time, positive results in both reactions with respect to two strains were detected with a virus titer of not less than  $1-1.5 \log TCID_{50}$ , i.e. this level of virus in the sample is defined as epidemically significant. An algorithm for conducting research on the verification of TBEV is proposed: 1) Ticks collected from vegetation can be examined by ELISA or by PCR. All positive results can be summarized and considered viral ticks; 2) All samples with positive results only in PCR or ELISA must be investigated in two reactions in order to obtain confirmation of the possible infectivity of the pathogen; 3) To obtain a fast complex result of infection of the removed ticks from patients or blood after a tick bite, studies should be carried out simultaneously in two reactions simultaneously in ELISA and PCR; 4) Isolation virus should be carried out in biological samples (ticks collected from vegetation, ticks removed from patients, the blood of patients with suspected TBE, mammals) only with the same results in PCR and ELISA.

Thus, such an approach to verifying TBEV in a tick or in the blood of patients will improve the reliability of laboratory diagnostics, identifying not only markers of TBEV, but also determining the infectivity of the pathogen, which may be the basis for the appointment of early intensive antiviral therapy.

**Key words:** ELISA; PCR-RT; concentration (titer) of high and low pathogenic strains of TBEV.

**For citation:** Leonova G.N. Comparative analysis of methods efficiency of virification of the tick-borne encephalite virus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (11): 686-689. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-686-689>

**For correspondence:** Galina N. Leonova, Chief Researcher, Laboratory of Natural Focal Transmissible Infections, Doctor of Medical Sciences, Professor, e-mail: [galinaleon41@gmail.com](mailto:galinaleon41@gmail.com)

#### Information about authors:

Leonova G.N. <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 14.06.2019  
Accepted 19.06.2019

Для корреспонденции: Леонова Галина Николаевна, д-р мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. природно-очаговых трансмиссивных инфекций; e-mail: [galinaleon41@gmail.com](mailto:galinaleon41@gmail.com)

**Введение.** В последние годы отмечен значительный успех в диагностике клещевых инфекций на территории Российской Федерации. Если в 1990-2000-х годах основным методом диагностики клещевого энцефалита (КЭ) был иммуноферментный анализ (ИФА) [1,2], то в последнее десятилетие прочно внедрились методы молекулярной диагностики, которые повышают эффективность диагностических и профилактических мероприятий, совершенствуют проведение эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями [3,4]. Именно эти оба метода являются основными при изучении вирусофорности иксодовых клещей, а также диагностики КЭ. Однако в научно-практической работе при использовании этих методов исследователи зачастую сталкиваются с несопадением полученных результатов [5]. Кроме того, положительные пробы клещей и крови пациентов, выявленные в ИФА или в ПЦР, зачастую не подтверждаются изоляцией вируса КЭ. Однако на основании этих результатов пациентам назначают специфический иммуноглобулин, обосновывая эпидемиологическую и экономическую эффективность профилактики КЭ [2,6].

**Цель настоящего исследования:** на основании экспериментальных данных по верификации вируса КЭ провести сравнительный анализ эффективности методов диагностики ПЦР, ИФА и определения концентрации (титра) возбудителя в исследуемой пробе.

**Материал и методы.** Для проведения экспериментальных исследований использовали два штамма ВКЭ. Штамм Dal'negorsk (Dal') выделен из мозга пациента, умершего от КЭ. Штамм Primogye-437 выделен из крови здорового человека после присасывания клеща. По биологическим свойствам штамм Dal' был охарактеризован как высоковирулентный, а штамм P-437 – как слабовирулентный [7], по данным полногеномного секвенирования штамм Dal' (FJ402886, GeneBank) – как типичный представитель Sofjin-подобных, а P-437 (JQ825162, GeneBank) – Oshima-подобных штаммов вируса КЭ дальневосточного субтипа [8].

Для исследования экспериментальных проб методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) использовали набор реагентов «АмплиСенс® TBEV-Fl» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) согласно инструкциям производителя на амплификаторе с флуоресцентной детекцией «ROTOR-GENE Q» (QIAGEN, Германия).

Выявление антигена ВКЭ в пробах проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием диагностического набора «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-Бест, Новосибирск) согласно инструкции производителя тест-системы. Образец считали положительным при коэффициенте (К) оптической плотности  $\geq 1.0$ . Коэффициент позитивности определяли по формуле:  $K = \frac{ОП_{образца}}{ОП_{критического значения}}$ , при  $ОП_{критическое значение} = \frac{ОП_{средняя}}{K + 0,2}$  ( $ОП$  – оптическая плотность,  $K$  – отрицательный контроль).

Титр вируса определяли путем 10-кратного титрования его от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  по цитопатическому действию клеток СПЭВ, зараженных каждым разведением обоих штаммов и выражали в  $\log TCID_{50}/ml$ .

Экспериментальные исследования проведены в трех повторях.

**Результаты.** Для получения сравнительных данных в эксперименте использована одинаковая концентрация исходного инфекционного вируса штаммов Dal' и

P-437 ВКЭ, титр которых составлял  $3,5 \log TCID_{50}/ml$ . При проведении комплексной диагностики на модели этих штаммов, различающихся по биологической и молекулярно-генетической характеристике, установлены как сходства, так и различия в полученных результатах.

По данным ИФА, для слабовирулентного штамма P-437 положительные результаты зарегистрированы начиная с титра вируса  $1,5 \log TCID_{50}/ml$  (при разведении  $10^{-3}$  и выше), по данным ПЦР – при титре вируса  $0,5 \log TCID_{50}/ml$  (при разведении  $10^{-4}$  и выше). Показатели были отрицательными в обеих реакциях при разведении штамма  $10^{-5}$ , что свидетельствовало о полном отсутствии вируса в этой пробе (см. рисунок).

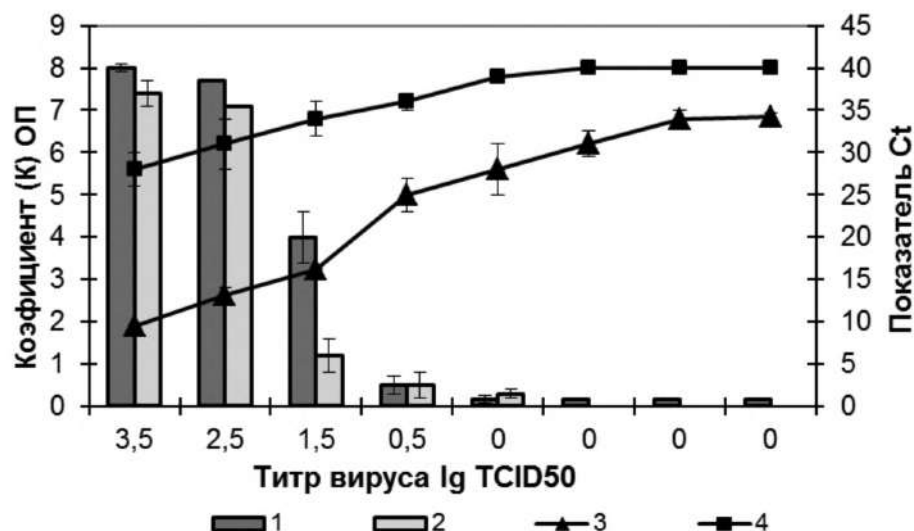
Для высоковирулентного штамма Dal' схожесть результатов со штаммом P-437 заключалась в том, что при титрах вируса ниже  $0,5 \log TCID_{50}/ml$  результаты в ИФА были отрицательными. Причем, в ПЦР все показатели St у высоковирулентного штамма были значительно выше по сравнению с St-показателями штамма P-437. Положительные ПЦР-результаты зарегистрированы не только в пробе с титром  $0,5 \log TCID_{50}/ml$  ( $St = 25 \pm 2$ ), но и в дальнейших разведениях штамма при постепенном снижении показателей генетического маркера St ( $10^{-5} - 28 \pm 3$ ;  $10^{-6} - 31 \pm 1,5$ ;  $10^{-7} - 34 \pm 1$ ;  $10^{-8} - 34,2 \pm 0,5$ ).

Таким образом, на рисунке видно, что одновременно положительные результаты в обеих реакциях у двух штаммов выявляли при титре вируса не менее, чем  $1-1,5 \log TCID_{50}$ , т.е. этот уровень вируса в пробе можно считать уже эпидемически значимым.

**Обсуждение.** В эксперименте при 10-кратных разведениях ВКЭ получены данные комплексных исследований с одновременным учетом трех показателей (титра вируса, ИФА и ПЦР-РВ). Важно было объяснить, почему результаты ИФА и ПЦР не совпадают, и какие действия следует предпринимать в таких случаях. Выявление положительных результатов в иксодовых клещах только в ИФА отражает присутствие антигена оболочечного Е-белка ВКЭ, который зачастую представлен неполноценными или дефектными вирусными частицами, формирующимися в процессе сложного морфогенеза иксодовых клещей, получивших вирус по наследству трансфазовым или трансмиссивным путем. Другие результаты получаются при использовании разработанного сотрудниками ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ метода ПЦР-РВ с субтип-специфическими флуоресцентными зондами, при котором конкретной мишенью для праймеров и зондов являлся участок РНК гена NS1 [3].

Получены неоспоримые результаты высокой перспективности ПЦР-РВ для индикации генетического маркера ВКЭ. Расхождение фактов выявления положительных показателей диагностических маркеров в ПЦР по сравнению с ИФА отмечено для слабопатогенного штамма P-437 в диапазоне титра вируса, равного  $1 \log TCID_{50}/ml$ , для высоко патогенного штамма Dal'negorsk –  $5 \log TCID_{50}/ml$ . То есть эффективность выявления генетического маркера в ПЦР по сравнению с ИФА для слабопатогенного штамма, имеющего дефекты в генетической структуре, была выше в 10 раз, а для высокопатогенного штамма – в 5000 и более раз.

Ранее нами было показано, что штамм P-437 имеет 24 замены аминокислот относительно штамма Dal'negorsk: Q32R, K64N, K69R, D100N and L111Del в капсидном белке; I130V, V137A, A151V в prM; A431T, V463A в белке E; S141G в NS1; K52R, T168I в NS2A; F108V в NS2B;



Сравнительные данные комплексной диагностики разных по биологическим характеристикам штаммов Dal'negorsk и Primorye-437 вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа.

По оси абсцисс - титр вируса (lg TCID<sub>50</sub>/мл) при разведениях штаммов от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>.

1 - штамм Dal'negorsk, 2 - штамм Primorye-437 (данные ИФА),

3 - штамм Dal'negorsk, 4 - штамм Primorye-437 (данные ПЦР).

R16K, S45S, S261A в NS3; M95V, V179A, A213V в NS4B; S634T, R677K, I692V, A724S в NS5 [8]. Кроме того, установлено, что замены аминокислот в неструктурных вирусных белках таких, как протеаза (комплекс белков NS2B/NS3) и РНК полимеразы могут влиять на активность ферментов и на скорость размножения вируса КЭ [9]. Эти данные свидетельствуют о том, что верификация штаммов ВКЭ с разной биологической характеристикой в ПЦР может происходить по-разному.

Выявление в ПЦР положительного результата в клеще обозначает только то, что обнаружен участок гена NS1 – маркера вируса КЭ. Чтобы знать произойдет ли заражение пациента вирусом, способным вызвать заболевание человека или лабораторных животных, считаем необходимым иметь одновременно два положительных результата: не только в ПЦР, но и в ИФА, при котором выявляется другой участок гена РНК – антиген Е-белка. Сочетание этих двух показателей указывает на выявление вируса, концентрация которого может обеспечить его активную репликацию. Становится понятным, почему зачастую невозможно выделить инфекционный вирус в случаях выявления только одного фрагмента вирусного генома или в ПЦР, или в ИФА. Изучение вирусофорности иксодовых клещей в той или иной реакции может показать, что иксодовый клещ содержит какой-то фрагмент вирусного генома, отражающий участие этого членистоногого в циркуляции вирусной популяции на определенной территории природного очага. Выделить полноценный инфекционный вирус, реально представляющий опасность, возможно только при совпадении вышеуказанных параметров (положительных результатов в ИФА и ПЦР при количестве вируса более чем 1 log TCID<sub>50</sub>/мл).

Как правило, во всех лабораториях страны верификация ВКЭ в клещах или у пациентов проводится в одной реакции или в ИФА, или в ПЦР. Так, в 2017 г. в клещах, снятых с пациентов на территории Приморского края,

число положительных маркеров в ИФА составило 3%, в ПЦР – 1,1%, в 2018 г. – 0,5% и 0,6%, соответственно [10-12]. При этом средний показатель К оптической плотности проб в ИФА был равен 1,5, максимальный показатель – К=4,1. В ПЦР средний показатель Ct составил 30,9, максимальный – Ct=25,4. В то же время, в клещах, собранных с растительности, наряду с низким процентом инфицированности иксодовых клещей ВКЭ, средний показатель Ct=26,7, максимальный – Ct=20,4. Только по этим довольно высоким показателям Ct нельзя определить инфекционность РНК-изолата, о чем свидетельствуют представленные выше результаты экспериментальных исследований (см. рисунок).

Такие результаты мы наблюдали при исследованиях одновременно в двух реакциях 8-ми иксодовых клещей, ни одного совпадения положительных результатов в обеих реакциях не было зарегистрировано. Больше того, эти пробы с положительными результатами в ИФА или в ПЦР были исследованы вирусологическим методом на модели 2-х сут белых мышей. Ни в одном случае выделить вирус КЭ не удалось, что могло свидетельствовать об отсутствии инфекционного возбудителя в исследуемых образцах иксодовых клещей. Прямым дополнительным доказательством тому, что в последние годы в природных очагах на фоне низкой вирусофорности клещей резко снизилась эпидемическая напряженность в отношении КЭ, явился низкий уровень заболеваемости КЭ населения Приморского края (в 2015 г – 1,2; 2016 г – 1,37; 2017 г – 1,4; 2018 г – 0,43 на 100 тыс. населения).

**Заключение.** На основании экспериментальных данных и данных изучения зараженности иксодовых клещей алгоритм проведения исследований по верификации ВКЭ можно определить следующим образом:

1. Клещи, собранные с растительности, могут быть исследованы в ИФА или в ПЦР. Все положительные ре-

зультаты можно суммировать и считать вирусофорностью иксодовых клещей;

2. Все пробы с положительными результатами только в ПЦР или ИФА необходимо исследовать в двух реакциях, чтобы получить подтверждение возможной инфекционности возбудителя;

3. Для получения быстрого комплексного результата зараженности снятых клещей с пациентов или крови после укуса клеща исследования необходимо проводить сразу одновременно в двух реакциях в ИФА и ПЦР;

4. Выделение вируса проводить в биологических пробах (клещи, собранные с растительности, клещи, снятые с пациентов, кровь больных и с подозрением на КЭ, млекопитающие) только при совпадающих результатах в ПЦР и ИФА.

Таким образом, предлагаемый экспериментально обоснованный подход к верификации вируса КЭ в клеще или в крови пациентов позволит улучшить достоверность специфической лабораторной диагностики, выявляя не только маркеры ВКЭ, но и предопределяя инфекционность возбудителя. Это послужит бесспорным основанием для назначения ранней интенсивной противовирусной терапии.

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Работа поддержана научным проектом (0545-2019-0007) Федерального Государственного бюджетного научного учреждения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мельникова О.В., Ботвинкин А.Д., Данчинова Г.А. Сравнительные данные о зараженности вирусом клещевого энцефалита голодных и питавшихся таежных клещей (по результатам иммуноферментного анализа). *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1997; 1: 44–9.
2. Козлова И.В., Злобин В.И., Воробьева М.С., Верхозина М.М. Экспресс-диагностика и экстренная профилактика иксодовых клещевых инфекций. М: ООО «Компания Боргес»; 2009.
3. Карань Л. С., Маленко Г. В., Бочкова Н. Г., Левина Л. С., Пиванова Г. П., Колясникова Н. М., Гамов, Е. Г., Трухина А. Г., Злобин В. И., Верхозина М. М., Джиоев Ю. П., Демина Т. В., Погодина В. В. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита. *Бюллетень СО РАМН*. 2007; 4(126): 34–40.
4. Вергинина Е.В., Симонова Е.Г., Паксина Н.Д. Эпидемиологический мониторинг инфекций, передающихся клещами в 2013–2017 гг. *Медицинская вирусология*. Тезисы Российской научной конференции. 2017; XXXI (1): 13.
5. Мельникова О. В., Адельшин Р.В., Корзун В.М., Трушина Ю.Н., Андаев Е.И. Характеристика изолятов вируса клещевого энцефалита из природных очагов в Иркутской области и уточнение генотипического пейзажа. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 229–35.
6. Пеньевская Н.А. Оценка эффективности этиотропной профилактики инфекций, передающихся иксодовыми клещами: проблемы теории и практики. Омск: Издательский центр «Омский научный вестник»; 2010.
7. Леонова Г.Н. Особенности биологической характеристики двух разных по патогенности дальневосточных штаммов вируса клещевого энцефалита. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2017; 3: 17–20.
8. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephali-

- tis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. *PLoS One*. 2014; Apr 16; 9(4):e94946.
9. Potapova U.V., Feranchuk S.I., Potapov V.V., Kulakova N.V., Kondratov I.G., Leonova G.N., Belikov S.I. NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012; 30: 638–51.
10. Лубова В.А., Берлизова М.В., Курловская А.В., Бондаренко Е.И., Леонова Г.Н. Лабораторная диагностика трансмиссивных клещевых инфекций в Приморском крае. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018; 1 (73):13–20.
11. Леонова Г.Н., Лубова В.А., Иванис В.А. Мониторинг возбудителей клещевых инфекций на территории Приморского края в период 2014–2018 гг. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2018; 4: 10–4.
12. Шутикова А.Л., Леонова Г.Н., Лубова В.А. Эпизоотологическая ситуация по клещевым инфекциям в 2018 году на юге Дальнего Востока. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2019; 77. 1: 11–8.

## REFERENCES

1. Mel'nikova O.V., Botvinkin A.D., Danchinova G.A. Comparative data on tick-borne encephalitis virus infection of hungry and fed taiga ticks (based on enzyme immunoassay). *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 1997; 1: 44–9. (in Russian)
2. Kozlova I.V., Zlobin V.I., Vorob'jova M.S., Verhozina M.M. Rapid diagnosis and emergency prophylaxis of Ixodes tick-borne infections, section “Antibodies and test kits for prevention and diagnosis of tick-borne encephalitis. Moscow: Companiya Borges; 2009. (in Russian)
3. Karan L.S., Malenko G.V., Bochkova N.G., Levin L.S., Pivanova G. P., Kolyasnikova N.M., Gamov, E.G., Trukhina A.G., Zlobin V.I., Verkhovina M.M., Dzhiyev Yu.P., Demina T.V., Pogodina V.V. The use of molecular genetic techniques to study the structure of tick-borne encephalitis virus strains. *Byulleten' SO RAMN*. 2007; 4(126): 34–40. (in Russian)
4. Verginina E.V., Simonova E.G., Paksina N.D. Epidemiological monitoring of tick-borne diseases in Russia during 2013–2017. *Tezisy Rossiyskoy nauchnoy konferentsii*. *Meditsinskaya virusologiya* 2017; XXXI (1): 13. (in Russian)
5. Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Korzun V.M., Trushina Yu.N., Andaev E.I. Tick-borne encephalitis Virus isolates from natural foci of the Irkutsk region: clarification of the genotype landscape. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(5): 229–35. (in Russian)
6. Pen'evskaya N.A. Evaluation of the etiotropic prevention of infections transmitted by ixodid ticks: problems of theory and practice. Omsk: Omskiy nauchnyi vestnik; 2010. (in Russian)
7. Leonova G.N. Biological characteristics of two far eastern tick-borne encephalitis virus strains of different pathogenicity. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2017; 3: 17–20. (in Russian)
8. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. *PLoS One*. 2014. Apr 16; 9(4):e94946.
9. Potapova U.V., Feranchuk S.I., Potapov V.V., Kulakova N.V., Kondratov I.G., Leonova G.N., Belikov S.I. NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2012; 30: 638–51.
10. Lubova V.A., Berlizova M.V., Kurlovskaya A.V., Bondarenko E.I., Leonova G.N. Laboratory diagnosis of tick-borne infections in Primorsky Krai. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya*. 2018; 1 (73): 13–20. (in Russian)
11. Leonova G.N., Lubova V.A., Ivanis V.A. Monitoring tick-borne pathogens in the Primorsky Territory in the period 2014–2018. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 4: 10–4. (in Russian)
12. Shutikova A.L., Leonova G.N., Lubova V.A. Epizootological situation on tick-borne infections in 2018 in the south of the Far East. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2019; 77. 1:11–8. (in Russian)

Поступила 14.06.19

Принята к печати 19.06.19

Александрова Н.А.<sup>1</sup>, Заславская М.И.<sup>1</sup>, Соловьева И.В.<sup>2</sup>, Точилина А. Г.<sup>2</sup>, Белова И. В.<sup>2</sup>

## ОЦЕНКА АНТИКАНДИДОЗНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ЭНТЕРОКОККОВ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И. Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия

*При изучении влияние продуктов метаболизма клинических изолятов энтерококков на жизнеспособность Candida albicans установлено, что метаболиты всех исследуемых штаммов Enterococcus faecium, E. faecalis обладали фунгистатическим действием. Выраженный фунгицидный эффект является штамм-специфичным признаком. Для оценки антифунгального действия продуктов метаболизма энтерококков лучше использовать метод отсроченного антагонизма на двухслойном агаре.*

**Ключевые слова:** энтерококки; кандиды; антагонизм; метаболиты; двухслойный агар.

**Для цитирования:** Александрова Н.А., Заславская М.И., Соловьева И.В., Точилина А. Г., Белова И.В. Оценка антикан-  
дидозной активности метаболитов клинических изолятов энтерококков. Клиническая лабораторная диагностика.  
2019; 64 (11): 690-692. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-690-692>

Alexandrova N.A.<sup>1</sup>, Zaslavskaya M.I.<sup>1</sup>, Soloveva I.V.<sup>2</sup>, Tochilina A. D.<sup>2</sup>, Belova I.V.<sup>2</sup>

EVALUATION OF ANTI-CANDIDA ACTIVITY OF METABOLITES OF ENTEROCOCCAL CLINICAL ISOLATES

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the  
Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>2</sup>Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 603950, Nizhny  
Novgorod, Russia

*When studying the effect of the metabolic products of clinical isolates of enterococci on the viability of Candida albicans, it was found that metabolites of all tested strains of Enterococcus faecium, E. faecalis had a fungistatic effect. At the same time a reliable fungicidal effect is a strain-specific feature. It is better to use the method of delayed antagonism on double-layer agar to assess the antifungal effect of enterococcal metabolism products.*

**Key words:** enterococci; candida; antagonism; metabolites; bilayer agar.

**For citation:** Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., Soloveva I.V., Tochilina A. D., Belova I.V. Evaluation of anti-candida  
activity of metabolites of enterococcal clinical isolates Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory  
Diagnostics). 2019; 64 (11): 690-692 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-690-692>

**For correspondence:** Alexandrova N.A., PhD, senior lecturer, Department of epidemiology, Microbiology and evidence-based  
medicine; e-mail: [natalyuskova@rambler.ru](mailto:natalyuskova@rambler.ru)

### Information about authors:

Alexandrova Natalya A. <https://orcid.org/0000-0003-4845-8056>;

Zaslavskaya Maya I. <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>

Soloveva Irina V. <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>, ResearcherID: S-8129-2016;

Tochilina Anna G. <https://orcid.org/0000-0001-7753-5730>;

Belova Irina V. <https://orcid.org/0000-0003-3402-1160>.

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 11.10.2019  
Accepted 21.10.2019

**Введение.** Вторичная антибиотикорезистентность кандид носит глобальный характер и имеет тенденцию к прогрессированию [1-4]. Постоянно ведется поиск альтернативных средств, обладающих антифунгальной активностью. Предполагают, что такими свойствами могут обладать продукты метаболизма нормальной микробио-  
ты, включающие комплекс бактериоцинов и литических

экзоферментов [5, 6]. Пробиотические препараты, скон-  
струированные на основе компонентов клеток, метаболитов, сигнальных молекул пробиотических штаммов микроорганизмов принято обозначать как метабиотики [7, 8]. Получение и исследование метабиотиков является одним из перспективных направлений современной медицины и биотехнологии [8]. Повышенный интерес к метабиотикам при лечении хронических форм канди-  
дозов обусловлен их безопасностью и эффективностью [7].

Ранее проведенные нами исследования микробио-  
ценоза влагалища женщин показали, что выраженный

**Для корреспонденции:** Александрова Наталья Александровна,  
канд. биол. наук, ст. преподаватель каф. эпидемиологии, микробио-  
логии и доказательной медицины; [natalyuskova@rambler.ru](mailto:natalyuskova@rambler.ru)

антагонизм в отношении кандид проявляют энтерококки [9]. Отбор штаммов микроорганизмов пригодных для создания метабиотиков и оценка эффективности их метаболитов является сложной задачей, требующей комплексного подхода. В настоящей работе оценён антифунгальный потенциал *Enterococcus spp.* и сравнены лабораторные методы, позволяющие выявить антикандидозную активность метаболитов, секретируемых энтерококками.

**Материал и методы:** Использованы чистые культуры клинических изолятов *Enterococcus faecalis* (штаммы 2482, 682, 651, 179-2, 671, 4276, 4304, 4306, 4314, 208), *Enterococcus faecium* (штаммы 173-5, 174-3), *Candida albicans* штамм 601. Видовую принадлежность штаммов определяли методом масс-спектрометрии MALDI-ToF (MALDI ToF Autoflex speed, Bruker Daltonik GmbH, Germany).

Оценку антикандидозной активности энтерококков проводили двумя методами: совместного одновременного и совместного отсроченного культивирования на двухслойном агаре. Для проведения метода одновременного культивирования на первый слой МПА засеивали энтерококки (0,1 мл,  $10^9$  кл/мл). Затем, настилали второй слой МПА, предварительно остудив до  $40^\circ\text{C}$ . На поверхность второго слоя засеивали кандиды (0,1 мл суспензии,  $10^3$  кл/мл), посеи инкубировали ( $37^\circ\text{C}$ , 24 ч).

Для исследования зависимости антикандидозного эффекта от концентрации продуктов метаболизма использован метод совместного отсроченного культивирования.

Энтерококки засеивали на слой МПА, инкубировали ( $37^\circ\text{C}$ , 24 ч). Затем формировали второй слой агара, путём настилавания агара Сабуро (0,8 см) поверх выросшей культуры *Enterococcus spp.* На поверхность второго слоя агара газоном засеивали микромицеты (0,1 мл,  $10^4$  кл/мл). Инкубировали посев при  $37^\circ\text{C}$ , 24 часа. Для контроля роста энтерококков использован двухслойный агар без посева грибов рода *Candida*. Для контроля роста кандид использовали двухслойный агар без посева энтерококков. Подсчитывали количество выросших на чашках Петри колоний микромицетов (КОЕ) при помощи счётчика колоний микроорганизмов СКМ-2 (Stegler, Россия).

**Результаты.** При одновременном совместном культивировании кандид с различными штаммами энтерококков всегда отмечалось уменьшение размера колоний

*C. albicans* по сравнению с результатами в контрольных посевах (без *Enterococcus spp.*), в среднем, в 1,43 раза ( $p<0,05$ ), что указывает на фунгистатическое действие продуктов метаболизма энтерококков, растворимых в среде. Во всех экспериментах, количество выросших колоний *C. albicans* на поверхности агара достоверно не отличалось от контроля - экспериментов без посева энтерококков ( $p>0,05$ ).

При совместном отсроченном культивировании энтерококков с кандидами хорошо заметен фунгистатический эффект метаболитов энтерококков, накопленных в среде. Это проявлялось в достоверном уменьшении размера колоний *C. albicans* (в среднем, в 1,55 раз;  $p<0,05$ ), выросших на среде с суточной культурой энтерококка. Наиболее выраженным фунгистатическим действием обладал штамм *E. faecium* 174-3, при культивировании с которым размер колоний кандид уменьшался в  $2,0\pm 0,13$  раза ( $p<0,05$ ) (см. таблицу).

При совместном отсроченном культивировании энтерококков с кандидами имел место выраженный штамм-зависимый фунгицидный эффект. Это проявлялось в том, что при выращивании *C. albicans* на агаре с суточной культурой некоторых штаммов *Enterococcus spp.* наблюдалось существенное снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) микромицетов. Наиболее выраженным фунгицидным эффектом обладали метаболиты *E. faecalis* 4314, *E. faecium* 174-3, *E. faecium* 173-5, вызывающие гибель популяции кандид и уменьшение количества КОЕ микромицетов на агаре в  $2,87\pm 0,26$ ,  $2,63\pm 0,17$ ,  $2,28\pm 0,43$  раз соответственно ( $p<0,05$ ) (см. таблицу).

**Обсуждение.** В ходе исследования особенностей антифунгальной активности энтерококков в отношении *C. albicans* установлено, что все штаммы *Enterococcus spp.* проявляли фунгистатический эффект, и только часть исследованных штаммов обладали фунгицидным действием.

Метод совместного одновременного культивирования не давал полного представления об антифунгальном потенциале энтерококков. Отсутствие заметного фунгицидного эффекта у всех исследуемых штаммов *Enterococcus spp.* при их одновременном совместном культивировании с микромицетами могло быть связано с недостаточным количеством антифунгальных метаболитов энтерококков, накопленных в среде. При данном варианте совместного культивирования, кандиды мог-

Выраженность фунгистатического и фунгицидного эффекта метаболитов энтерококков

| Штаммы энтерококков, культивируемых совместно с <i>C. albicans</i> 601 | Фунгистатический эффект: кратность уменьшения размера колоний (количество раз) | Фунгицидный эффект: кратность снижения количества КОЕ (количество раз) |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. faecium</i> 173-5                                                | $1,73\pm 0,17^*$                                                               | $2,28\pm 0,43^*$                                                       |
| <i>E. faecium</i> 174-3                                                | $2,00\pm 0,13^*$                                                               | $2,63\pm 0,17^*$                                                       |
| <i>E. faecalis</i> 2482                                                | $1,40\pm 0,08^*$                                                               | $1,25\pm 0,10^*$                                                       |
| <i>E. faecalis</i> 682                                                 | $1,40\pm 0,09^*$                                                               | $1,20\pm 0,11^*$                                                       |
| <i>E. faecalis</i> 651                                                 | $1,40\pm 0,15^*$                                                               | $1,16\pm 0,13$                                                         |
| <i>E. faecalis</i> 179-2                                               | $1,66\pm 0,10^*$                                                               | $0,99\pm 0,12$                                                         |
| <i>E. faecalis</i> 4304                                                | $1,65\pm 0,12^*$                                                               | $1,17\pm 0,22$                                                         |
| <i>E. faecalis</i> 4276                                                | $1,30\pm 0,13^*$                                                               | $1,18\pm 0,19$                                                         |
| <i>E. faecalis</i> 4306                                                | $1,78\pm 0,18^*$                                                               | $1,01\pm 0,13$                                                         |
| <i>E. faecalis</i> 4314                                                | $1,53\pm 0,07^*$                                                               | $2,87\pm 0,26^*$                                                       |
| <i>E. faecalis</i> 208                                                 | $1,22\pm 0,10^*$                                                               | $1,13\pm 0,21$                                                         |

Примечание. \* - статистически значимые отличия относительно культивирования *C. albicans* без энтерококков ( $p<0,05$ ).

ли подавлять рост энтерококков, что вело к снижению концентрации продуктов метаболизма бактерий в среде. В связи с вышеуказанными возможными недостатками метода одновременного совместного культивирования микроорганизмов, в дальнейшем использована другая схема исследования антагонистических взаимоотношений между энтерококками и кандидами – отсроченное культивирование. Метод отсроченного совместного культивирования позволил обнаружить не только фунгистатический, но и фунгицидный эффект энтерококков. Не все штаммы *Enterococcus spp.* обладали выраженной фунгицидной активностью, из чего следует, что выраженность антифунгального действия зависит не только от концентрации продуктов метаболизма бактерий в среде, но и от биологических свойств самого штамма энтерококка.

Установлено, что *Enterococcus spp.* обладают выраженной антагонистической активностью в отношении кандид. Для оценки фунгицидного действия продуктов метаболизма энтерококков, секретируемых во внешнюю среду, лучше использовать метод отсроченного совместного культивирования. Данный способ даёт возможность накопления в среде большого количества продуктов метаболизма бактерий и минимизирует действие микромицетов на клетки бактерий. Метод отсроченного совместного культивирования позволяет с большей вероятностью установить и отобрать штаммы бактерий – продуцентов метаболитов с максимальной антикандидозной активностью, что важно при получении метаболитов.

#### Выводы:

Энтерококки обладают выраженной антагонистической активностью в отношении *C. albicans*. При этом, все выделенные клинические изоляты энтерококков проявляют фунгистатический эффект в отношении кандид.

Фунгицидный эффект метаболитов энтерококков в отношении кандид носит штамм-специфичный характер.

Для оценки антифунгального действия экзогенных метаболитов бактерий предпочтительнее использовать метод отсроченного совместного культивирования.

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Донгак Д.А., Карноухова О.Г., Коган Г.Ю., Распопина Л.А., Ботвинкин А.Д. Частота выделения и лекарственная резистентность грибов рода *Candida* от больных ВИЧ-инфекцией в Иркутске. *Сибирский медицинский журнал*. 2013; 5: 57-9.
2. Иванова Л. В., Баранцевич Е.П., Шляхто Е.В. Резистентность грибов-патогенов к антимикотикам (обзор). *Проблемы медицинской микологии*. 2011;13(1):14-7.
3. Arendrup M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 6: 42-8.

4. Kok E. T., Jong M. C., Gravendeel B., Van Leeuwen W. B., Baars E. W. Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015:521584.
5. Ng S. M., Yap Y. Y., Cheong J. W., Ng F. M., Lau Q. Y., Barkham T., Teo J. W., Hill J., Chia C. S. Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J. Pept. Sci.* 2017; 23(3): 215 -21.
6. Hanson L., Vusse L.V., Jerme M., Abad C.L., Safdar N. Probiotics for Treatment and
7. Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. *J. Midwifery. Womens. Health.* 2016; 61(3): 339-55.
8. Шендеров Б.А., Синица А.В., Захарченко М.М. Метабиотики: вчера, сегодня, завтра: СПб.: ИнформМед; 2017.
9. Ардатская М. Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции. *Трудный пациент*. 2017; 15(6-7): 35-9.
10. Александрова Н.А., Заславская М.И. Взаимоотношения *Candida* с энтерококками на уровне вагинального биотопа. *Проблемы медицинской микологии*. 2016; 18(4):53-5.

#### REFERENCES

1. Dongak D.A., Karnouhova O.G., Kogan G.Ju., Raspopina L.A., Botvinkin A.D. Chastota vydeleniya i lekarstvennaya rezistentnost' gribov roda *Candida* ot bol'nyh VICH-inficiej v Irkutске. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 5: 57-9. (in Russian)
2. Ivanova L. V., Barancevich E.P., Shljahto E.V. Rezistentnost' gribov-patogenov k antimikotikam (obzor). *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2011; 13(1):14-7. (in Russian)
3. Arendrup M. C. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 6: 42-8.
4. Kok E. T., Jong M. C., Gravendeel B., Van Leeuwen W. B., Baars E. W. Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015:521584. d
5. Ng S. M., Yap Y. Y., Cheong J. W., Ng F. M., Lau Q. Y., Barkham T., Teo J. W., Hill J., Chia C. S. Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J. Pept. Sci.* 2017; 23(3): 215-21.
6. Hanson L., Vusse L. V., Jerme M., C. L. Abad, Safdar N. Probiotics for Treatment and Prevention of Urogenital Infections in Women: A Systematic Review. *J. Midwifery. Womens. Health.* 2016; 61(3): 339-55.
7. Shenderov B.A., Sinitsa A. V., Zakharchenko M. M.[Metabiotiki: vchera, segodnya, zavtra]. St. Petersburg: InformMed; 2017. (in Russian)
8. Ardatskaya M. D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V., Filimonova O.Yu. Metabiotiki kak estestvennoe razvitie probioticheskoy koncepcii. *Trudnyi patsient*. 2017; 15(6-7): 35-9. (in Russian)
9. Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I. Vzaimootnosheniya *Candida* s enterokokkami na urovne vaginal'nogo biotopa. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2016; 18(4): 53-5. (in Russian)

Поступила 11.10.19

Принята к печати 21.10.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Мельников В.Г.<sup>1</sup>, Villena J.<sup>2</sup>, Комбарова С.Ю.<sup>1</sup>

## ПРОБЛЕМА ДЕКОЛОНИЗАЦИИ НАЗАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ STAPHYLOCOCCUS AUREUS С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ МИКРОБИОЛОГА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

<sup>1</sup>ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора РФ, 125212, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Immunobiotics Research Group, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), 980-0845 Tucuman, Argentina

Золотистый стафилококк бессимптомно персистирует на слизистой оболочке носа, а также способен вызывать у носителей (аутоинфекция) и у больных в стационаре (госпитальная инфекция) тяжелые заболевания. Деколонизация назальных носителей *S. aureus* является важной мерой, направленной на снижение заболеваемости стафилококковыми инфекциями. Носительство является формой проявления дисбиоза полости носа, поэтому эффективность антибиотиков при санации носителей, по определению, невысока. В обзоре рассмотрены перспективы использования пробиотиков для восстановления микробиоты носа. Коммерческий выпуск назальных пробиотиков пока еще не налажен, однако разработки в этом направлении ведутся в разных странах. Представлено экспериментальное обоснование возможности применения коринебактерий и других представителей микробиоты носа для санации стафилококковых носителей, а также изложены представления авторов о том, как усовершенствовать методы микробной терапии. В частности, предложено использовать пробиотики в виде биоленки, аутопробиотики, аутовакцины.

**Ключевые слова:** обзор; *Staphylococcus aureus*; назальное бактерионосительство; деколонизация; дисбиоз; пробиотики; биоленка; коринебактерии.

**Для цитирования:** Мельников В.Г., Villena J., Комбарова С.Ю. Проблема деколонизации назальных носителей *Staphylococcus aureus* с точки зрения микробиолога (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 693-699. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-693-699>

Melnikov V.G.<sup>1</sup>, Villena J.<sup>2</sup>, Kombarova S.Yu.<sup>1</sup>

THE PROBLEM OF DECOLONIZATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS NASAL CARRIERS FROM THE MICROBIOLOGIST'S POINT OF VIEW (REVIEW OF LITERATURE)

<sup>1</sup>G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Immunobiotics Research Group, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), 980-0845 Tucuman, Argentina

*Staphylococcus aureus* asymptotically persists on the nasal mucosa, and also causes serious diseases in carriers (endogenous infection) and in patients in a hospital (nosocomial infection). Decolonization of nasal carriers of *S. aureus* is an important measure aimed at reducing the incidence of staphylococcal infections. Carriage is a form of nasal dysbiosis, therefore, the effectiveness of antibiotics for the decolonization of carriers, by definition, is low. The review discusses the prospects of using probiotics to restore the nasal microbiota. The commercial production of nasal probiotics has not yet been established, but developments in this direction are being carried out in different countries. The experimental substantiation of the possibility of using corynebacteria and other representatives of the nasal microbiota for the decolonization of staphylococcal carriers is presented, as well as the authors' ideas on how to improve the methods of microbial therapy. In particular, it was proposed to use biofilm probiotics, autoprobiotics, and autovaccines for this purpose.

**Key words:** review; *Staphylococcus aureus*; nasal carriage; decolonization; dysbiosis; probiotics; biofilm; corynebacteria.

**For citation:** Melnikov V.G., Villena J., Kombarova S.Yu. The problem of decolonization of *Staphylococcus aureus* nasal carriers from the microbiologist's point of view (review of literature). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (11): 693-699. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-693-699>

**For correspondence:** Melnikov V.G., candidate of medical sciences, principal investigator of the laboratory of coccoid infections, e-mail: [goutch@mail.ru](mailto:goutch@mail.ru)

### Information about authors:

Melnikov V.G., <http://orcid.org/0000-0002-0825-7930>

Villena J., <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=8513265400>

Kombarova S.Y., <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=6602369619>

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

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

Received 16.10.2019

Accepted 18.10.2019

Носительство патогенных и условно-патогенных бактерий является актуальной проблемой здравоохранения. На слизистой оболочке верхних дыхательных путей у совершенно здоровых людей обнаруживаются *Streptococcus pneu-*

*moniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, но наиболее часто выявляется золотистый стафилококк. *Staphylococcus aureus* способен

Для корреспонденции: Мельников Вячеслав Геннадьевич, канд. мед. наук, доцент, вед. науч. сотр. лаб. кокковых инфекций, e-mail: [goutch@mail.ru](mailto:goutch@mail.ru)

бессимптомно вегетировать на эпителиальных поверхностях, с другой стороны, данный вид стафилококков является этиологическим агентом весьма распространенных заболеваний – от сравнительно легко протекающих инфекций кожи и мягких тканей до тяжелой патологии, такой как пневмония, эндокардит, менингит, сепсис. Двойственность поведения *S. aureus* – комменсала и патогена – позволяет называть его патобионтом [1].

Стафилококковая инфекция, как правило, является аутоинфекцией, что подтверждается генетическим родством между «носительскими» штаммами *S. aureus* и штаммами, выделенными из гнойно-воспалительных очагов у одного и того же пациента [2]. Носительство стафилококка резко увеличивает риск развития инфекционных осложнений у больных диабетом, ВИЧ-инфекцией, ревматоидным артритом, онкологическими заболеваниями, инсультом, экземой, псориазом, у пациентов, подвергшихся хирургическому лечению, диализу, у лиц, длительно пребывающих в стационаре [3-10]. *S. aureus* способен колонизовать разные биотопы организма человека – рото- и носоглотку, кишечник, влагалище, промежность, подмышечную область, но наиболее часто он населяет преддверие и слизистую оболочку носа, и именно назальное носительство *S. aureus* является одним из наиболее существенных факторов риска в развитии эндогенной стафилококковой инфекции [2]. Удаление *S. aureus* из полости носа является важной мерой, направленной на снижение заболеваемости стафилококковыми инфекциями [11]. Прерывание процесса назального носительства обычно сопровождается элиминацией *S. aureus* из других биотопов организма [12].

Для санации назальных носителей *S. aureus*, в основном, используют антибиотик мупироцин в виде мази. Нередко после лечения состояние носительства восстанавливается. Отсутствие эффекта от медикаментозной деколониации у здоровых носителей *S. aureus* и рецидивы инфекции у больных с хроническим риносинуситом могут объясняться недоступностью некоторых отделов носа для мазевой формы мупироцина. Кроме того, стафилококки обладают способностью уклоняться от действия местных антимикробных препаратов, проникая в клетки эпителия слизистой оболочки носа [13]. Большинство препаратов, используемых для деколониации стафилококковых носителей, включая мупироцин, обладают низкой активностью в отношении внутриклеточно расположенных *S. aureus* [14]. Неэффективная антибиотикотерапия может быть также обусловлена наличием «покоящихся» и поэтому не чувствительных к медикаментам форм стафилококков [15]. В последние годы наблюдается повсеместное распространение штаммов MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*), устойчивых ко многим антибиотикам: метициллину, эритромицину, клиндамицину, тетрациклину, ципрофлоксацину, мупироцину [16]. Ожидается, что при сохранении текущих темпов роста антибиотикорезистентности бактерий в скором времени санировать бактерионосителей и лечить больных стафилококковой инфекцией будет просто нечем [17]. Поэтому разработка новых, альтернативных антибиотикам, способов деколониации носителей *S. aureus* является актуальной задачей. Они должны разрабатываться с учетом механизмов формирования назального носительства стафилококков.

Стафилококковое носительство встречается примерно у половины человечества [18]. Изучение распространенности назального носительства чаще всего проводится культуральным методом. Исследование, в котором наряду с бактериологическим использовались молекулярные методы, демонстрирует, что отсутствие роста *S. aureus* может быть связано с низкой плотностью его популяции у носителя (менее 10 тыс. микробных клеток в образце). Сделан вывод о том, что культуральный метод, из-за низкой чувствительности, не яв-

ляется объективным методом индикации *S. aureus*, а носительство стафилококка может оказаться значительно более распространенным, чем считалось ранее [19].

Различают стойкое назальное носительство *S. aureus* и временную, транзитную колонизацию. Необходимость такого разграничения объясняется тем, что стойкие носители, а они составляют примерно 20% населения, являются эпидемиологически более значимым источником стафилококковой инфекции, чем транзитные. Для них характерны высокое количественное содержание стафилококка, существенный риск развития аутоинфекции, высокая скорость распространения возбудителя [20]. Что же способствует формированию длительного носительства *S. aureus*? Особенности самого микроорганизма? Скорее всего, нет, поскольку генетических различий между штаммами, выделенными от стойких и транзитных носителей, не наблюдается [21]. Установлено, что у стойких бактерионосителей суперинфицирование госпитальными штаммами *S. aureus* наступает гораздо чаще, чем у пациентов, которые до госпитализации носителями не являлись [22]. Эксперименты по искусственной колонизации слизистой оболочки носа стафилококками показали, что волонтеры, которые прежде не являлись бактерионосителями, быстро освобождались от имплантированных им штаммов *S. aureus*. Стойкие же носители, санированные антибиотиками, акцептировали и длительно сохраняли на слизистой носа свой собственный штамм, который входил в состав микробного коктейля, использовавшегося для имплантации [23]. Всё это свидетельствует о том, что длительная и стойкая персистенция *S. aureus* обусловлена изменениями со стороны организма носителя, и, в частности, нарушением его колонизационной резистентности [24].

Не найдено геномных различий между штаммами *S. aureus* клинического происхождения и штаммами, выделенными от носителей [25]. Любой штамм может быть либо «носительским» либо «клиническим». И хотя одни клональные комплексы стафилококков имеют более широкое распространение, чем другие, они встречаются с равной частотой у носителей и при инвазивной инфекции [26]. Насколько далеко стафилококк зайдет в реализации своего болезнетворного потенциала будет зависеть, как и в ситуации со стойким и транзитным носительством, от способности организма человека противодействовать патогену. Некоторые авторы [27] даже рекомендуют трактовать термин «вирулентность» не как свойство, присущее патогену, а как результат его взаимодействия с организмом хозяина.

Нами было изучено влияние антибиотиков на состояние микробиоценоза носа и ротоглотки при санации бессимптомных дифтерийных носителей [28]. На фоне применения эритромицина у них наблюдалось уменьшение количества *C. diphtheriae*, снижение общей обсемененности слизистых оболочек и истощение микробного разнообразия. После завершения курса лечения численность популяции *C. diphtheriae* нередко восстанавливалась до исходного уровня, и в составе микробиоты данного биотопа появлялся золотистый стафилококк, отсутствовавший до антибиотикотерапии. Повторные курсы лечения антибиотиками, как правило, не приводили к ликвидации ни дифтерийного, ни стафилококкового носительства, хотя штаммы *C. diphtheriae* и *S. aureus*, выделенные от таких носителей, оставались чувствительными к используемому антибиотикам. После повторных курсов антибиотикотерапии у пациентов начинали высеваться бактерии кишечной группы и грибы рода *Candida*, что свидетельствовало об усугублении дисбиоза. Как видим, действие антибиотиков приводит к дисбалансу микробиоценоза, при этом не защищенную индигенной микробиотой нишу с готовностью занимают патобионты, и формируется стойкое бактерионосительство. Наряду с прямым противомикробным действием,

антибиотики способны оказывать опосредованное негативное влияние на резидентную микробиоту. Они угнетают иммунологическую реактивность слизистой носа и ротоглотки, что не может не отражаться на составе микробиома [29]. По данным К. Korpela и соавт. [30], длительность дисбиоза, возникшего в результате действия антибиотиков (в особенности, макролидов), исчисляется годами. Учитывая частоту и массовость применения антибиотиков, можно предполагать, что данные препараты являются одной из основных причин нарушения колонизационной резистентности. Уместен вопрос, поддается ли восстановлению подавленная антибиотиками протимомикробная защита слизистой оболочки носа?

Люди имеют разную чувствительность к колонизации золотистым стафилококком [24]. При этом известно, что состав микробиоты человека не контролируется генетическими факторами [31]. Учитывая этот факт, а также то, что назальный микробиоценоз подвержен изменениям, возрастным и сезонным [32, 33], высказано предположение о возможности искусственной коррекции микробиоты человека [19, 34].

Микробиота играет важнейшую роль в жизнедеятельности организма человека. Микробные сообщества, населяющие эпителиальные поверхности, являются ключевым фактором в поддержании здоровья, обеспечивая иммунологический гомеостаз и противодействуя колонизации и инвазии патогенных микроорганизмов. Большое значение имеет микробное разнообразие, способствующее формированию стабильного микробиоценоза [35]. Под влиянием антибиотиков, других лекарственных препаратов, некоторых заболеваний в составе резидентной микробиоты могут происходить глубокие сдвиги. Дисбаланс микробиоты, дисбиоз, является важным звеном патогенеза ряда заболеваний микробного генеза, а также – «соматической», неинфекционной патологии – воспалительных болезней кишечника, аллергии, астмы, диабета, ожирения, неопластических и нейродегенеративных процессов [36]. Восстановить нарушенную микробиоту призваны живые бактерии, обладающие полезными для организма функциями, т. н. пробиотики. Пробиотики на основе молочнокислых бактерий, в норме населяющих организм человека (лактобациллы, лактококки, энтерококки, бифидобактерии), часто используются при лечении дисбиоза кишечника и урогенитального тракта [37]. Назальное бактерионосительство и сопутствующее ему снижение биоразнообразия являются одной из форм проявления микробного дисбаланса. Дисбиоз верхних дыхательных путей изучен ещё недостаточно подробно, пробиотики для коррекции микробиоты носа нигде в мире официально не зарегистрированы, однако исследования в этой области привлекают внимание многих специалистов.

Какие же микроорганизмы могут быть использованы в роли назальных пробиотиков? Очевидно те, которые в норме вегетируют на слизистой оболочке носа, обладают низкой патогенностью и, главное, способностью поддерживать колонизационную резистентность – систему защиты от инфицирования болезнетворными микроорганизмами. Последняя складывается из способности пробиотиков конкурировать с патобионтами за адгезию на клетках эпителия, синтезировать бактериоцины, трансформировать поведение патобионтов в сторону комменсализма, стимулировать иммунные реакции организма [38].

Предприняты попытки использования стрептококков и нейссерий в качестве назальных пробиотиков. Имплантация на слизистую оболочку носа штаммов *Str. salivarius* и *Str. oralis*, в норме обитающих в ротоглотке, способствовала снижению у детей частоты колонизации *Str. pneumoniae*, *Str. pyogenes*, *H. influenzae* и эпизодов рецидивирования вызываемых ими заболеваний – отита, фарингита, тонзиллита и риносинусита [39]. Бактериотерапия хорошо переносилась,

и никаких негативных побочных эффектов не возникало. Интраназальное введение добровольцам резидентных бактерий *Neisseria lactamica* приводило к достоверному снижению у них уровня носительства *N. meningitidis* [40]. Эти исследования демонстрируют, что живые комменсальные бактерии способны оказывать ингибирующее действие на колонизацию респираторных патогенов, а также свидетельствуют о простоте и безопасности использования бактериотерапии для контроля инфекционной патологии и носительства.

Для предотвращения формирования носительства *S. aureus*, в качестве альтернативы антибиотикам, еще в 1960-х годах с успехом использовалось интраназальное введение слабо вирулентного штамма *S. aureus* 502A [41]. Но затем применение штамма 502A было прекращено из-за появившейся информации о вызываемых им инфекционных осложнениях [42]. Несколько лет назад M.S. Barbagelata et al. [43] вернулись к этой идее. Они сконструировали мутантный штамм *S. aureus* NK41 с низкой вирулентностью, который предотвращал у мышей, однако дальнейшего развития эти исследования не получили.

В процессе поиска антагонистов золотистого стафилококка для использования в качестве назальных пробиотиков внимание на себя обратили коагулазоотрицательные стафилококки (КОС). Среди КОС наибольший интерес представляет эпидермальный стафилококк. В образцах микрофлоры носа, в которых доминирует этот вид стафилококков, *S. aureus* обнаруживается редко [44]. *S. epidermidis* обладает антимикробной активностью в отношении *S. aureus in vitro*, а также – способностью элиминировать *S. aureus* со слизистой оболочки носа в опытах на мышах и с пораженных участков кожи у больных атопическим дерматитом [45, 46]. Раскрыт механизм, лежащий в основе интерференции между *S. epidermidis* и *S. aureus*: эпидермальный стафилококк выделяет сериновую протеазу Esp, способную ингибировать формирование биопленки и адгезию *S. aureus* на клетках назального эпителия. Также установлена обратная корреляция между присутствием на слизистой оболочке носа человека *S. epidermidis*, обладающего Esp, и золотистого стафилококка [47], а назальная имплантация мышам Esp-позитивного штамма *S. epidermidis* предотвращает колонизацию штаммов MRSA [48]. Другой назальный КОС, *S. lugdunensis*, оказался способным подавлять рост *S. aureus* с помощью циклического антимикробного пептида, названного лугдунином. Лугдунин обладает бактерицидностью *in vitro* в отношении всех исследованных штаммов золотистого стафилококка, а также – иммуномодулирующей активностью [49]. Населенность слизистой носа человека *S. lugdunensis* сочетается с низкой частотой носительства *S. aureus*, а на модели лабораторных животных *S. lugdunensis* конкурентно вытесняет *S. aureus* со слизистой оболочки носа [50]. Все эти данные, по мнению вышеуказанных авторов, свидетельствуют о возможности использования Esp- и лугдунин-образующих КОС в качестве назальных пробиотиков для профилактики и лечения стафилококкового носительства.

Помимо КОС, в составе назальной микробиоты в значительном количестве встречаются микроорганизмы рода *Corynebacterium* (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens* и др.), которые конкурируют за сайты адгезии с золотистым стафилококком [51–53]. При этом установлена не только обратная корреляция между присутствием *C. pseudodiphtheriticum* и золотистого стафилококка, но и прямое ингибирующее действие *C. pseudodiphtheriticum* в отношении *S. aureus in vitro* [54]. Изучение микрофлоры ротоглотки и носа у дифтерийных бактерионосителей позволило установить эпизоды конкурентного вытеснения возбудителя дифтерии комменсальными коринебактериями: популяция *C.*

*diphtheriae* сокращалась пропорционально самопроизвольному нарастанию численности *C. pseudodiphtheriticum* [55]. На эти наблюдения мы ориентировались при выборе штамма коринебактерий для проведения экспериментов по деколонизации носителей *S. aureus*. Выбор остановили на штамме *C. pseudodiphtheriticum* ‘Соколов’, выделенном из носовой полости здорового человека. Среди участников эксперимента был один стойкий носитель MRSA и трое других, которые ранее не были носителями *S. aureus*, однако инфицировались от стойкого носителя во время пребывания вместе с ним в гермообъекте. Назальная имплантация штамма ‘Соколов’ стойкому носителю привела лишь к временному снижению уровня обсемененности золотистым стафилококком, зато у остальных трёх участников удалось достичь эффекта полной и стойкой деколонизации [56]. Нанесение живого штамма *Corynebacterium spp.* Co304 на слизистую носа также было успешно использовано для элиминации *S. aureus* у здоровых бактерионосителей: стойкая санация достигнута у 12 из 17 носителей стафилококка [57].

У бактерионосителей *S. aureus* практически всегда встречается в ассоциации с резидентной микрофлорой, которая может влиять на его патогенные свойства и, соответственно, на степень вероятности возникновения у носителя стафилококковой инфекции. Исследования нормобиоты, способствующей снижению вирулентности *S. aureus*, представляют большой интерес. В.Л. Hardy и соавт. [58] установили, что *C. pseudodiphtheriticum* выделяет вещества, обладающие специфическим бактерицидным действием в отношении вирулентных штаммов *S. aureus*, в том числе, MRSA. Мишенью для этих веществ является система ‘чувства кворума’ Agg QS, которая регулирует экспрессию факторов вирулентности у золотистого стафилококка. Штаммы *S. aureus* с нефункционирующей системой Agg QS оказались авирулентными и устойчивыми к противомикробному фактору коринебактерий. Таким образом, у *C. pseudodiphtheriticum* была выявлена способность селективно элиминировать вирулентные штаммы и мирно сосуществовать с авирулентными представителями стафилококковой популяции.

При совместном культивировании *S. aureus* с комменсальными коринебактериями (*C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. glutamicum*, *C. accolens* и *C. pseudodiphtheriticum*) *in vitro* наблюдалось изменение спектра экспрессируемых генов стафилококка. Отмечено усиление экспрессии генов, координирующих назальную колонизацию, и снижение экспрессии генов вирулентности. В ассоциации с коринебактериями *S. aureus* был значительно менее вирулентным в опытах *in vivo*, чем в отсутствие коринебактерий [59]. Эти данные демонстрируют переход *S. aureus* от патогенного к комменсальному состоянию при взаимодействии с резидентными коринебактериями полости носа человека, что подтверждает перспективность использования коринебактерий в качестве назальных пробиотиков, с позиции присущих им антивирулентных свойств. В отличие от антибиотиков, антисептиков или бактериофагов, пробиотики с антивирулентным действием не угрожают жизнеспособности популяции патогена и не придают, тем самым, селективных преимуществ резистентным штаммам [60].

По мнению C.Y. Leung и J.S. Weitz [61], эффективное восстановление нарушенной микробиоты человека и элиминация патобионтов с помощью комменсальных бактерий-пробиотиков возможны только в комбинации с проведением иммунокоррекции. Это сочетание получило название иммунокомменсальной терапии. Заметим, что сама микробиота является иммуноактивным компонентом, она заметно понижает частоту развития aberrантного иммунного ответа [62]. Такие наблюдения были положены в основу «гигиенической теории», суть которой заключается

в следующем. Дефицит внешней микробной нагрузки, особенно в раннем периоде жизни, из-за урбанизации населения, высоких гигиенических и санитарных стандартов, принятых в развитых странах мира, приводит к нарушению процесса созревания иммунной системы и предрасполагает к развитию аллергических и аутоиммунных процессов [63, 64]. Применение пробиотиков, в этой связи, является патогенетически обоснованной стратегией снижения риска возникновения данной патологии, а также носительства *S. aureus*, которое часто её сопровождает. Срабатывает механизм антигенной конкуренции: иммунный ответ на полученные извне микроорганизмы конкурирует с аллергическим и аутоиммунным ответом [65]. Интраназально имплантированные иммуноактивные пробиотики, или как их иначе называют, иммунобиотики, взаимодействуют с лимфоидными скоплениями в носо-, ротоглотке и кишечнике (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT). Это вызывает антигенную стимуляцию В-лимфоцитов, которые мигрируют в слизистую оболочку верхних дыхательных путей и образуют IgA, способствующие элиминации патогенов [66]. Так, употребление йогурта, приготовленного на основе бактерий-иммунобиотиков, способствует снижению уровня назальной колонизации *S. aureus*, *Str. pneumoniae* и *Str. pyogenes* [67].

Микроорганизмы рода *Corynebacterium*, наряду с *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus* относятся к актинобактериям, в составе клеточной стенки которых содержатся миколовые кислоты и арабиногалактан, соединения, обладающие выраженными иммуномодулирующими свойствами [68]. Нами установлено, что интраназально введенный живой штамм *C. pseudodiphtheriticum* ‘Соколов’ модулирует опосредованный Toll-like рецепторами (TLR3) врожденный иммунный ответ в дыхательных путях новорожденных мышей, повышая их сопротивляемость к первичной респираторно-синцитиальной (RSV) инфекции и вторичной пневмококковой пневмонии. На этом основании даже было высказано мнение о том, что назальный спрей, содержащий штамм ‘Соколов’, может служить в качестве иммунобиотика, стимулирующего врожденный противовирусный и антибактериальный иммунитет, и использоваться для неспецифической профилактики сезонных RSV- и пневмококковой инфекций [69]. Вполне вероятно, что упомянутая выше способность *C. pseudodiphtheriticum* элиминировать *S. aureus* может быть связана не только с антимикробными свойствами коринебактерий, но и с иммуномодулирующей активностью микобактериальных клеточных стенок.

Таким образом, бактериотерапия пробиотиками готова послужить альтернативой антибиотикам в борьбе с носительством *S. aureus* и, возможно, других патобионтов на слизистой оболочке носа. К кандидатам на роль назальных пробиотиков можно отнести представителей родов *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. lugdunensis*) и *Corynebacterium* (*C. pseudodiphtheriticum*). Коринебактерии, по нашему мнению, более предпочтительны, поскольку помимо антимикробной активности они обладают антивирулентными и иммуномодулирующими свойствами. Ниже приводим наши представления о том, как расширить возможности методов микробной терапии стафилококкового носительства.

Все коммерческие пробиотики на данный момент представляют собой культуры бактерий и дрожжевых грибов, выращенные на жидких питательных средах в биореакторе и состоящие из однотипных микробных клеток (планктонная форма). Для усиления терапевтического действия пробиотиков представляется целесообразным выращивать и применять их в виде биопленки. Все микроорганизмы в естественной, природной среде образуют биопленку. Биопленка это хорошо защищенная от внешних воздействий структура, формирующаяся на поверхности объектов окружающей сре-

ды и тканей живых организмов, состоящая из микробных клеток и образованного ими межклеточного слизистого матрикса [70]. С помощью твердофазной технологии нами впервые была получена биопленка пробиотических бактерий (лактобацилл), и в опытах на мышах продемонстрирована ее способность эффективно восстанавливать микрофлору при дисбиозе кишечника, вызванном антибиотиками [71]. В сравнении с планктонной формой, биопленка пробиотиков обладает значительно более выраженными антимикробными, иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами [72]. Биопленка лактобацилл, выращенная на поверхности частиц сефадекса G-25, способна сохранять жизнеспособность в кислой среде желудка, колонизовать слизистую кишечника и снижать проницаемость кишечной стенки. Даже однократного применения биопленки пробиотика было достаточно, чтобы защитить новорожденных крыс от развития экспериментального некротизирующего энтероколита и его осложнений. Планктонная форма пробиотика была значительно менее эффективной [73]. Биопленка даже по внешнему виду резко отличается от планктонной формы бактерий. В привычной для микробиологов одноклеточной планктонной культуре бактерии неотличимы друг от друга и располагаются в виде беспорядочных скоплений. В биопленке микробные клетки гетерогенны по размеру и форме, соединены между собой особыми перемычками и имеют вид трёхмерной пространственной структуры [60, 70]. A. Prindle и соавт. [74] установили, что бактерии, которые обычно рассматриваются как примитивная форма жизни, в состоянии биопленки представляют собой единый многоклеточный комплекс, способный к саморегуляции посредством электрохимических импульсов, наподобие тех, которые возникают в нейронах. Будучи весьма сложно устроенной саморегулирующейся системой, резистентной к воздействию окружающей среды (включая факторы иммунитета) и имеющей сходство с природными аналогами, биопленка пробиотика, по нашему предположению, окажется способной более эффективно, чем планктонная форма, реализовать свои полезные свойства.

Недостаточную клиническую эффективность пробиотиков часто связывают с их «чужеродностью» для собственной микрофлоры организма. Колонизационная резистентность слизистых оболочек не позволяет экзогенным бактериям прижиться в организме. В ряде случаев применение коммерческих пробиотиков даже оказывает негативное воздействие на процесс восстановления микробиоты после антибиотикотерапии [75]. Альтернативой коммерческим пробиотикам является подход, основанный на восстановлении микробиоты, в случае развития дисбиотического состояния, с помощью штаммов собственных бактерий человека. Этот подход, известный как технология аутопробиотиков или – персонифицированная симбионтная терапия (ПЕРСТ), предполагает выделение отдельных представителей микробиоты в виде чистых культур, их генетический анализ и возвращение бактерий обратно в кишечник после накопления их вне организма [37]. Аутоштаммы легко колонизируют слизистые оболочки и не вызывают реакции отторжения со стороны резидентной микрофлоры и иммунной системы хозяина. Таким образом, вместо пробиотиков в их классическом понимании с целью деколонизации стафилококковых носителей может использоваться технология ПЕРСТ на основе аутоштаммов назальных коринебактерий.

Показано, что длительная персистенция *S. aureus* на слизистой носа приводит к подавлению иммунного ответа в отношении данного патобионта, а также вызывает развитие локального хронического воспаления [76, 77]. Это состояние сопровождается стойким комменсальным сдвигом, который не может быть купирован до тех пор, пока стафилококк колонизирует данную нишу и доминирует в составе микробио-

ценоза. В таких случаях перед назначением пробиотиков может потребоваться удаление стафилококка со слизистой носа, например, с помощью антимикробных препаратов [78]. Учитывая выраженное побочное действие антибиотиков (усугубление дисбиоза, аллергияция организма, формирование антибиотикорезистентности), целесообразно использовать альтернативный подход – вакцинотерапию. Разработка лечебных стафилококковых вакцин пока не увенчалась успехом, что объясняется недостаточным объемом накопленных знаний в области патогенеза носительства и разнородностью клональной структуры стафилококка [79]. В такой ситуации для санации носителей *S. aureus* можно попытаться воспользоваться аутовакцинами. Для получения аутовакцины микробную культуру получают от пациента, накапливают на питательной среде, инактивируют и вводят в организм того же пациента. Данный метод стимуляции иммунного ответа против конкретного штамма возбудителя уже более ста лет применяется в медицине для лечения хронических стафилококковых гнойно-воспалительных заболеваний [80]. Ожидается, что такая иммунная реакция будет способствовать деколонизации носителей и снижению частоты развития у них эндогенной стафилококковой инфекции. Пероральная аутовакцинация с успехом была использована для борьбы с назальным носительством *Str. pneumoniae* и *Str. pyogenes*, а вот носители *S. aureus* оказались рефрактерными к такому способу деколонизации [81]. Можно предположить, что для санации этой категории носителей вакцинацию следовало проводить не перорально, а интраназально, поскольку аппликация микробной культуры на слизистую оболочку носа приводит к формированию местной иммунной защиты [66]. Также необходимо подумать и о возможности наработки аутовакцин из биопленки *S. aureus* [82-84].

Следует иметь в виду, что деколонизация не всегда предполагает полное освобождение от золотистого стафилококка. Присутствие небольшого количества «адаптированных» патобионтов в составе микробного консорциума не представляет опасности для организма. Некоторые авторы отмечают даже определенную выгоду, которую приносит носительство *S. aureus*, – оно позволяет поддерживать в организме определенный уровень иммунного ответа к стафилококку. Так, смертность от стафилококкового сепсиса среди пациентов, которые не являлись носителями, была в четыре раза выше, чем среди тех, кто до заболевания был колонизован золотистым стафилококком [2]. Помимо этого показано, что высокие концентрации *S. aureus* индуцируют синтез провоспалительных цитокинов TNFα и ингибируют образование противовоспалительных IL-10, а небольшие количества *S. aureus* – наоборот, способствуют подавлению воспалительной реакции [85]. В целом, при деколонизации *S. aureus* усилия должны быть направлены не на тотальное «искоренение» данного микроба, а на восстановление функции контроля организма хозяина над состоянием микробиоты. В результате формирования полноценного микробиоценоза должен заработать естественный механизм саморегуляции, ограничивающий колонизацию, размножение и вирулентность патобионтов. В зависимости от состояния местной экосистемы и микроокружения патобионты могут быть вредными, нейтральными или даже полезными для организма [86]. Решить задачу восстановления колонизационной резистентности организма с помощью антибиотиков, по понятным причинам, не удастся.

#### **Выводы:**

1) Проблема носительства *S. aureus* и борьбы с ним остаётся актуальной. Элиминация *S. aureus* может привести не только к предотвращению микробных осложнений у пациентов, но и к самовосстановлению подавленной стафилококками резидентной микробиоты, оздоровлению носоглотки и организма в целом.

2) Назальная микробиота играет важную роль в защите организма от бактерионосительства, и ее восстановление является необходимым, а возможно и достаточным, условием достижения эффекта стойкой деколониации.

3) Дальнейшие разработки в области микробиологии, молекулярной биологии и иммунологии микробных биопленок, аутопробиотиков и аутовакцин позволят создать эффективный способ лечения дисбиоза носа, проявлением которого является стафилококковое носительство.

4) Рассмотренные подходы к восстановлению нормального микробиоценоза полости носа будут полезны при разработке новых, «экологических» способов профилактики и других заболеваний, для которых известен феномен бактерионосительства, в том числе менингококковой, пневмококковой, стрептококковой, гемофильной, коклюшной и дифтерийной инфекций.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 5-14, 16-28, 30-59, 61-69, 71-82, 84 см. REFERENCES)

3. Миронов А. Ю., Савицкая К. И., Воробьев А. А. Условно-патогенные микроорганизмы при заболеваниях дыхательных путей у больных региона Московской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 1: 81-4.
4. Миронов А. Ю., Воробьев А. А. Патогенные кокки. Воробьев А. А., ред. М.: Русский врач; 2000.
15. Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Микробиология*. 2014; 83(1): 15-27.
29. Потёмкина Е.Е., Мазурова И.К., Платонова Т.В., Корженкова М.П. Особенности местных иммунологических реакций при дифтерийной инфекции у детей. *Вопросы охраны материнства и детства*. 1989; 10: 34-8.
60. Мельников В.Г. Поверхностные структуры грампозитивных бактерий в межклеточном взаимодействии и пленкообразовании. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2010; 2: 119-23.
70. Мельников В.Г. Новое поколение пробиотиков. *Медицинский академический журнал*. 2017; 17(4): 64-7.
83. Мельников В.Г. К вопросу о болезнетворности условно-патогенных микроорганизмов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; 3: 15-8.
84. Харсеева Г.Г., Фролова Я.Н., Миронов А.Ю. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346-54.

## REFERENCES

1. Khosravi A., Mazmanian S.K. Disruption of the gut microbiome as a risk factor for microbial infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 2013; 16(2): 221-7.
2. Wertheim H.F., Vos M.C., Ott A., Van Belkum A., Voss A., Kluytmans J. A., et al. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteremia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet*. 2004; 364: 703-5.
3. Mironov A. Yu., Savitskaya K. I., Vorobyov A. A. Opportunistic microorganisms in diseases of the respiratory tract in patients of the Moscow region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 1: 81-4. (in Russian)
4. Mironov A. Yu., Vorob'yov A. A. Pathogenic cocci [Patogennye kokki]. Vorob'yov A.A., ed. Moscow: Russkiy vrach; 2000. (in Russian)
5. Nielsen J., Ladefoged S.D., Kolmos H.J. Dialysis catheter-related septicemia-focus on *Staphylococcus aureus* septicemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1998; 13: 2847-52.
6. Wertheim H.F., Melles D.C., Vos M.C., van Leeuwen W., van Belkum A., Verbrugh H.A. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 2005a; 5(12): 751-62.
7. Balci D.D., Duran N., Ozer B., Gunesacar R., Onlen Y., Yenin J.Z., High prevalence of *Staphylococcus aureus* cultivation and superantigen production in patients with psoriasis. *Eur. J. Dermatol.* 2009; 19: 238-42.
8. Laudien M., Gadola S. D., Podschun R., Hedderich J., Paulsen J., Reinhold-Keller E., et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and endonasal activity in Wegener granulomatosis as compared to rheumatoid arthritis and chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2010; 28: 51-5.
9. Kotpal R., S K.P., Bhalla P., Dewan R., Kaur R. Incidence and risk factors of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in HIV-infected individuals in comparison to HIV-uninfected individuals: a case-control study. *J. Int. Assoc. Provid. AIDS Care*. 2016; 15: 141-7.

10. Immergluck L., Jain S., Ray S., Mayberry R., Satola S., Parker T., et al. Risk of skin and soft tissue infections among children found to be *Staphylococcus aureus* MRSA USA300 carriers. *West. J. Emerg. Med.* 2017; 18: 201-12.
11. Septimus E.J., Schweizer M.L. Decolonization in prevention of health care-associated infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29: 201-22.
12. Wertheim H.F.L., Verveer J., Boelens H.A.M., van Belkum A., Verbrugh H.A., Vos M.C. Effect of mupirocin treatment on nasal, pharyngeal, and perineal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005b; 49: 1465-7.
13. Hanssen, A.-M., Kindlund, B., Stenklev, N. C., Furberg, A.-S., Fismen, S., Olsen, R. S., et al. Localization of *Staphylococcus aureus* in tissue from the nasal vestibule in healthy carriers. *BMC Microbiol.* 2017; 17: 89.
14. Rigai J., Morgene M. F., Gavid M., Lelonge Y., He Z., Carricajo A., et al. Intracellular activity of antimicrobial compounds used for *Staphylococcus aureus* nasal decolonization. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018; 73(11): 3044-8.
15. Mulyukin A.L., Suzina N.E., Melnikov V.G., Gal'chenko V.F., El-Registan G.I. Dormancy and phenotypic variability in *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Mikrobiologiya*. 2014; 83(1): 15-27. (in Russian)
16. Otto M. MRSA virulence and spread. *Cell Microbiol.* 2012; 14: 1513-21.
17. Antonov N.K., Garzon M.C., Morel K.D., Whittier S., Planet P.J., Lauren C.T. High prevalence of mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from a pediatric population. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(6): 3350-6.
18. Kluytmans J.A., Wertheim H.F. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection*. 2005; 33: 3-8.
19. Liu C.M., Price L.B., Hungate B.A., Abraham A.G., Larsen L.A., Christensen K., et al. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Sci. Adv.* 2015; 1(5): e1400216.
20. Nouwen J.L., Fieren M.W., Snijders S., Verbrugh H.A., van Belkum A. Persistent (not intermittent) nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is the determinant of CPD-related infections. *Kidney Int.* 2005; 67: 1084-92.
21. Muthukrishnan, G., Lamers, R. P., Ellis, A., Paramanandam, V., Persaud, A. B., Tafur, S., et al. Longitudinal genetic analyses of *Staphylococcus aureus* nasal carriage dynamics in a diverse population. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 221.
22. Ghasemzadeh-Moghaddam H., Neela V., van Wamel W., Hamat R.A., Shamsudin M.N., Hussin N.S. et al. Nasal carriers are more likely to acquire exogenous *Staphylococcus aureus* strains than non-carriers. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(11): 998.e1-7.
23. Nouwen J., Boelens H., van Belkum A., Verbrugh H. Human factor in *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Infect. Immun.* 2004; 72: 6685-88.
24. van Belkum A., Verkaik N.J., de Vogel C.P., Boelens H.A., Verveer J., Nouwen J.L., et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J. Infect. Dis.* 2009; 199: 1820-6.
25. Lemmens N., van Wamel W., Snijders S., Lesse A.J., Faden H., van Belkum A. Genomic comparisons of USA300 *Staphylococcus aureus* colonizing the nose and rectum of children with skin abscesses. *Microb. Pathog.* 2011; 50: 192-9.
26. Rao Q., Shang W., Hu X., Rao X. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *J. Med. Microbiol.* 2015; 64(12): 1462-73.
27. Casadevall A., Pirofski L.A. What is a host? Incorporating the microbiota into the damage-response framework. *Infect. Immun.* 2015; 83(1): 2-7.
28. Melnikov V.G. Treatment of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* carriers. *Int. J. Probiotics Prebiotics*. 2009; 4 (2): 150-1.
29. Potyomkina E.E., Mazurova I.K., Platonova T.V., Korzenkova M.P. Features of local immunological reactions in children with diphtheria infection. *Voprosy okhrany materinstva i detstva*. 1989; 10: 34-8. (in Russian)
30. Korpela K., Salonen A., Virta L.J., Kekkonen R.A., Forslund K., Bork P., et al. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish preschool children. *Nat. Commun.* 2016; 7: 10410.
31. Andersen P.S., Pedersen J.K., Fode P., Skov R.L., Fowler V.G.Jr., Stegger M., et al. Influence of host genetics and environment on nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Danish middle-aged and elderly twins. *J. Infect. Dis.* 2012; 206: 1178-84.
32. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009; 326(5960): 1694-7.
33. Bogaert D., Keijsers B., Huse S., Rossen J., Veenhoven R., van Gils E., et al. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis. *PLoS ONE*. 2011; 6(2): e17035.
34. Lemon K.P., Armitage G.C., Relman D.A., Fischbach M.A. Microbiota-targeted therapies: an ecological perspective. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(137): 137rv5.
35. Petchey O.L., Eklof A., Borrvall C., Ebenman B. Trophically unique species are vulnerable to cascading extinction. *Am. Nat.* 2008; 171(5): 568-79.
36. Carding S., Verbeke K., Vipond D.T., Corfe B.M., Owen L.J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2015; 26: 26191.
37. Suvorov A., Karaseva A., Kotyleva M., Kondratenko Y., Lavrenova N., Korobeynikov A. et al. Autoprobiotics as an approach for restoration of personalized microbiota. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1869.
38. Stubbendieck R.M., Straight P.D. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J. Bacteriol.* 2016; 198: 2145-55.

39. Tarantino V., Savaia V., D'Agostino R., Silvestri M., Ciprandi G. Bacteriotherapy for preventing recurrent upper respiratory infections in children: a real-world experience. *Otolaryngol. Pol.* 2018; 72(3): 33-8.
40. Deasy A.M., Guccione E., Dale A.P., Andrews N., Evans C.M., Bennett J.S., et al. Nasal inoculation of the commensal *Neisseria lactamica* inhibits carriage of *Neisseria meningitidis* by young adults: a controlled human infection study. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60: 1512-20.
41. Boris M., Sellers T.F. Jr, Eichenwald H.F., Ribble J.C., Shinefield H.R. Bacterial interference; protection of adults against nasal *Staphylococcus aureus* infection after colonization with a heterologous *S. aureus* strain. *Am. J. Dis. Child.* 1964; 108: 252-61.
42. Houck P.W., Nelson J.D. & Kay J.L. Fatal septicemia due to *Staphylococcus aureus* 502A. Report of a case and review of the infectious complications of bacterial interference programs. *Am. J. Dis. Child.* 1972; 123: 45-8.
43. Barbagelata M.S., Alvarez L., Gordiola M., Tuchscher L., von Eiff C., Becker K. et al. Auxotrophic mutant of *Staphylococcus aureus* interferes with nasal colonization by the wild type. *Microbes Infect.* 2011; 13(12-13): 1081-90.
44. Frank D.N., Feazel L.M., Bessesen M.T., Price C.S., Janoff E.N., Pace N. R. The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PLoS one.* 2010; 5(5): e10598.
45. Cleland E.J., Drilling A., Bassiouni A., James C., Vreugde S., Wormald P.J. Probiotic manipulation of the chronic rhinosinusitis microbiome. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2014; 4(4): 309-14.
46. Nakatsuji T., Chen T.H., Narala S., Chun K.A., Two A.M., Yun T. et al. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(378). pii: eaah4680.
47. Sugimoto S., Iwamoto T., Takada K., Okuda K., Tajima A., Iwase T. et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* 2013; 195(8): 1645-55.
48. Park B., Iwase T., Liu G.Y. Intranasal application of *S. epidermidis* prevents colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS ONE.* 2011; 6(10): e25880.
49. Bitschar K., Sauer B., Focken J., Dehmer H., Moos S., Konnerth M. et al. Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 2730.
50. Zipperer A., Konnerth M.C., Laux C., Berscheid A., Janek D., Weidenmaier C., et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature.* 2016; 535: 511-6.
51. Alvarez A.S., Remy L., Allix-Béguec C., Ligier C., Dupont C., Lemnir O. et al. Patient nostril microbial flora: individual-dependency and diversity precluding prediction of *Staphylococcus aureus* acquisition. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(1): 70-8.
52. Johnson R.C., Ellis M.W., Lanier J.B., Schlett C.D., Cui T., Merrell D.S. Correlation between nasal microbiome composition and remote purulent skin and soft tissue infections. *Infect. Immun.* 2015; 83(2): 802-11.
53. Kaspar U., Kriesekorte A., Schubert T., Peters G., Rudack C., Pieper D.H., et al. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environ. Microbiol.* 2016; 18(7): 2130-42.
54. Yan M., Pamp S.J., Fukuyama J., Hwang P.H., Cho D.Y., Holmes S., et al. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. *Cell Host Microbe.* 2013; 14(6): 631-40.
55. Karlyshev A.V., Melnikov V.G. Draft Genome Sequence of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* strain 090104 «Sokolov». *Genome Announc.* 2013; 1(6): e00921-13.
56. Kiryukhina N.V., Melnikov V.G., Suvorov A.V., Morozova Y.A., Ilyin V.K. Use of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* for elimination of *Staphylococcus aureus* from the nasal cavity in volunteers exposed to abnormal microclimate and altered gaseous environment. *Probiotics Antimicro. Prot.* 2013; 5(4): 233-8.
57. Uehara Y., Nakama H., Agematsu K., Uchida M., Kawakami Y., Abdul Fatah A.S. et al. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *J. Hosp. Infect.* 2000; 44(2): 127-33.
58. Hardy B.L., Dickey S.W., Plaut R.D., Riggins D.P., Stibitz S., Otto M. et al. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* exploits *Staphylococcus aureus* virulence components in a novel polymicrobial defense strategy. *mBio.* 2019; 10: e02491-18.
59. Ramsey M.M., Freire M.O., Gabriliska R.A., Rumbaugh K.P., Lemon K.P. *Staphylococcus aureus* shifts toward commensalism in response to *Corynebacterium* species. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1230.
60. Melnikov V.G. Surface structures of gram-positive bacteria in the intercellular interaction and biofilm formation. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2010; 2: 119-23. (in Russian)
61. Leung C.Y., Weitz J.S. Not by (good) microbes alone: towards immunocommenseal therapies. *Trends Microbiol.* 2019; 27(4): 294-302.
62. Sjogren Y.M., Tomicic S., Lundberg A., Sjogren Y.M., Tomicic S., Lundberg A. et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin. Exp. Allergy.* 2009; 39: 1842-51.
63. Kondrashova A., Seiskari T., Ilonen J., Knip M., Hyöty H. The 'Hygiene hypothesis' and the sharp gradient in the incidence of autoimmune and allergic diseases between Russian Karelia and Finland. *APMIS.* 2013; 121(6): 478-93.
64. Okada H., Kuhn C., Feillet H., Bach J.F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol.* 2010; 160(1): 1-9.
65. Kukkonen K., Savilahti E., Haahela T., Juntunen-Backman K., Korpela R., Poussa T. et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119: 192-8.
66. Villena J., Laino J., Suvorov A., Melnikov V., Alvarez S. Immunobiotic and recombinant lactic acid bacteria: soldiers in the fight against *Streptococcus pneumoniae*. In: Shabir Ahmad Mir, ed. Recent trends in immunology. SM Online Publishers LLC; 2015: 1-30.
67. Glück U., Gebbers J.-O. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77(2): 517-20.
68. Burkovski A. The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2018; 111(5): 717-25.
69. Kanmani P., Clua P., Vizoso Pinto M.G., Rodriguez C., Salva S., Alvarez S., Melnikov V., Kitazawa H., Villena J. Respiratory commensal bacteria *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* improves resistance of infant mice to Respiratory Syncytial Virus and *Streptococcus pneumoniae* superinfection. *Front Microbiol.* 2017; 8: Article 1613.
70. Melnikov V.G. New generation of probiotics. *Meditinskii akademicheskii zhurnal.* 2017; 17(4): 64-7. (in Russian)
71. Ushakova N.A., Abramov V.M., Khlebnikov V.S., Semenov A.M., Kuznetsov B.B., Kozlova A.A., et al. Properties of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 8-RA-3 grown in a biofilm by solid substrate cultivation method. *Probiotics Antimicro. Prot.* 2012; 4(3): 180-6.
72. Aoudia N., Rieu A., Briandet R., Deschamps J., Chluba J., Jegu G., et al. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiol.* 2016; 53(Pt A): 517-25.
73. Olson J., Rager T., Navarro J., Mashburn-Warren L., Goodman S., Besner G. Harvesting the benefits of biofilms: A novel probiotic delivery system for the prevention of necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.* 2016; 51(6): 936-41.
74. Prindle A., Liu J., Asally M., Ly S., Garcia-Ojalvo J., Suel G.M. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. *Nature.* 2015; 527: 59-63.
75. Suez J., Zmora N., Zilberman-Schapira G., Mor U., Dori-Bachash M., Bashardes S. et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell.* 2018; 174(6): 1406-23.
76. Quinn G.A., Cole A.M. Suppression of innate immunity by a nasal carriage strain of *Staphylococcus aureus* increases its colonization on nasal epithelium. *Immunology.* 2007; 122 (1): 80-9.
77. Oliveira D., Borges A., Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins (Basel).* 2018; 10(6). pii: E252.
78. Laux C., Peschel A., Krismer B. *Staphylococcus aureus* colonization of the human nose and interaction with other microbiome members. *Microbiol. Spectr.* 2019; 7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0029-2018.
79. Redi D., Raffaelli C.S., Rossetti B., De Luca A., Montagnani F. *Staphylococcus aureus* vaccine preclinical and clinical development: current state of the art. *New Microbiol.* 2018; 41(3): 208-13.
80. Holtfreter S., Jursa-Kulesza J., Masiuk H., Verkaik N.J., de Vogel C., Kolata J. et al. Antibody responses in furunculosis patients vaccinated with autologous formalin-killed *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(6): 707-17.
81. Zagolski O., Strek P., Kasprzewicz A., Bialecka A. Effectiveness of polyvalent bacterial lysate and autovaccines against upper respiratory tract bacterial colonization by potential pathogens: a randomized study. *Med. Sci. Monit.* 2015; 21:2997-3002.
82. Harro J.M., Peters B.M., O'May G.A., Archer N., Kerns P., Prabhakara R. et al. Vaccine development in *Staphylococcus aureus*: taking the biofilm phenotype into consideration. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010; 59(3): 306-23.
83. Melnikov V.G. To the point of the pathogenicity of opportunistic microorganisms. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2010; №3: 15-8. (in Russian)
84. Kharseeva G.G., Frolova Ya.N., Mironov A.Yu. Biofilms of pathogenic bacteria: biological properties and role in the chronicity of the infectious process. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2015; 135(4): 346-54. (in Russian)
85. Schwartz J.S., Peres A.G., Mfuna Endam L., Cousineau B., Madrenas J., Desrosiers M. Topical probiotics as a therapeutic alternative for chronic rhinosinusitis: a preclinical proof of concept. *Am. J. Rhinol. Allergy.* 2016; 30(6): 202-5.
86. Tso G.H.W., Reales-Calderon J.A., Tan A.S.M., Sem X., Le G.T.T., Tan TG et al. Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. *Science.* 2018; 362(6414): 589-95.

Поступила 16.10.19  
Принята к печати 18.10.19

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Прохвятилова Е.В., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В.

### ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ САПА И МЕЛИОИДОЗА С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия

*Для диагностики in vitro разработан набор реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-PB» для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени в биологическом (клиническом) материале и культурах микроорганизмов, объектах окружающей среды, твёрдых пищевых продуктах (рис). В клинических испытаниях изучена диагностическая ценность набора реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-PB». Установлена высокая аналитическая чувствительность ( $1 \times 10^3$  м.к./мл) и специфичность 100% ПЦР-PB с разработанным набором вне зависимости от вида исследуемого материала. Диагностическая чувствительность ПЦР-PB при применении набора реагентов составила не менее 98,0% и специфичностью не менее 99%. Завершены этапы государственной экспертизы, получено регистрационное удостоверение в Росздравнадзоре, разрешены производство, реализация и применение МИ в медицинской лабораторной практике.*

**Ключевые слова:** набор реагентов; сап; мелиоидоз; полимеразная цепная реакция в реальном времени.

**Для цитирования:** Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Прохвятилова Е.В., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В. Оценка возможности применения в лабораторной практике набора реагентов для диагностики сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (11): 700-704. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-700-704>

Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Prokhvatilova E.V., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

#### ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF APPLICATION IN LABORATORY PRACTICE OF REAGENT KIT FOR DIAGNOSIS OF GLANDERS AND MELIOIDOSIS BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

Federal Government Health Institution «Volograd Research Institute for Plague Control» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, 400131, Volgograd, Russia

*The reagent kit AmpligenBurk-mallei/pseudomallei-RT PCR is designed for detecting in vitro diagnostics and differentiate the DNA of glanders and melioidosis pathogens by real-time multiplex PCR in biological (clinical) material and cultures of microorganisms, as well as environmental objects and solid food products (rice). During clinical testing diagnostic value of reagent kit AmpligenBurk-mallei/pseudomallei-RT PCR has been studied. Based on the results obtained, a high analytical sensitivity ( $1 \times 10^3$  microbe cells/ml) and specificity (100%) of PCR-RT with the developed reagent kit were established, regardless of the type of material being studied. The diagnostic sensitivity of PCR-RT using a set of reagents was at least 98.0% and specificity at least 99%. The stages of state examination have been completed, a registration certificate has been obtained at Roszdravnadzor, production, sale and use of reagent kit in medical laboratory practice have been permitted.*

**Key words:** reagent kit; glanders; melioidosis; real-time polymerase chain reaction.

**For citation:** Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Prokhvatilova E.V., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Assessment of the possibility of application in laboratory practice of reagent kit for diagnosis of glanders and melioidosis by real-time polymerase chain reaction. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)/ 2019; 64 (11): 700-704. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-11-700-704>

**For correspondence:** Lemasova L.V., candidate of medical sciences, scientific collaborator of the laboratory of genodiagnostics; e-mail: [vari2@sprint-v.com.ru](mailto:vari2@sprint-v.com.ru)

#### Information about authors:

Lemasova L.V., <https://orcid.org/0000-0003-3256-5025>  
Tkachenko G.A., <http://orcid.org/0000-0003-0199-3342>  
Prokhvatilova E.V., <http://orcid.org/0000-0001-9947-7711>  
Belitskaya L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1803-9443>  
Viktorov D.V., <http://orcid.org/0000-0002-2722-7948>  
Toporkov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

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

Received 26.09.2019  
Accepted 10.10.2019

**Введение.** Высокопатогенные для человека и различных видов животных возбудители *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* вызывают особо опасные инфекционные заболевания – сап и мелиоидоз. В связи с тяжёлым течением заболеваний, сложностью постановки диагноза на основании клинических симптомов, высокой летальностью, отсутствием специфических препаратов для профилактики остается актуальной проблема совершенствования средств диагностики *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Возбудители обладают близким антигенным родством и высокой степенью сходства геномов *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Вследствие этого возникают сложности конструирования диагностических препаратов, позволяющих дифференцировать патогенные буркхольдерии [1, 2].

К середине XX века сап ликвидирован на территориях многих стран мира, в том числе России и США, но в настоящее время его относят к «возвращающимся» инфекциям, поскольку отмечается тенденция к увеличению частоты возникновения эпизоотий и расширению его ареала. Эндемичными территориями считают Иран, Бразилию, Индию, Монголию, в ряде стран (Турция, Германия, Объединенные Арабские Эмираты) регистрируют единичные случаи сапа у сельскохозяйственных и диких животных. В естественных условиях резервуаром и источником инфекции являются больные животные (лошади, ослы, верблюды, мулы) [2-5].

Мелиоидоз распространён в тропических и субтропических областях Западной и Центральной Африки, Южной и Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, в Северо-Восточной Австралии, где возбудитель входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоёмов. Заболеваемость мелиоидозом в мире составляет порядка 165 тыс. случаев ежегодно, уровень смертности, достигает 58%, что сопоставимо со смертностью от кори. Многообразие клинических проявлений, бессимптомное течение или внутриклеточная персистенция возбудителя, в дополнение с высокой резистентностью его к широкому спектру антибактериальных препаратов, существенно затрудняет адекватную диагностику и своевременное лечение мелиоидоза [6-8].

На территории Российской Федерации сап и мелиоидоз до настоящего времени не регистрировали, возможно, по причине, что данные заболевания не являются эндемичными и относятся к числу «экзотических инфекций». Продолжающееся расширение ареала сапа и мелиоидоза, как на эндемичных территориях, так и в странах, где заболевания носят завозной характер, может быть связано, с одной стороны, с развитием экономических и культурных связей между различными государствами, с другой – является результатом постоянного совершенствования лабораторной диагностики, включая разработку современных экспрессных генетических методов.

В России функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза (далее Референс-центр), на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, деятельность которого координируется в соответствии с приказом Роспотребнадзора № 1116 от 01.12.2017 г. «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации». Важными направлениями деятельности Референс-центра являются проведение научно-исследовательских работ по изучению биологических свойств патогенных буркхольдерий и разработка диагностических наборов реагентов, обеспечивающих с высокой чувствительностью и специфичностью выявление возбудителей сапа и мелиоидоза в окружающей среде и различных пробах клинического материала.

Цель работы – испытание и оценка диагностических характеристик нового набора реагентов для выявления и диф-

ференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени.

**Материал и методы.** Использовано медицинского изделия для диагностики *in vitro* сапа и мелиоидоза «Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-PB» по ТУ 21.20.23-013-01898084-2016». В состав набора реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-PB» входят следующие компоненты: ПЦР-смесь-1 *B. mallei/pseudomallei* – 1 пробирка по 0,3 мл; ПЦР-буфер-2 – 1 пробирка по 0,3 мл; Taq-ДНК-полимераза – 1 пробирка по 0,03 мл; MgCl<sub>2</sub> – 1 пробирка по 0,15 мл; ПКО ДНК *B. mallei* (положительный контрольный образец) – 1 пробирка по 0,1 мл; ПКО ДНК *B. pseudomallei* (положительный контрольный образец) – 1 пробирка по 0,1 мл; ВКО (внутренний контрольный образец) – 1 пробирка по 0,08 мл; ТЕ-буфер – 1 пробирка по 1 мл.

Клинические испытания МИ проводили с использованием 14 штаммов *B. mallei*, 16 штаммов *B. pseudomallei*, 20 штаммов гетерологичных микроорганизмов, из них 5 штаммов *B. thailandensis*, 7 штаммов *B. cepacia*, 1 штамм *Vibrio cholerae*, 1 штамм *Francisella tularensis*, 1 штамм *Yersinia pestis*, 1 штамм *Bacillus anthracis*, 1 штамм *Pseudomonas putida*, 1 штамм *Pseudomonas aeruginosa*, 1 штамм *Staphylococcus aureus*, 1 штамм *Escherichia coli*, полученных из коллекций живых культур ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Оценка диагностической чувствительности набора реагентов «АмплигенBurk-mallei/pseudomallei-PB» проведена на образцах клинического материала (кровь, моча, спинномозговая жидкость, содержимое абсцессов, мокрота, рвотные массы, отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, мазок из носоглотки, испражнения), секционного материала от человека (биоптаты печени, селезёнки, лёгкого, почки, головной мозг), биологического материала от животных (сердце, печень, лёгкое, селезёнка, почки, головной мозг, костный мозг, кровь), объектов окружающей среды (вода, почва), твёрдых пищевых продуктов (рис), искусственно контаминированных *B. mallei* Ц 4, *B. pseudomallei* 100 в конечной концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл. Для определения диагностической специфичности использованы бактериальные суспензии гетерологичных микроорганизмов в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл и образцы клинического и биологического материала, искусственно контаминированные *B. thailandensis* E 299 в конечной концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл.

Работу проведена в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности», МУ 4.2.2787-10 «Лабораторная диагностика мелиоидоза» и МУ 4.2.2831-11 «Лабораторная диагностика сапа».

Штаммы *B. mallei* и *B. pseudomallei* культивировали на агаре Хоттингера (ФСР 2009/05571), содержащим 5% глицерина, pH среды (7,0±0,2), инкубировали при температуре (37±1)°C в течение 24-48 ч. Выращивание близкородственных и гетерологичных видов микроорганизмов проводили с использованием общепринятых требований в соответствии с видом. Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путём посева из микробных взвесей в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма на чашки Петри с агаром Хоттингера (ФСР 2009/05571), содержащим 5% глицерина, pH среды (7,0±0,2). Через 24-48 ч инкубации подсчитывали количество колоний, выросших на поверхности агара.

**Выделение ДНК.** Выделение ДНК из проб чистых культур возбудителей сапа и мелиоидоза, гетерологичных микроорганизмов, спинномозговой жидкости, мазков из носоглотки осуществляли в присутствии гуанидинизотиоцианата методом осаждения изoproпанолом с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Выделение ДНК из проб крови, мочи, мокроты, содержимого абсцессов, рвотных масс, отделяемое язв, экссудатов, пунктатов из лимфатических узлов, биоптатов, испражнений, воды, почвы, риса проводили с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Работу осуществляли в соответствии с инструкциями к указанному набору.

Для определения возможной контаминации на этапе выделения ДНК наряду с исследуемыми пробами включали отрицательный контроль выделения (ОКВ), который анализировали далее в ПЦР-РВ. Для этого в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл вместо пробы ДНК вносили 100 мкл ТЕ-буфера.

**Постановка и проведение ПЦР-РВ.** В микропробирке объемом 0,6 мл или 1,5 мл готовили реакционную смесь, которая состояла из ПЦР-смесь-1 *B. mallei/pseudomallei*, ПЦР-буфер-2,  $MgCl_2$ , ВКО, Taq-F-ДНК-полимеразы. Подготовленную смесь тщательно перемешивали на микроцентрифуге/встряхивателе и вносили по 15 мкл микропробирки объемом 0,2 мл. Затем в пробирку вносили по 10 мкл ДНК из исследуемых проб и 4 контрольных (отрицательный контроль выделения, отрицательный контроль ПЦР, положительный контроль *B. mallei* положительный контроль *B. pseudomallei*).

Детекцию результатов осуществляли путём измерения интенсивности флуоресцентных сигналов непосредственно в процессе ПЦР-РВ на приборе Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия): по каналу FAM/Green – ДНК *B. mallei*, по каналу TAMRA/Yellow – ДНК *B. pseudomallei*, по каналу Cy5/Red – ВКО (внутреннего контрольного образца). Результаты учитывали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (что соответствовало наличию или отсутствию значения порогового цикла «С<sub>т</sub>» в соответствующей графе в таблице результатов).

Для определения внутривоспроизводительности воспроизводимости одинаковые положительные пробы исследовали в пяти повторах с использованием двух серий набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ». Для определения межвоспроизводительности и межсерийной воспроизводимости одинаковые положительные пробы исследовали повторно с использованием двух серий набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ».

В качестве препарата сравнения использовали коммерческий набор реагентов «Набор реагентов для выявления и идентификации ДНК возбудителей бруцеллёза, сапа и мелиоидоза методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ) по ТУ 939816-017-46395995-2013», производства ЗАО «Синтол», г. Москва. Учёт и интерпретацию результатов проводили в соответствии с инструкцией к медицинскому изделию.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий», утв. ФГБУ «ЦМикЭЭ» и ФГБУ «ВНИИИМТ» 14.11.2013 г., ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». Статистическую достоверность результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных

опытов при доверительной вероятности 90%, используя формулу биномиального распределения Бернулли.

**Результаты и обсуждение.** В диагностике особо опасных инфекций мультиплексная ПЦР-РВ обладает рядом преимуществ: высокой чувствительностью и специфичностью, возможностью одновременной идентификации двух и более патогенных микроорганизмов в любом исследуемом материале за короткое время. Специалистами ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора разработан набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ», предназначенный для обнаружения и дифференциации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах клинического материала (кровь, моча, спинномозговая жидкость, содержимое абсцессов, мокрота, рвотные массы, отделяемое язв, экссудаты, пунктаты из лимфатических узлов, мазок из носоглотки, испражнения), секционного материала (биоптаты печени, селезёнки, лёгкого, сердца, почки, головной мозг), биологического материала от животных (сердце, печень, лёгкое, селезёнка, почки, головной мозг, костный мозг, кровь), объектов окружающей среды (вода, почва), твёрдых пищевых продуктов (рис), выделенных культур микроорганизмов методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

Набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» предлагается для применения в клинической лабораторной диагностике при исследовании материала, полученного от лиц с подозрением на сап и/или мелиоидоз вне зависимости от формы и наличия манифестации заболевания, в том числе находившихся на эндемичных территориях по сапу и мелиоидозу, при проведении эпидемиологического мониторинга.

При разработке набора «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» выбраны уникальные ДНК-мишени и сконструированы пары праймеров и флуоресцентно-меченые зонды для специфичной амплификации *B. mallei* на основе фрагментов гена *fliP*, кодирующего белок биосинтеза флагеллина (*flagellar biosynthetic protein - fliP*), имеющего вставку, фланкированную IS407A, для *B. pseudomallei*, комплементарные последовательности гена, кодирующего белок *grp68*, входящий в состав *RimL* региона (ацетилтрансферазы, включающие N-ацетилазы рибосомальных белков) [9].

В ходе контрольных лабораторных испытаний медицинского изделия определены аналитические характеристики набора «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ». Полученные результаты подтвердили заявленную аналитическую чувствительность ПЦР-РВ с использованием данного набора реагентов –  $1 \times 10^3$  м.к./мл. С гетерологичными микроорганизмами в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл отсутствовали положительные результаты, что указывало на высокую аналитическую специфичность разработанного набора реагентов равную 100%.

Для проверки технических характеристик набора реагентов и согласования нормативно-эксплуатационных документов в 2016 г. проведены технические испытания МИ на базе Федерального казённого учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИИПЧИ «Микроб») Роспотребнадзора. В результате испытаний согласованы вид, класс потенциального риска применения в соответствии с номенклатурной классификацией МИ, утверждённой приказом Минздрава России от 06.06.2012 «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий», проведена доработка технической и эксплуатационной документации и оформлен акт испытаний.

В 2017 г. набор «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» представлен к государственной регистрации в Федеральную

службу по надзору в сфере здравоохранения в качестве медицинского изделия. При проведении клинических испытаний с целью определения диагностической чувствительности МИ «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» при анализе 312 проб, из которых 160 проб суспензий микроорганизмов, 72 пробы клинического материала, 12 проб секционного материала, 44 пробы биологического материала, 16 проб объектов окружающей среды, 8 проб твёрдых пищевых продуктов, искусственно загрязнённых бактериальными агентами, содержащих возбудителей сапа (*B. mallei*) и мелиоидоза (*B. pseudomallei*) в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл, получен положительный результат в 309 случаях (99%).

При определении диагностической специфичности МИ «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» при анализе 184 проб, из которых 108 проб суспензий микроорганизмов, 36 проб клинического материала, 6 проб секционного материала,

22 пробы биологического материала, 8 проб объектов окружающей среды и 4 – твёрдых пищевых продуктов, искусственно загрязнённых бактериальными агентами, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл получен отрицательный результат в 100% случаев. Внутрипостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составила 100%.

При проведении клинических испытаний доказана диагностическая эффективность медицинских изделий «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB»: диагностическая чувствительность составила не менее 98% с достоверной вероятностью 90% при анализе 312 положительных проб, содержащих возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл, получен положительный результат в 309 случаях; диагностическая специфичность - не менее 99,0% с

**Результаты исследований в ПЦР с использованием набора реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-PB» для выявления и дифференциации ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* методом ПЦР-PB**

| Наименование проб                                                                                                             | Число проб | Положительный ответ в ПЦР                      |            |                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------|
|                                                                                                                               |            | «Амплиген <i>Burk-mallei/pseudomallei</i> -PB» |            | Образец сравнения «ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-PB» |
|                                                                                                                               |            | Серия 4/18                                     | Серия 5/18 |                                                   |
| 1                                                                                                                             | 2          | 3                                              | 4          | 5                                                 |
| Пробы чистых культур, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                                      | 38         | 38                                             | 38         | 38                                                |
| Пробы чистых культур, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                                | 42         | 42                                             | 40         | 40                                                |
| Пробы клинического материала, содержащие <i>B. mallei</i> концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                                | 18         | 18                                             | 18         | 18                                                |
| Пробы клинического материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                        | 18         | 18                                             | 17         | 12                                                |
| Пробы секционного материала, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                               | 3          | 3                                              | 3          | 2                                                 |
| Пробы секционного материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                         | 3          | 3                                              | 3          | 2                                                 |
| Пробы биологического материала, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                            | 11         | 11                                             | 11         | 10                                                |
| Пробы биологического материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                      | 11         | 11                                             | 11         | 4                                                 |
| Пробы объектов окружающей среды, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                           | 4          | 4                                              | 4          | 4                                                 |
| Пробы объектов окружающей среды, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                     | 4          | 4                                              | 4          | 4                                                 |
| Пробы пищевых продуктов, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                                   | 2          | 2                                              | 2          | 2                                                 |
| Пробы пищевых продуктов, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                             | 2          | 2                                              | 2          | 2                                                 |
| Итого положительных проб, содержащих <i>B. mallei</i> , в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                                | 76         | 76                                             | 76         | 74                                                |
| Итого положительных проб, содержащих <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл                            | 80         | 80                                             | 77         | 64                                                |
| Итого положительных проб, содержащих <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i> в концентрации $1 \times 10^3$ м.к./мл         | 156*       | 156                                            | 153        | 138*                                              |
| Пробы чистых культур, содержащие близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл     | 54         | 0                                              | 0          | 0                                                 |
| Пробы клинического материала, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл              | 18         | 0                                              | 0          | 0                                                 |
| Пробы секционного материала, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл               | 3          | 0                                              | 0          | 0                                                 |
| Пробы биологического материала, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл            | 11         | 0                                              | 0          | 0                                                 |
| Пробы объектов окружающей среды, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл           | 4          | 0                                              | 0          | 0                                                 |
| Пробы пищевых продуктов, содержащие близкородственные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл                   | 2          | 0                                              | 0          | 0                                                 |
| Итого отрицательных проб, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \times 10^7$ м.к./мл | 92*        | 0                                              | 0          | 0                                                 |

Примечание. \* - образцы анализировали в 2 повторах.

доверительной вероятностью 90% при исследовании 184 отрицательных проб, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл, получен отрицательный ответ в 184 случаях.

В качестве препарата сравнения использован набор реагентов «ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ», зарегистрированный на территории Российской Федерации. Чувствительность ПЦР-РВ при исследовании проб с помощью набора «ОМ-Скрин-Бру/Сап/Мелиоидоз-РВ», содержащих возбудителей *B. mallei*, *B. pseudomallei* в концентрации  $1 \times 10^3$  м.к./мл составила – 89%. Специфичность ПЦР-РВ с препаратом сравнения при анализе проб, содержащих близкородственных и гетерологичных микроорганизмов в концентрации  $1 \times 10^7$  м.к./мл, составила 100%.

Результаты клинических испытаний, сводные данные по эффективности (чувствительности и специфичности) наборов реагентов представлены в табл. 1.

На основании полученных данных набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» рекомендован к государственной регистрации в Российской Федерации в качестве медицинского изделия. Проведена экспертиза документов регистрационного досье на МИ, результатов технических и клинических испытаний, представляющих собой формы оценки соответствия МИ по классам в зависимости от потенциального риска их применения, экспертизы качества, эффективности и безопасности МИ в соответствии с Правилами государственной регистрации медицинских изделий, утверждёнными Постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416.

В 2018 г. получено в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения Регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7999 от 29.12.2018 г. и разрешены производство, реализация и применение МИ в медицинской лабораторной практике.

**Заключение.** Внедрение новых диагностических препаратов позволит расширить спектр средств для лабораторной диагностики патогенных буркхольдерий, что даст возможность избежать ложноотрицательных результатов и повысить надёжность анализа. Мультиплексная ПЦР-РВ позволит проводить качественный анализ нескольких возбудителей в одной пробирке и дифференцировать близкородственные виды одновременно, такие как возбудители сапа и мелиоидоза, гибридно-флуоресцентная детекция поможет сократить продолжительность исследования, трудоёмкость анализа и снизить риск контаминации.

Разработанный специалистами ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора набор реагентов «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ» для диагностики *in vitro* сапа и мелиоидоза методом ПЦР-РВ даёт возможность выявлять возбудителей в пробах клинического и биологического материала, культурах микроорганизмов, объектах окружающей среды, твёрдых пищевых продуктах (рис), что позволит в кратчайшие сроки обнаружить и дифференцировать ДНК патогенных буркхольдерий, что важно для установления своевременного и точного диагноза. Использование данного молекулярно-генетического подхода значительно повысит эффективность диагностики заболеваний и выбор тактики лечения, обеспечит своевременное проведение необходимых противоэпидемических мероприятий.

**Благодарности.** Выражаем благодарность сотрудникам ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора: канд.мед.

наук, зав. лаб. мол. диагностики Осиной Н.А., и.о. зав. отд. диагностики инфекционных болезней Портенко С.А.; зав. отд. биологического и технологического контроля Лобовиковой О.А.; зав. отд. стандартизации, качества и метрологии Шульгиной И.В.; науч.сотр. лаб. оперативной диагностики инфекционных болезней Касьян Ж.А. за организацию и проведение испытаний, подтверждающих безопасность и уровень качества медицинского изделия «Амплиген*Burk-mallei/pseudomallei*-РВ».

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

## ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-5, 7, 8 см. REFERENCES)

1. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В., ред. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. 2-е изд. М.: ЗАО Шико; 2013.
2. Топорков А.В., ред. Мелиоидоз и сап. Волгоград: Волга-Пресс; 2016.
6. Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз и сап: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 6: 103-9.
9. Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Антонов В.А. Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения и дифференциации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* методом ПЦР в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 4: 56-9.

## REFERENCES

1. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., eds. Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical guidance [Laboratornaya diagnostika opasnykh infektsionnykh bolezney. Prakticheskoe rukovodstvo]. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Shiko; 2013. (in Russian)
2. Toporkov A.V., ed. Melioidosis and glanders Feder [Meliidoz I sap]. Volgograd: Volga-Press; 2016. (in Russian)
3. Khan I., Wieler L.H., Melzer F., Elschner M.C., Muhammad G., Ali S. et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transboundary and emerging diseases*. 2013; 60 (3): 204-21.
4. Mota R.A., da Fonseca Oliveira A.A., da Silva A.M., Junior J.W., da Silva L.B., de Farias Brito M. et al. Glanders in donkeys (*Equus Asinus*) in the state of pernambuco, Brazil: A case report. *Brazilian journal of microbiology*. 2010; 41 (1): 146-9.
5. Verma A.K., Saminathan M., Tiwari R., Dhama K., Vir Singh S. Glanders- a re-emerging zoonotic disease: A Review. *Journal of Biological Sciences*. 2014; 14: 38-51.
6. Zakharova I. B., Toporkov A. V., Viktorov D. V. Melioidosis and glanders: current state of the problem and topical issues of epidemiological surveillance. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 6: 103-9. (in Russian)
7. Currie B.J. Melioidosis: evolving concepts in epidemiology, pathogenesis, and treatment Seminars in respiratory and critical care medicine. *Thieme Medical Publishers*. 2015; 36 (01): 111-25.
8. Wiersinga W.J., Virk H.S., Torres A.G., Currie B.J., Peacock S.J., Dance D., Limmathurosakul D. Melioidosis. *Nature reviews. Disease primers*. 2018; 4: 17107.
9. Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Development of real time multiplex PCR test-system for detection and differentiation of *B. mallei* and *B. pseudomallei*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; 4: 56-9. (in Russian)

Поступила 26.09.19

Принята к печати 10.10.19

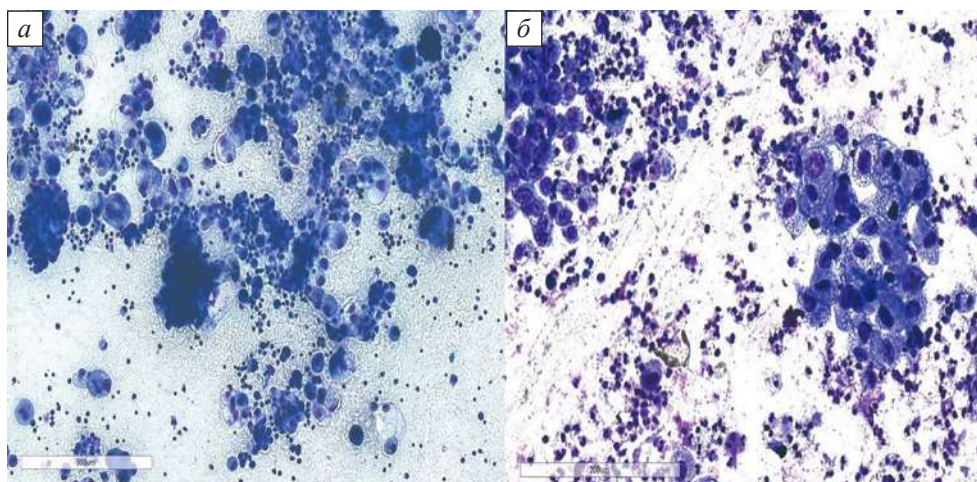


Рис. 3. Цифровой цитопрепарат. *a* – асцитическая жидкость; *б* – промывные воды мочевого пузыря. Сканер Aperio CS2 (Leica, Германия), используемое ув.  $\times 200$ , окрашивание по Романовскому.

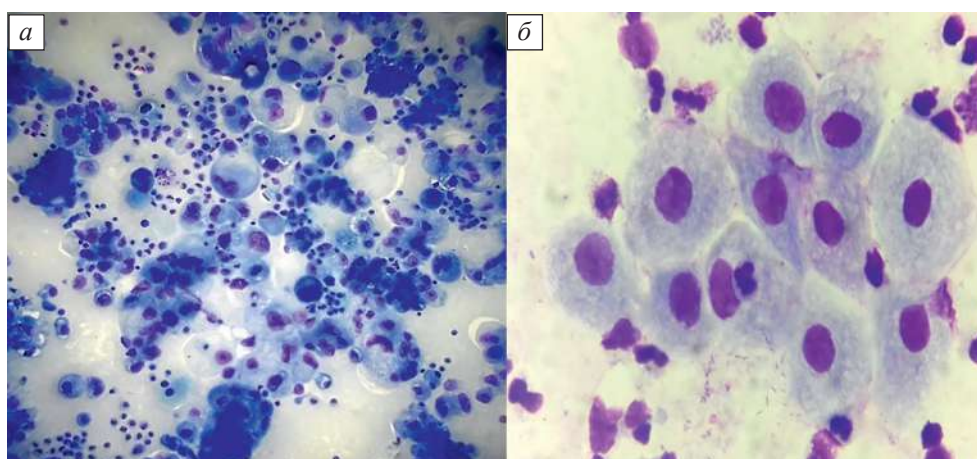


Рис. 4. Классическая микроскопия цитопрепарата. *a* – асцитическая жидкость; *б* – промывные воды мочевого пузыря. Микроскоп Zeiss Primo Star (Carl Zeiss, Германия), ув.  $\times 200$ , окрашивание по Романовскому.

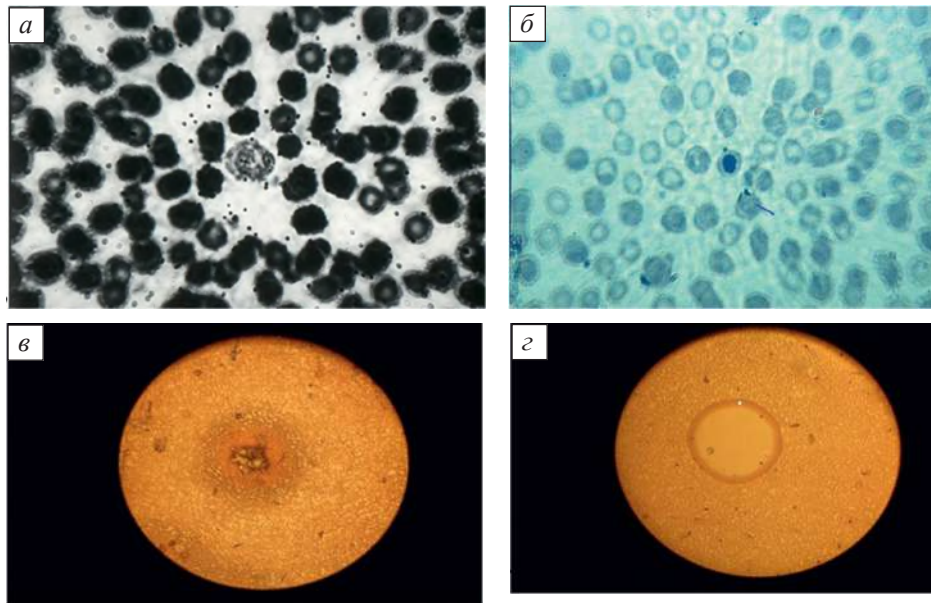


Рис.1. Картина периферической крови больных бронхиальной астмой при педиломикозе в фазе активации педиломикозной инфекции в крови.

а – в поле зрения палочкоядерный нейтрофил и эритроциты, с фиксированными на их клеточных мембранах эндоспорами. В цитоплазме отдельных эритроцитов определяются цитоскелеты грибных клеток. Окраска по Гимзе - Романовскому. х900.

б – в центре эритроцит, в цитоплазме которого определяется грибная клетка, а также эндоспоры, фиксированные к его клеточной мембране и других эритроцитов. Окраска толуидиновым синим. х900.

в – начальная стадия цитолиза: сформирована замкнутая полость с оболочкой из склеенных между собой эритроцитов, внутри которой, среди гемолизированных эритроцитов, наблюдается цитоскелет грибной клетки. Окраска по Гимзе – Романовскому. х400.

г – стадия завершеного цитолиза. Наблюдается полный лизис грибной клетки, гомогенизация и уплотнение стенки полости. Окраска по Гимзе – Романовскому. х400.

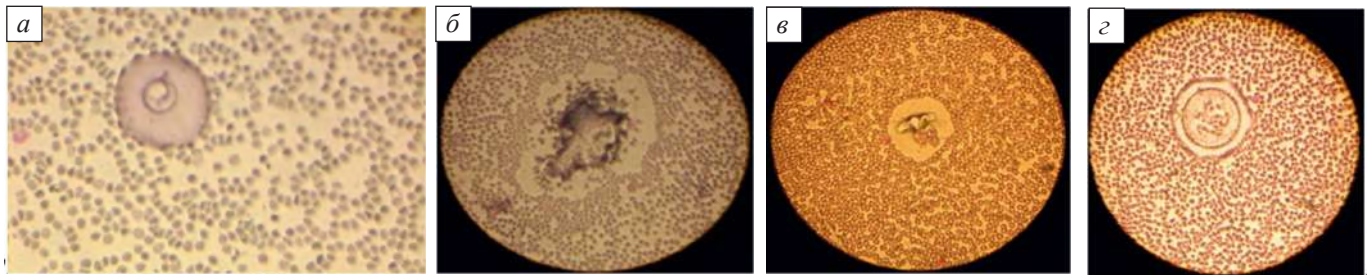


Рис. 2 . Картина периферической крови больных с лейкемией.

а – пациент К., 25 лет. Диагноз: Острый миелобластный лейкоз. В поле зрения тканевая форма плодового тела, вокруг которого идет формирование замкнутой полости в виде кольца цитолиза из эритроцитов. Окраска по Гимзе - Романовскому. х400. б – деталь этого же наблюдения: в поле зрения двойное кольцо из склеенных между собой эритроцитов, вокруг незавершенного лизиса грибной клетки. х400.

в – пациент Х., 30 лет. Диагноз: лейкемоидная реакция эозинофильного типа. В поле зрения кольцо цитолиза из эритроцитов, с заключенными в нем цитоскелетом тканевой формы *P. variotii*. Окраска по Гимзе- Романовскому. х400.

г – деталь этого же наблюдения: вид двойного кольца из склеенных между собой эритроцитов при незавершенном лизисе грибной клетки. х400.

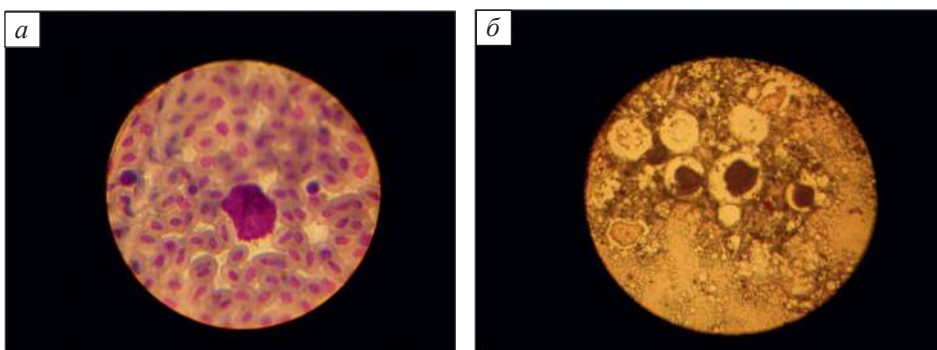


Рис.3. Картина периферической крови 8-дневного куриного эмбриона при экспериментальном заражении частицами мицелия *Paecilomyces variotii*.

а – в поле зрения тканевые клетки *P. variotii* среди эритроцитов. Окраска по Гимзе-Романовскому. х900.

б – кольца цитолиза эритроцитов на разных этапах проявления лизиса грибных клеток. Окраска по Грам-Вейгерту. х400.