

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

2025, том 14, № 3

Восточная  
Европа

Laboratory Diagnostics Eastern Europe

International Scientific Journal

2025 Volume 14 Number 3



Океаническая яшма – редкий камень, добываемый исключительно на Мадагаскаре.

Состоит в основном из диоксида кремния, но также содержит различные минеральные включения, например полевой шпат, которые создают уникальные узоры и придают необычные оттенки.

Месторождения расположены в отдаленных прибрежных районах, доступных только во время отлива, что лишь усиливает редкость и эксклюзивность этого минерала.

ISSN 2226-5392 (Print)  
ISSN 2522-137X (Online)



9 772226 539008



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ  
ИЗДАНИЯ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная  
Европа

International Scientific Journal

## Laboratory Diagnostics Eastern Europe

LABORATORNAYA DIAGNOSTIKA VOSTOCHNAYA EVROPA

lab.recipe.by

2025, том 14, № 3

2025 Volume 14 Number 3

Основан в 2011 г.

Founded in 2011

### Беларусь

### Belarus

#### Журнал зарегистрирован

Министерством информации Республики Беларусь  
2 декабря 2011 г.  
Регистрационное свидетельство № 1496

#### The journal is registered

by the Ministry of information of the Republic of Belarus  
on December 2, 2011  
Registration certificate No. 1496

#### Учредитель

УП «Профессиональные издания»

#### Founder

UE "Professional Editions"

#### Редакция:

Директор Л.А. Евтушенко

Заместитель главного редактора А.В. Жабинский

Руководитель службы рекламы и маркетинга М.А. Коваль

Технический редактор Д.В. Нужин

#### Editorial office:

Director L. Evtushenko

Deputy editor-in-chief A. Zhabinski

Head of advertising and marketing department M. Koval

Technical editor D. Nuzhin

#### Адрес:

220040, Республика Беларусь, г. Минск,  
ул. Богдановича, 112, пом. 1Н, офис 3  
Тел.: +375 17 322-16-59  
e-mail: lab@recipe.by

#### Address:

112 Bogdanovicha st., room 1N, office 3,  
Minsk, 220040, Republic of Belarus  
Phone: +375 17 322-16-59  
e-mail: lab@recipe.by

#### Подписка

В каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь):  
индивидуальный индекс – 01389, ведомственный индекс – 013892

#### Subscription

In the catalog of the Republican unitary enterprise "Belposhta" (Belarus):  
individual index – 01389, departmental index – 013892

В электронных каталогах на сайтах агентств:

ООО «Прессинформ», ООО «Криэтив Сервис Бэнд»,

ООО «Екатеринбург-ОПТ», ООО «Глобалпресс»

In the electronic catalogs on web-sites of agencies:

LLC "Pressinform", LLC "Kriativ Servis Bend",

LLC "Ekaterinburg-OPT", LLC "Globalpress"

Электронная версия журнала доступна на сайте lab.recipe.by,  
в Научной электронной библиотеке elibrary.ru, в базе данных  
East View, в электронной библиотечной системе IPRbooks

The electronic version of the journal is available on lab.recipe.by,  
on the Scientific electronic library elibrary.ru,  
in the East View database, in the electronic library system IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь в редакцию  
Журнал выходит один раз в три месяца  
Цена свободная

Concerning acquisition of the journal address to the editorial office  
The frequency of the journal is 1 time in 3 months  
The price is not fixed

Подписано в печать: 10.09.2025  
Формат 70×100 1/16 (165×240 мм)  
Печать офсетная  
Тираж 1000 экз.  
Заказ №

Sent for the press: 10.09.2025  
Format 70×100 1/16 (165×240 mm)  
Litho  
Circulation is 1000 copies  
Order No.

#### Отпечатано в типографии

Производственное дочернее унитарное предприятие  
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий  
№2/18 от 26.11.2013.  
пл.Свободы, 23, каб 94, г. Минск.  
ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

#### Printed in printing house

© «Лабораторная диагностика Восточная Европа»

Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов  
издания возможно только с обязательной ссылкой на источник.

© УП «Профессиональные издания», 2025

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2025

© "Laboratory Diagnostics Eastern Europe"

Copyright is protected. Any reproduction of materials of the edition  
is possible only with an obligatory reference to the source.

© UE "Professional Editions", 2025

© Design and decor of UE "Professional Editions", 2025

#### Главные редакторы:

**Камышников Владимир Семенович,**  
д.м.н., проф. (Беларусь)

#### Припутневич Татьяна Валерьевна,

чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии  
Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова,  
главный внештатный специалист по медицинской микробиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (Россия)

#### Редакционная коллегия:

Алехнович Л.И., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Алиева Е.В., д.м.н., доц., Центр подготовки медицинских микробиологов Российской медицинской академии непрерывного  
профессионального образования (Москва, Россия)  
Аниско Л.А., к.м.н., Городская клиническая инфекционная больница (Минск, Беларусь)  
Батуревич Л.В., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Беляев С.А., Белорусское общество лабораторной медицины (Минск, Беларусь)  
Вавилова Т.В., д.м.н., проф., Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия)  
Вергун О.М., к.б.н., доц., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)  
Владимирская Т.Э., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Гордеев А.Б., к.б.н., Институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии Национального медицинского  
исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Гусина Н.Б., к.м.н., доц., Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (Минск, Беларусь)  
Державец Л.А., д.б.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)  
Долгов В.В., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)  
Доценко Э.А., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)  
Дубровский А.Ч., к.м.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)  
Иванец Т.Ю., д.м.н., Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Ильина Е.Н., чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Москва, Россия)  
Кафарская Л.И., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)  
Коломиец Н.Д., д.м.н., проф., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Кольцов И.П., к.м.н., доц., Дальневосточный государственный медицинский университет (Хабаровск, Россия)  
Конева Н.Ю., д.б.н., проф., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (Витебск, Беларусь)  
Кочетов А.Г., д.м.н., Российский университет дружбы народов (Москва, Россия)  
Кречетова Л.В., д.м.н., Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии  
и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Кузьменко А.Т., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Лелевич В.В., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)  
Лялюков С.А., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)  
Манаева Н.А., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Новикова И.А., д.м.н., проф., Гомельский государственный медицинский университет (Гомель, Беларусь)  
Потапнев М.П., д.м.н., проф., Республиканский научно-практический центр трансфузиологии  
и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь)  
Прохорова В.И., д.м.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)  
Ребриков Д.В., проф. РАН, д.б.н., проф., Институт трансляционной медицины Национального медицинского  
исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Смолякова Р.М., д.б.н., проф., Минский областной клинический госпиталь инвалидов Великой Отечественной войны  
имени П.М. Машерова (Минск, Беларусь)  
Степаненко И.С., д.м.н., доц., Волгоградский государственный медицинский университет (Волгоград, Россия)  
Таганович А.Д., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)  
Трофимов Д.Ю., чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., Институт репродуктивной генетики Национального медицинского  
исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)

---

#### Рецензируемое издание

Включено в базы данных Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, РИНЦ.

Включено в перечни Высших аттестационных комиссий Республики Беларусь и Российской Федерации.

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.

Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точку зрения автора.

Ответственность за содержание рекламных материалов и публикаций с пометкой «На правах рекламы» несут рекламодатели.

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная  
Европа

International Scientific Journal

## Laboratory Diagnostics Eastern Europe

LABORATORNAYA DIAGNOSTIKA VOSTOCHNAYA EVROPA

lab.recipe-russia.ru

2025, том 14, № 3

2025 Volume 14 Number 3

Основан в 2011 г.

Founded in 2011

### Россия

#### Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 25 августа 2023 г.  
Реестровая запись ПИ № ФС77-85799

#### Учредитель и издатель

ООО «Вилин – Профессиональные издания»

#### Редакция:

Директор А.В. Сакмаров

Главный редактор Т.В. Припутневич

#### Адрес редакции и издателя:

214522, Смоленская обл., Смоленский р-н, с.п. Катынское,  
п. Автoremзавод, д. 1А, пом. 413  
Тел.: +7 4812 515923  
e-mail: lab@recipe.by

#### Подписка

В электронных каталогах на сайтах агентств:  
ООО «Прессинформ», ООО «Кризитив Сервис Бэнд»,  
ООО «Екатеринбург-ОПТ», ООО «Глобалпресс»

Электронная версия журнала доступна на сайте lab.recipe-russia.ru,  
в Научной электронной библиотеке eLibrary.ru, в базе данных  
East View, в электронной библиотечной системе IPRbooks

Подписано в печать: 10.09.2025  
Дата выхода в свет: 22.09.2025  
Формат 70×100 <sup>1</sup>/<sub>16</sub> (165×240 мм)  
Печать офсетная  
Тираж 3000 экз.  
Заказ №  
16+

Журнал выходит один раз в три месяца  
Цена свободная

#### Отпечатано в типографии

Производственное дочернее унитарное предприятие  
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий  
№2/18 от 26.11.2013.  
пл.Свободы, 23, каб 94, г. Минск.  
ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

#### © «Лабораторная диагностика Восточная Европа»

Авторские права защищены.  
Любое воспроизведение материалов издания возможно  
только с обязательной ссылкой на источник.  
© ООО «Вилин – Профессиональные издания», 2025

### Russia

#### The journal is registered

by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media (Roskomnadzor) on August 25, 2023  
Registry entry ПИ No. ФС77-85799

#### Founder and Publisher

LLC "Vilin – Professional Editions"

#### Editorial office:

Director A. Sakmarov

Editor-in-Chief T. Priputnevich

#### Editorial and publisher address:

214522, Smolensk region, Smolensk district,  
rural settlement Katynskoye, Avtoremzavod village, 1A, office 413  
Phone: +7 4812 515923  
e-mail: lab@recipe.by

#### Subscription

In the electronic catalogs on web-sites of agencies:  
LLC "Pressinform", LLC "Kriativ Servis Bend",  
LLC "Ekaterinburg-OPT", LLC "Globalpress"

The electronic version of the journal is available on lab.recipe-russia.ru,  
on the Scientific electronic library eLibrary.ru, in the East View database,  
in the electronic library system IPRbooks

Sent for the press: 10.09.2025  
Release date: 22.09.2025  
Format 70×100 <sup>1</sup>/<sub>16</sub> (165×240 mm)  
Litho  
Circulation is 3000 copies  
Order No.  
16+

The frequency of the journal is 1 time in 3 months  
The price is not fixed

#### Printed in printing house

#### © "Laboratory Diagnostics Eastern Europe"

Copyright is protected.  
Any reproduction of materials of the edition is possible only  
with an obligatory reference to the source.  
© LLC "Vilin – Professional Editions", 2025

**Editors-in-Chief:**

**Vladimir S. Kamyshnikov,**  
Dr. of Med. Sci., Prof. (Belarus)

**Tatiana V. Priputnevich,**

Assoc. of the Russian Academy of Sciences, Dr. of Med. Sci., Prof., Head of the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Head Specialist in Medical Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation (Russia)

**Editorial Board:**

Alekhnovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Alieva E., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Center for Training of Medical Microbiologists of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Moscow, Russia)

Anisko L., Cand. of Med. Sci., City Clinical Infectious Diseases Hospital (Minsk, Belarus)

Baturevich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Beliaev S., Belarusian Society of Laboratory Medicine (Minsk, Belarus)

Derzhavets L., Dr. of Biol. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Dolgov V., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Gordeev A., Cand. of Biol. Sci., Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child" (Minsk, Belarus)

Ilina E., Assoc. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Research Institute for Systems Biology and Medicine of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Moscow, Russia)

Ivanets T., Dr. of Med. Sci., National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Kafarskaya L., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Kochetov A., Dr. of Med. Sci., Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Moscow, Russia)

Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Koltsov I., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Far Eastern State Medical University (Khabarovsk, Russia)

Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (Vitebsk, Belarus)

Krechetova L., Dr. of Med. Sci., National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Manaeva N., Cand. of Biol. Sci., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof., Gomel State Medical University (Gomel, Belarus)

Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof., Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology (Minsk, Belarus)

Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Rebrikov D., Prof. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Institute of Translational Medicine of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof., Minsk Regional Clinical Hospital for Disabled Veterans of the Great Patriotic War named after P.M. Masharov (Minsk, Belarus)

Stepanenko I., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Trofimov D., Assoc. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Institute of Reproductive Genetics of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Vavilova T., Dr. of Med. Sci., Prof., Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia)

Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Vladimirskaia T., Cand. of Biol. Sci., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

---

**Peer-Reviewed Edition**

Included in the databases Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, RSCI.

Included in the lists of the Higher Attestation Commissions of the Republic of Belarus and the Russian Federation.

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.

Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author.

Responsibility for the content of advertising materials and publications with the mark "As advertisement" are advertisers.

Уважаемые читатели!

В выступлении Главы государства, которое касалось деятельности Национальной академии наук Беларуси, было обращено внимание на то, что реализация перспективных направлений научных исследований должна основываться на деятельности сформировавшихся в стране научных школ. К числу таковых с достаточным основанием можно отнести и научно-практическую школу специалистов клинической лабораторной диагностики. Ее становлению во многом способствовала многолетняя практика проведения в обществе врачей лабораторной медицины «Колбовских чтений». В посвященной им статье отражена значимость обсуждения актуальных вопросов клинической лабораторной диагностики для определения (обычно с участием приглашаемых к их проведению коллег из России) дальнейшей стратегии развития лабораторной медицины и деятельности клинико-лабораторной службы, что особенно важно в условиях постоянного совершенствования технологий клинико-лабораторного исследования.

В этом номере журнала, как и в ряде предыдущих, представлены достойные рассмотрения и обсуждения на «Колбовских чтениях» статьи, три из которых носят обзорный характер: две от российских авторов и одна от белорусских. Эти статьи содержат информацию о ключевых технологических достижениях, определивших развитие «быстрой» медицинской микробиологии за последние 10 лет, о современных стратегиях диагностики аутоиммунных заболеваний, а также о Европейском руководстве по анализу мочи, вышедшем в свет в 2023 г.

Одному из приоритетных направлений развития фундаментальных исследований, состоящему в использовании искусственного интеллекта в области биотехнологий, посвящена оригинальная работа, выполненная группой ведущих специалистов из Беларуси и России: «Новые подходы к визуализации клеток глиомы С6 на основе использования методов глубокого обучения алгоритмов нейронных сетей для разработки "умной лабораторной посуды"».

Плодом совместной работы белорусских и российских специалистов стали разработка, апробация и освоение массового производства иммуноферментной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG» для определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е в сыворотке крови людей, что является существенным вкладом в импортозамещение и создание продукции, более совершенной и диагностически надежной, чем прототипная.

Значимым вкладом в методологию совершенствования диагностики и лечения микоплазменной инфекции стала оригинальная работа, выполненная на базе Республиканского клинического медицинского центра Управления делами Президента Республики Беларусь, Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета и Белорусского государственного медицинского



университета, – «Разработка и оценка эффективности использования в лабораторной практике молекулярно-генетических методов одновременного выявления в биологическом материале *Mycoplasma genitalium* и маркеров ее резистентности к макролидам».

Сотрудниками Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета в статье «Клеточный и гуморальный иммунный ответ к компонентам микробиоты у пациентов с болезнью Крона» представлен новый методологический подход к идентификации Т-клеток, эффекторная реакция которых приводит к основному повреждению кишечной ткани, что рекомендуется учитывать при комплексной диагностике этого заболевания.

Весьма перспективным фундаментальным исследованием, имеющим существенное значение для своевременной диагностики и профилактики сердечно-сосудистых нарушений у определенной категории лиц, является выполненная на базе Белорусского государственного медицинского университета работа «Изучение ассоциации полиморфизмов гена рецептора витамина D с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела».

Не может не привлечь внимание практических врачей и прежде всего специалистов в области ортопедии и клинической лабораторной диагностики статья сотрудников Белорусского государственного медицинского университета «Лабораторные критерии диагностики перипротезной инфекции суставов».

Журнал «Лабораторная диагностика Восточная Европа», имея международный статус, отражает развитие лабораторной медицины не только в Беларуси и России, но и в других странах мира. Так, стало традицией опубликование на его страницах ряда оригинальных статей, иллюстрирующих направления клинико-лабораторных исследований и достижения врачей лабораторной медицины в Ираке.

Уделено внимание и аспектам лабораторных работ, осуществляемых на доклиническом этапе исследования. Так, сотрудниками Института физиологии Национальной академии наук Беларуси впервые установлены референтные интервалы показателей морфологического состава крови лабораторных мышей, используемых для моделирования типовых патологических процессов.

Редакционная коллегия надеется, что представленные материалы номера будут востребованы и активно использоваться в практической и научной деятельности специалистов клинической лабораторной службы и врачей-клиницистов.

Главный редактор в Беларуси  
Владимир Семенович Камышников



**Организация деятельности  
клинико-лабораторной службы /  
Подготовка кадров**

*Камышников В.С.*

Колбовские чтения как информационная система становления специальности и службы клинической лабораторной диагностики в Республике Беларусь ..... 359

**Заболевания головного мозга /  
Биоинформационные технологии  
в лабораторной медицине**

*Пашкевич С.Г., Малашин Р.О., Волков А.В.,  
Илюхин Д.А., Ячная В.О., Михалькова М.А.,  
Демина Я.Д., Ксенович Ю.В., Гуринович Т.А.,  
Денисов А.А.*

Новые подходы к визуализации клеток глиомы С6 на основе использования методов глубокого обучения алгоритмов нейронных сетей для разработки «умной лабораторной посуды» ..... 372

**Заболевания органов пищеварения /  
Новые направления клинико-  
лабораторных исследований**

*Нижегородова Д.Б., Назаренко Е.М.,  
Иванчик Г.И., Шулейко А.Ч., Кулинич С.С.,  
Величко А.В., Зафранская М.М.*

Клеточный и гуморальный иммунный ответ к компонентам микробиоты у пациентов с болезнью Крона ..... 383

**Нейроэндокринные расстройства /  
Высокотехнологичные лабораторные  
исследования**

*Асмаа Э. Мохаммед, Абдулелах А. Альмайх,  
Кутайба А. Касим*

Влияние сахарного диабета 2-го типа на некоторые иммунологические показатели (С4, IgA, IgM) ..... 398

**Заболевания сердечно-сосудистой  
системы /**

**Превентивная лабораторная медицина**

*Руденкова Т.В., Костюк С.А.,  
Штонда М.В., Акола Т.В.*

Изучение ассоциации полиморфизмов гена рецептора витамина D с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела ..... 405

**Заболевания органов  
репродуктивной системы /  
Молекулярно-генетические  
исследования**

*Гриневиц Т.Н., Кот М.О.,  
Гладкий М.Л.*

Различия в частотах генотипов и аллелей по полиморфным локусам генов матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 и их ингибиторов TIMP-2 у женщин с привычным невынашиванием беременности и физиологически протекающей гестацией ..... 422

**Заболевания костно-суставной системы /  
Оригинальные исследования**

*Костюк С.А., Лямцева А.К.,  
Полуян О.С., Бенько А.Н.*

Лабораторные критерии диагностики перипротезной инфекции суставов ..... 431

**Клиническая инфектология  
и паразитология /  
Высокотехнологичные лабораторные  
исследования**

*Маджарова О.А., Эйдельштейн И.А.,  
Абельская И.С., Карпов И.А.,  
Романов А.В., Козлов Р.С.*

Разработка и оценка эффективности использования в лабораторной практике молекулярно-генетических методов одновременного выявления в биологическом материале *Mycoplasma genitalium* и маркеров ее резистентности к макролидам ..... 442

**Микробиология и вирусология /  
Новые технологии в лабораторной  
медицине**

*Задора И.С., Жаворонок С.В.,  
Алаторцева Г.И., Щербань А.И.,  
Давыдов В.В., Лухверчик Л.Н.,  
Нестеренко Л.Н., Анисько Л.А.,  
Розачева Т.А., Баюр Н.Г., Щука Н.В.,  
Симирский В.В., Зверев В.В.*

Разработка иммуноферментной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG» для определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E в сыворотке крови людей ..... 455

### **Микробиология и вирусология / Оригинальные исследования**

Турайя Дж. Мезааль, Амир А. Гобан,  
Табарек Р.С. Аль-Мосави, Анаам З.Ш.  
Мохаммед, Эман Н.А. Мутар,  
Длал Р.Дж. Салмин, Халах М. Абд  
Бактериальное загрязнение иракских  
бумажных денежных банкнот,  
находящихся в обращении в Басре ..... 469

### **Коронавирусная инфекция и ее осложнения /**

**Оригинальные исследования**  
Табарек Рабиа Лафта,  
Басим Абдалхуссейн Джаруллах  
Молекулярная идентификация  
SARS-CoV-2 у пациентов  
с сердечно-сосудистыми  
заболеваниями из провинции  
Ти-Кар на юге Ирака ..... 479

### **Доклинические/экспериментальные исследования**

Соболева О.Е., Пашкевич С.Г.  
Референтные значения показателей  
морфологического состава крови  
лабораторных мышей (самок) линии  
ICR/CD-1: методология исследования .... 488

### **Обзоры и лекции**

Жигалова К.Н., Кротова М.М.,  
Денисов П.А.,  
Припутневич Т.В.  
Развитие «быстрой» медицинской  
микробиологии за последние 10 лет:  
обзор ..... 498

Шилейко И.Д., Колядко Н.Н.,  
Калина А.С., Русак А.А.  
Обзор Европейского руководства  
по анализу мочи 2023 года ..... 512

Сыров Г.А., Титилкина А.А.,  
Литвиненко А.Д.,  
Щенникова З.Р.,  
Ильина К.В.  
Современные стратегии диагностики  
аутоиммунных заболеваний:  
обзор литературы ..... 526

**Organization  
of Clinical Laboratory Service Work /  
Personnel Training**  
*Kamyshnikov V.*  
Kolb's Readings as an Informational System  
for Establishing the Specialty of Clinical  
Laboratory Diagnostics and Related Services  
in the Republic of Belarus ..... 360

**Brain Diseases /  
Bioinformatics Technologies  
in Laboratory Medicine**  
*Pashkevich S., Malashin R., Volkov A.,  
Ilyukhin D., Yachnaya V., Mikhalkova M.,  
Dyomina Ya., Ksenevich Y., Gurinovich T.,  
Denisov A.*  
New Approaches for Visualizing C6 Glioma  
Cells Based on the Use of Deep Learning  
Neural Network Algorithms to Design  
"Smart Laboratory Glassware" ..... 373

**Digestive Diseases /  
New Directions of Clinical  
and Laboratory Research**  
*Nizheharodava D., Nazaranka E., Ivanchyk G.,  
Shuleika A., Kulinich S., Vialichka A.,  
Zafranskaya M.*  
Cellular and Humoral Immune Response  
to Microbiota Components in Patients  
with Crohn's Disease ..... 384

**Neuroendocrine Disorders /  
High-Tech Laboratory Research**  
*Asmaa E. Mohammed, Abdulelah A. Almayah,  
Qutaiba A. Qasim*  
The Effect of Type 2 Diabetes Mellitus  
on Some Immunological Parameters  
(C4, IgA, IgM) ..... 397

**Diseases of the Cardiovascular System /  
Preventive Laboratory Medicine**  
*Rudenkova T., Kostiuk S., Shtonda M., Akola T.*  
Study of Vitamin D Receptor Gene  
Polymorphisms Association with  
Cardiovascular Complications Risk  
in Patients with Arterial Hypertension  
and Overweight ..... 406

**Diseases of the Reproductive System /  
Molecular and Genetic Research**  
*Grinevich T., Kot M., Gladky M.*  
Differences in Genotype and Allele  
Polymorphic Loci of MMP-2 and MMP-9  
Matrix Metalloproteinase Genes  
and their Inhibitors TIMP-2 in Women  
with Recurrent Miscarriage  
and Physiologically Proceeding  
Gestation ..... 423

**Diseases of the Musculoskeletal System /  
Original Research**  
*Kostiuk S., Lyamtseva A., Poluyan O., Benko A.*  
Laboratory Criteria for Diagnosing  
Periprosthetic Joint Infection ..... 432

**Clinical Infectology and Parasitology /  
High-Tech Laboratory Research**  
*Majarova O., Eidelstein I., Abelskaya I.,  
Karpov I., Romanov A., Kozlov R.*  
Elaborating Molecular Genetic Methods  
for Simultaneous Detection of Mycoplasma  
genitalium and Markers of Its Resistance  
to Macrolides in Biological Material  
and Evaluating Their Effectiveness  
in Laboratory Practice ..... 443

**Microbiology and Virology /  
New Technologies in Laboratory Medicine**  
*Zadora I., Zhavoronok S., Alatortseva G.,  
Shcherban A., Davydov V., Lukhverchik L.,  
Nesterenko L., Anisko L., Rogacheva T., Baur N.,  
Shchuka N., Simirsky V., Zverev V.*  
Developing an Immunoenzymatic Test  
System "ELISA-anti- HEV IgG" to Determine  
Class G Immunoglobulins against Hepatitis E  
Virus in Human Blood Serum ..... 457

**Microbiology and Virology /  
Original Research**  
*Thuraya J. Mezaal, Amir A. Goban, Tabarek R.S.  
Al-Mosawi, Anaam Z.S. Mohammed,  
Eman N.A. Mutar, Dlal R.J. Salmin,  
Halah M. Abd*  
Bacterial Contamination of the Circulating  
Iraqi Paper Currency Note in Basrah ..... 468

### Coronavirus Infection and Its Complications / Original Research

*Tabarek Rabeea Lafta,  
Basim Abdalhussein Jarullah*  
Molecular Identification  
of SARS-CoV-2 in Patients  
with Heart Diseases in Thi-Qar Province,  
South of Iraq ..... 478

### Preclinical/Experimental Research

*Soboleva O., Pashkevich S.*  
Reference Values for Hematological  
Parameters in Female ICR/CD-1  
Laboratory Mice:  
Study Methodology ..... 489

### Reviews and Lectures

*Zhigalova K., Krotova M., Denisov P.,  
Priputnevich T.*  
Development of "Fast" Medical  
Microbiology over the Past 10 Years:  
A Review ..... 499

*Shileiko I., Kaliadka N., Kalina A., Rusak A.*  
Review of the EFLM European Urinalysis  
Guidelines 2023 ..... 513

*Syrov G., Titilkina A., Litvinenko A.,  
Shchennikova Z., Ilina K.*  
Contemporary Strategies for Diagnosing  
Autoimmune Diseases:  
A Literature Review ..... 527

<https://doi.org/10.34883/PL.2025.14.3.016>



Камышников В.С.  
Минск, Беларусь

## Колбовские чтения как информационная система становления специальности и службы клинической лабораторной диагностики в Республике Беларусь

**Конфликт интересов:** не заявлен.

Подана: 04.05.2025  
Принята: 21.08.2025  
Контакты: kam-prof@mail.ru

### Резюме

В статье отражен вклад профессора В.Г. Колба и созданного им коллектива преподавателей первой в республике кафедры клинической лабораторной диагностики в формировании информационной базы, способствующей становлению специальности, научной школы и службы клинической лабораторной диагностики в советский и постсоветский периоды времени. Она представлена в многочисленных печатных (книжных) изданиях, авторами которых являются профессор В.Г. Колб и представители основанной им научно-педагогической школы клинической лабораторной диагностики.

Отражено влияние изменений социально-экономических условий в стране, научно-технического прогресса и основанных на директивах руководства министерств здравоохранения СССР, БССР и Республики Беларусь организационных решений, касающихся дальнейшего развития клинико-лабораторной службы в Советском Союзе и отдельно взятой республике, на формирование информационной базы специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Констатировано, что своеобразной трибуной для раскрытия материалов формируемой информационной базы специальности и службы клинической лабораторной диагностики явились организация курсов повышения квалификации специалистов клинической лабораторной диагностики в системе дополнительного (постдипломного) образования врачей, проведение республиканских пленумов, конференций, съездов, конгрессов и опубликование научных статей, касающихся организации деятельности клинической лабораторной службы, в периодической печати, в том числе в выходящем в свет с 2012 г. международном научно-практическом журнале «Лабораторная диагностика Восточная Европа».

Отмечена и значимость постоянного участия в Колбовских чтениях ведущих специалистов лабораторной медицины из России и других стран содружества для выработки дальнейшей стратегии развития клинической лабораторной диагностики и клинико-лабораторной службы.

**Ключевые слова:** Колбовские чтения, кафедра, клиническая лабораторная диагностика, клиническая лабораторная служба, информационная база, печатные издания, методология и технология исследований, клиническая аналитика, клинико-лабораторная информатика, деятельность профессора В.Г. Колба

Kamyschnikov V.  
Minsk, Belarus

## Kolb's Readings as an Informational System for Establishing the Specialty of Clinical Laboratory Diagnostics and Related Services in the Republic of Belarus

**Conflict of interest:** nothing to declare.

Submitted: 04.05.2025  
Accepted: 21.08.2025  
Contacts: kam-prof@mail.ru

---

### Abstract

The article is devoted to the contribution of Professor V.Kolb and the team of teachers of the first department of clinical laboratory diagnostics in the Republic he built in creating the informational base that helped establishing the specialty, scientific school, and services of clinical laboratory diagnostics in the Soviet and post-Soviet periods. It is presented in numerous printed editions (books) authored by Professor V.Kolb and representatives of the scientific and pedagogical school of clinical laboratory diagnostics he founded.

The impact of changes in the country's social and economic conditions, scientific and technological progress, and organizational decisions based on directives of the Ministry of Health of the USSR, the BSSR, and the Republic of Belarus concerning the further development of clinical laboratory services in the Soviet Union and in the Republic, on the formation of the informational basis for the specialty of "Clinical Laboratory Diagnostics" is reflected. It was stated that a unique platform for disclosing materials from the newly created informational base of the specialty and service of clinical laboratory diagnostics were the organization of advanced training courses for clinical laboratory diagnostics specialists within the system of additional (postgraduate) education for medical professionals, republican plenary sessions, conferences, congresses, and publishing scientific articles concerning the organization of clinical laboratory services in periodicals, including the international scientific and practical journal "Laboratory Diagnostics Eastern Europe", which was launched in 2012.

The importance of the ongoing participation of leading laboratory medicine specialists from Russia and other CIS countries in the Kolb's Readings for working out a further strategy for clinical laboratory diagnostics and clinical laboratory services advancement was also emphasized.

**Keywords:** Kolb's Readings, department, clinical laboratory diagnostics, clinical laboratory service, information base, printed publications, research methodology and technology, clinical analytics, clinical laboratory informatics, activities of Professor V. Kolb

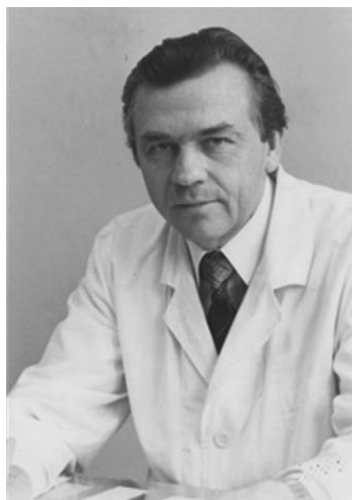
---

На одном из состоявшихся в 2016 г. заседаний республиканского общества клинической лабораторной диагностики его участниками было предложено включить в практику деятельности клинико-лабораторной службы осуществление миссии



«Колбовские чтения» для информирования врачей лабораторной медицины о современных достижениях в области клинической лабораторной диагностики, о проблемах, выдвигаемых перед ней многочисленными отраслями клинической медицины, и о возможных путях их решения.

В связи с этим в течение последних 10 лет такие чтения неоднократно проводились в Гомельском государственном медицинском университете и ряде других медицинских учреждений науки и образования. Само название чтений невольно обращает внимание на те информационные материалы, которые были подготовлены и изданы профессорско-преподавательским составом созданной в 1970 г. в Белорусском государственном институте усовершенствования врачей новой по профилю подготовки профессиональных кадров кафедры – клинической лабораторной диагностики, возглавляемой на протяжении первых 29 лет ее деятельности профессором Владимиром Гавриловичем Колбом, приобретшим ко времени ее открытия достаточно большой опыт организационной деятельности в качестве главного внештатного врача-лаборанта (с января 1967 г.) Министерства здравоохранения БССР. Во многом благодаря этому, а также десятилетней деятельности (по окончании аспирантуры при кафедре биохимии Минского государственного медицинского института) в качестве заведующего биохимической лабораторией Института туберкулеза Министерства здравоохранения БССР, в функцию которого входило кураторство над работой клинико-диагностических лабораторий всей сети лечебно-профилактических учреждений противотуберкулезной службы республики, при формировании образовательного процесса по новой для системы последипломной подготовки врачей того времени специальности особое внимание было уделено вопросам организации деятельности национальной клинико-лабораторной службы и научно-практического общества врачей-лаборантов, устав которого был принят делегатами состоявшейся 3 декабря 1968 г. в г. Минске Республиканской учредительной конференции врачей-лаборантов [1–6].

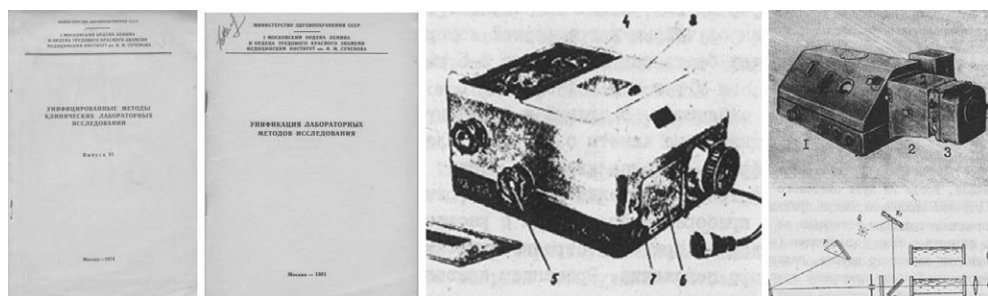


**Рис. 1. Заслуженный деятель науки профессор В.Г. Колб**  
**Fig. 1. Honored Scientist Professor V.G. Kolb**

Становление информационной базы осуществления клинико-лабораторных исследований в советский период времени базировалось на реализации предусмотренных приказом Министерства здравоохранения СССР № 63 от 25.01.1968 «О мерах по дальнейшему развитию и совершенствованию лабораторной клинико-диагностической службы в СССР» требований к становлению специальности, организации деятельности клинико-лабораторной службы и системы последипломной подготовки специалистов клинической лабораторной диагностики путем создания соответствующих кафедр во всех 18 институтах усовершенствования врачей СССР.

В соответствии с этим приказом на протяжении первых 30 лет деятельности кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ обучение врачей-лаборантов было направлено на освоение технологий выполнения унифицированных методов исследования, предложенных Всесоюзным научно-методическим и контрольным центром по лабораторному делу (ВНМКЦЛД) и подлежащих обязательному применению во всех клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений поликлинического и стационарного звена, что было регламентировано соответствующими приказами Министерства здравоохранения СССР. Сама же процедура выполнения каждого из унифицированных методов исследования, включающая приготовление реагентов на рабочих местах лаборатории и регистрацию оптической плотности фотометрируемого раствора на поставляемых в Беларусь из России фотоэлектроколориметрах, излагалась в материалах отдельных изданий Министерства здравоохранения СССР (рис. 2).

Унификация лабораторных методов исследования преследовала цель осуществления стандартизации и обеспечения преемственности в лабораторном исследовании пациентов в системе «поликлиника – стационар». Это было необходимо для того, чтобы исключить повторное выполнение лабораторных исследований



**Рис. 2. Материалы изданий с описанием выполнения унифицированных методов исследования, разработанных Всесоюзным научно-методическим и контрольным центром по лабораторному делу и утвержденных соответствующими приказами Министра здравоохранения СССР (в том числе приказами от 11/IV 1972 г., 15/X 1974 г. и 21/XI 1979 г.), и образцы фотометрического оборудования, использовавшегося для регистрации оптической плотности растворов: фотоэлектроколориметр ФЭК-60, спектрофотометр СФ-4**

**Fig. 2. Materials of publications describing the implementation of unified research methods developed by the All-Union Scientific, Methodological and Control Center for Laboratory Science and approved by the relevant orders of the USSR Minister of Health (including orders of April 11, 1972, October 15, 1974 and November 21, 1979) and samples of photometric equipment used to record the optical density of solutions: FEK-60 photoelectrocolorimeter, SF-4 spectrophotometer**

в случае, если таковые были ранее осуществлены в прикрепленной к стационару поликлинике методами, отличающимися от используемых в больничном учреждении.

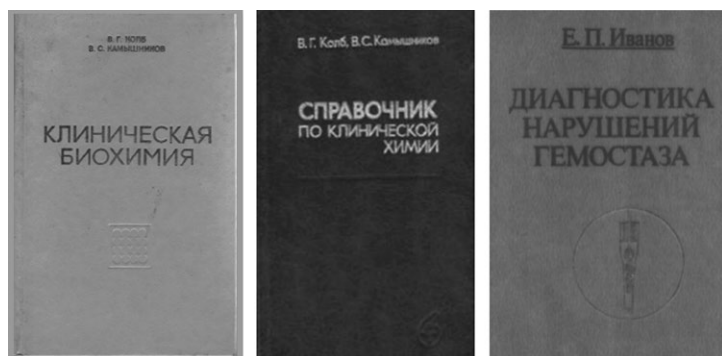
В период с 1971 по 1974 г. решению первоочередной задачи – освоению унифицированных методов исследования врачами-лаборантами республики во многом способствовало издание преподавателями кафедры (В.Г. Колб и В.С. Камышников) 5 выпусков методических указаний по использованию свойственных тому периоду времени технологий клинико-лабораторного исследования.

Материал этих пособий подлежал использованию для обучения врачей-лаборантов в ходе проведения на кафедре циклов специализации – С (продолжительностью 4,0–4,5 мес.) и тематического усовершенствования (ТУ), занимавших обычно 2,5–3 мес. Методические указания охватывали курс «Введение в клиническую химию» с изложением в первой части этого раздела основ атомно-молекулярного учения и неорганической химии с акцентуацией внимания на классификации неорганических соединений, сведений о типах химических реакций, характеристике химических реактивов, методах дополнительной их очистки, технике взвешивания, в том числе на весах для очень точного взвешивания (Методические указания. Ч. 1. 1972), а во второй части указанного раздела (Методические указания. Ч. 2. 1973) – представлений о растворах, их классификации, технике приготовления реактивов из кристаллогидратов и концентрированных растворов кислот, сведений о правилах взятия биологического материала и подготовке его к исследованию; о весовом, объемном анализе, методах оксидиметрии, осаждения, комплексообразования. В нем был представлен материал и о специальных методах исследования – иммуноэлектрофорезе, хроматографии, кондуктометрии, потенциометрии, вольтамперометрии и полярографии, абсорбционной фотометрии, рефрактометрии, поляриметрии, флюориметрии (Методические указания. Ч. 2. 1973). Большое внимание уделено также устройству фотометрического оборудования и технике работы на использовавшихся в тот период времени фотоэлектроколориметрах (тип ФЭК-М, ФЭК-Н-57, ФЭК-56, ФЭК-60, МКМФ-1, КМ-1).

Три других выпуска «Методических указаний» были посвящены оценке метаболического статуса пациента с использованием биохимических методов анализа, а именно: исследованию белкового (Методические указания. 1971), углеводного, липидного и пигментного обменов (Методические указания. 1972), состояния гормонально-медиаторного звена организма (Методические указания. 1974), в том числе с применением апробированных авторами «ординарных» и унифицированных (на тот период времени) методов исследования.

Начиная с 1976 г. для выполнения в клинико-диагностических лабораториях Белоруссии и России унифицированных методов исследования стал достаточно широко использоваться материал изданных профессором В.Г. Колбом, доцентом В.С. Камышниковым, профессором Е.П. Ивановым 3 руководств по клинической лабораторной диагностике: 2 – по клинической химии (В.Г. Колб, В.С. Камышников) и 1 – по гемостазиологии (Е.П. Иванов) (рис. 3).

Общий тираж вышедших в свет 2 книг по клинической химии – «Клиническая биохимия» (Минск: Беларусь, 1976), «Справочник по клинической химии» (Минск: Беларусь, 1982) составил 72 000 экз., а пособия для врачей по гемостазиологии «Диагностика нарушений гемостаза» (Минск: Беларусь, 1983. 222 с.: ил.) – 12 000 экз.



**Рис. 3. Пособия по клинической биохимии и гемостазиологии для врачей-лаборантов, изданные в начальном периоде становления процесса образовательной деятельности на кафедре**  
**Fig. 3. Manuals on clinical biochemistry and hemostasis for laboratory doctors, published in the initial period of the formation of the educational process at the department**

В этих изданиях нашел отражение опыт их авторов по использованию унифицированных и других методов исследования, а также трактовке полученных с их применением результатов. Достаточно большой тираж указанных книг способствовал тому, что вскоре после выхода в свет они стали достоянием широкого контингента врачей-лаборантов не только Белоруссии, но и России и других союзных республик СССР, тем более что на базе кафедры Белорусского государственного института усовершенствования врачей (БелГИУВ), относящегося к системе Министерства здравоохранения СССР, в советский период времени обучались специалисты из различных регионов Советского Союза.

Ознакомление врачей-лаборантов республики с материалом этих книг стало первым шагом к становлению информационной базы Колбовских чтений. Существенный вклад в ее формирование был внесен заведующим кафедрой профессором В.Г. Колбом, взявшим в основном на себя чтение курса лекций слушателям циклов специализации по различным аспектам клинической патофизиологии и клинической аналитике, как то: физиология и патология белкового, углеводного, липидного, пигментного и других видов обмена.

В советский период времени – с 1968 г. до происшедшего в 1991 г. распада СССР – выполняемые в стране клиничко-лабораторные исследования относились в основном к 3 главным разделам специальности «клиническая лабораторная диагностика» (КЛД), а именно: клинической биохимии, лабораторной гематологии и общеклиническим методам исследования. При этом перечень составляющих эти области специальности «клиническая лабораторная диагностика» методов исследования был утвержден соответствующими распоряжениями Министерства здравоохранения СССР.

Сложившаяся в советский период времени ситуация в корне изменилась с приобретением Республикой Беларусь самостоятельности – суверенитета. Так, уже в самом начальном периоде его становления в стране были аккредитованы представительства многих иностранных фирм – поставщиков высокотехнологичного автоматизированного оборудования для выполнения биохимических, гематологических,



иммунологических и других видов лабораторного исследования с использованием соответствующей типу прибора реагентной базы.

В связи с изменением методологии и технологии клиничко-лабораторных исследований наступил и новый этап в образовательной и информационной деятельности кафедры, связанный с переходом от использования унифицированных методов исследования (для постановки которых требовалось приготовление реактивов из исходных сухих веществ в условиях самой клиничко-диагностической лаборатории) к применению уже готовых, сертифицированных наборов реагентов, предоставляемых специализированными торговыми организациями и предназначенными в основном к применению на высокотехнологичном автоматизированном оборудовании для выполнения клиничко-лабораторных исследований.

Использование в клиничко-диагностических лабораториях значительно более совершенной технологической базы лабораторного исследования привело к существенному расширению спектра используемых в клиничко-диагностических лабораториях видов клиничко-лабораторного анализа, ставшего включать в себя также технологии автоматизированной оценки морфологического состава крови, молекулярно-генетический, сатурационный (иммуноферментный, иммунофлуоресцентный), ионометрический анализ, методы оценки кислотно-основного состояния организма, бактериологического, вирусологического, серологические исследования и некоторые другие.

А это, а свою очередь, привело к расширению перечня областей специальности «клиничко-лабораторная диагностика», ставшего включать в себя, наряду с химико-микроскопическим анализом (общеклиническими видами исследования), клиничко-биохимией и лабораторной гематологией, клиничко-цитологию, генетику, клиничко-иммунологию, клиничко-микробиологию, клиничко-паразитологию, химико-токсикологический анализ и ряд других субдисциплин специальности «клиничко-лабораторная диагностика» (рис. 3).



**Рис. 4. «Дерево» с представленными на нем отдельными субдисциплинами специальности «клиничко-лабораторная диагностика» (логотип состоявшегося в Белоруссии VIII съезда врачей лабораторной медицины)**

**Fig. 4. "Tree" with individual subdisciplines of the specialty "Clinical Laboratory Diagnostics" presented in it (logo of the 8th Congress of Laboratory Medicine Physicians held in Belarus)**

Возникшая в силу состоявшегося научно-технического прогресса настоятельная необходимость в освоении специалистами клинической лабораторной диагностики новых технологий клинко-лабораторного исследования явилась мотивом к совершенствованию программы образовательной и информационной деятельности профессорско-преподавательским составом единственной на тот период времени (вплоть до конца 90-х гг. прошлого столетия) кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ, для реализации которого, в свою очередь, требовались подготовка и издание соответствующих данной специальности отечественных руководств по лабораторной медицине.

С учетом этого обстоятельства по заказу Министерства образования Республики Беларусь сотрудниками кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ были изданы учебники «Техника лабораторных работ», «Техника лабораторных работ в медицинской практике» и «Методы клинических лабораторных исследований».

Особое внимание было уделено не только существенно изменившимся по сравнению с использовавшимися в советский период времени методологическим и методическим аспектам лабораторного исследования, но и клинко-лабораторной информатике, во многом представленной в подготовленных профессорско-преподавательским составом кафедры учебных и справочных пособиях для работников среднего медицинского звена (фельдшеров-лаборантов), студентов медицинских университетов и врачей, проходящих обучение в учреждениях системы дополнительного (постдипломного) образования. Среди них допущенные Министерством образования Республики Беларусь учебные пособия «Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней», «Клиническая лабораторная диагностика соматических заболеваний», «Лабораторная диагностика в клинической практике врача», «Клинко-лабораторная диагностика употребления психоактивных веществ» (Белоруссия, Минск) и многие другие, включая изданные в Российской Федерации учебные пособия, в числе которых «Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований)» (рис. 4).

Содержанием изданных профессорско-преподавательским составом базовой кафедры клинической лабораторной диагностики в советский и постсоветский периоды времени книг охвачены основные разделы специальности «клиническая



**Рис. 5. Учебные пособия для врачей лабораторной медицины, допущенные Министерством образования Республики Беларусь**

**Fig. 5. Textbooks for laboratory medicine doctors approved by the Ministry of Education of the Republic of Belarus**



лабораторная диагностика», относящиеся к клинической аналитике (высокотехнологичному методическому арсеналу, обеспечивающему доступ к изучению различных компонентов биологического материала), клинической патофизиологии (составляющей теоретический базис, позволяющий осмыслить патогенетическую значимость обнаруживаемых в организме метаболических изменений) и клинико-лабораторной информатике (концептуальному аппарату оценки диагностической значимости обнаруживаемых метаболических изменений) (см. таблицу).

Таким образом, в результате многолетней образовательной, информационной, редакционно-издательской и организационно-методической деятельности сотрудников первой открытой в БелГИУВ в 1970 г. кафедры клинической лабораторной диагностики во многом была создана требуемая информационная база для подготовки как врачей клинической лабораторной диагностики, так и врачей-клиницистов разного профиля (в том числе врачей общей практики, терапевтов, кардиологов, онкологов, гепатологов, нефрологов, урологов, акушеров-гинекологов и др.) в области лабораторной медицины [7, 8].

К настоящему времени созданная с участием профессорско-преподавательского состава кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ (БелМАПО) информационная база специальности и системы организации деятельности службы клинической лабораторной диагностики существенно дополнена соответствующей профилю деятельности ее специалистов литературой, изданной профессорско-преподавательским составом кафедр и курсов, открытых (начиная с 1995 г.) на базе Гродненского, Витебского и Гомельского государственных медицинских университетов, а также сотрудниками республиканских научно-практических центров (РНПЦ) и других научных и образовательных учреждений.

С начала 2012 г. информационной базой научно-практических и организационных достижений в области клинической лабораторной диагностики стал международный (вначале белорусско-украинский, затем – белорусско-российский) научно-практический журнал «Лабораторная диагностика Восточная Европа», включенный в том числе в международную базу Scopus и являющийся источником фундаментальных и клинических знаний для врачей лабораторной медицины. В течение последующего 13-летнего периода на его страницах опубликовано множество статей белорусских, украинских, российских авторов, а также представителей ряда других стран, отражающих оригинальные исследования в областях клинической биохимии, коагулологии, иммунологии, микробиологии, паразитологии, токсикологии, судебной медицины, общеклинических исследований; схемы и алгоритмы лабораторных исследований, результаты испытаний новых технологий и методов анализа, лабораторного оборудования и наборов реагентов.

Международный научно-практический журнал «Лабораторная диагностика Восточная Европа» явился своеобразной трибуной для обсуждения основных направлений дальнейшего развития специальности и деятельности службы клинической лабораторной диагностики, включающих вопросы ее организационной структуры, контроля качества, стандартизации, автоматизации и информатизации клинических лабораторных исследований.

Материал изданных профессорско-преподавательским составом базовой, относящейся к системе последипломного образования врачей кафедры книг (общим тиражом более 218 000 экземпляров), отдельные из которых претерпели ряд (до 11)

**Основные разделы специальности «клиническая лабораторная диагностика», представленные в материале книжных изданий, авторами которых явились представители профессорско-преподавательского состава первой кафедры клинической лабораторной диагностики, возглавленной профессором В.Г. Колбом**

**Main sections of the specialty "Clinical laboratory diagnostics" presented in the material of book publications, the authors of which were representatives of the teaching staff of the first department of clinical laboratory diagnostics, headed by Professor V.G. Kolb**

| <b>I. Клиническая аналитика</b>                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I. Техника выполнения процедур лабораторного исследования   | <p>Камышников В.С. Техника лабораторных работ: учебник: допущен Министерством образования Республики Беларусь. Минск: Белорусская наука, 2001. 286 с.</p> <p>Камышников В.С. Техника лабораторных работ в медицинской практике. Москва: МЕДпресс-информ, 2011. 336 с.; 2013. 334 с.; 2016. 344 с. (4-е изд., перераб. и доп.).</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| II. Методология и методы клиничко-лабораторных исследований | <p>Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. 311 с.</p> <p>Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. 366 с.</p> <p>Иванов Е.П. Диагностика нарушений гемостаза: практическое пособие для врача. Минск: Беларусь, 1983. 222 с.</p> <p>Иванов Е.П. Руководство по гемостазиологии. Минск: Беларусь, 1991. 302 с.</p> <p>Чиж А.С., Пилотович В.С., Колб В.Г. Методы исследования в нефрологии и урологии. Минск: Вышэйш. шк., 1992. 415 с.: ил.</p> <p>Камышников В.С., Волотовская О.А., Ходюкова А.Б., Дальнова Т.С., Василиу-Светлицкая С.Г., Зубовская Е.Т., Алехнович Л.И. Методы клинических лабораторных исследований: учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь / под ред. проф. В.С. Камышникова. Минск: Белорусская наука, 2001. 695 с.; 2002. 775 с.</p> <p>Камышников В.С., Волотовская О.А., Ходюкова А.Б., Дальнова Т.С., Василиу-Светлицкая С.Г., Зубовская Е.Т., Алехнович Л.И. Методы клинических лабораторных исследований: учебное пособие / под ред. проф. В.С. Камышникова. Москва: МЕДпресс-информ, 2009. 752 с. (3-е изд.); 2011. 752 с. (4-е изд.); 2013 (5-е изд.); 2015 (6-е изд.); 2018 (9-е изд.); 2020 (10-е изд.).</p> <p>Камышников В.С., Алехнович Л.И., Василиу-Светлицкая С.Г., Дальнова Т.С., Ходюкова А.Б., Зубовская Е.Т., Кузьменко А.Т., Кохнович Н.Н., Степанова Ю.И., Батуревич Л.В. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) / под ред. проф. В.С. Камышникова. Москва: МЕДпресс-информ, 2015. 720 с. (1-е изд.); 2017. 720 с. (2-е изд.); 2020. 720 с. (3-е изд.); 2023. 720 с. (4-е изд.).</p> <p>Камышников В.С. Справочник по клиничко-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т. 1. Минск: Беларусь, 2000. 496 с.: ил.</p> <p>Камышников В.С. Справочник по клиничко-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т. 2. Минск: Беларусь, 2000. 463 с.: ил.</p> <p>Камышников В.С. Клиничко-биохимическая лабораторная диагностика: справочник: в 2 т. Минск: Интерпрессервис. Оформление: Книжный дом. Т. 1. 2003. 495 с.: ил.</p> <p>Камышников В.С. Клиничко-биохимическая лабораторная диагностика: справочник: в 2 т. Минск: Интерпрессервис. Оформление: Книжный дом. Т. 2. 200. 463 с.: ил.</p> <p>Камышников В.С. Справочник по клиничко-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с. (2-е изд., перераб. и доп.); 2009. 889 с. (3-е изд.).</p> <p>Камышников В.С., Козарезова Т.И., Климович Н.Н., Степанова Ю.И., Алехнович Л.И., Козарезов С.Н. Гемостазиология в клинической и лабораторной практике: учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь / под ред. проф. В.С. Камышникова. Минск: Образование и воспитание, 2011. 320 с.: ил.</p> |

Окончание таблицы

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>II. Клиническая патобиология и клинико-лабораторная информатика</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <p>Колб В.Г., Камышников В.С. Лабораторная диагностика хирургических заболеваний: справочное пособие. Минск: Вышэйш. шк., 1999. 185 с.: ил.</p> <p>Камышников В.С. Лабораторная диагностика внутренних и хирургических болезней: учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь. Минск: Образование и воспитание, 2012. 584 с.: ил.</p> <p>Камышников В.С. Клиническая лабораторная диагностика соматических заболеваний: учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь. Минск: Образование и воспитание, 2014. 464 с.</p> <p>Камышников В.С. Лабораторная диагностика в клинической практике врача: учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь. Минск: Образование и воспитание, 2018. 464 с.</p> <p>Лабораторная диагностика сердечно-сосудистых заболеваний:</p> <p>Камышников В.С., Алехнович Л.И., Кузьменко А.Т. Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца: учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь / под ред. проф. В.С. Камышникова. Минск: Образование и воспитание, 2009. 152 с.</p> <p>Камышников В.С., Алехнович Л.И., Кузьменко А.Т. Лабораторная диагностика ишемической болезни сердца (предикторы осложнений и мониторинг метаболических нарушений): учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь / под ред. проф. В.С. Камышникова. Минск: Образование и воспитание, 2015. 360 с.</p> <p>Лабораторная диагностика онкологических заболеваний:</p> <p>Камышников В.С. Онкомаркеры: методы определения, референтные значения, интерпретация тестов. Москва: МЕДпресс-информ, 2011. 128 с.; 2015. 128 с. (5-е изд.); 2019. 128 с. (6-е изд.); 2021. 128 с. (7-е изд.).</p> <p>Лабораторная диагностика форм патологии гепатобилиарной системы:</p> <p>Камышников В.С. Клинико-лабораторная диагностика заболеваний печени. Москва: МЕДпресс-информ, 2013. 96 с. (1-е изд.); 2014. 96 с. (2-е изд.); 2018. 96 с. (3-е изд.).</p> <p>Лабораторная диагностика в акушерстве и гинекологии:</p> <p>Камышников В.С., Денежкина Н.В. Лабораторная диагностика в акушерстве и гинекологии. Москва: МЕДпресс-информ, 2021. 300 с.</p> <p>Лабораторная диагностика в наркологии:</p> <p>Камышников В.С., Шилейко И.Д., Чубуков А.М., Кузьменко А.Т., Статкевич Д.А. Клинико-лабораторная диагностика употребления психоактивных веществ: учебное пособие: допущено Министерством образования Республики Беларусь / под ред. проф. В.С. Камышникова. Минск: Образование и воспитание, 2016. 376 с.: ил.</p> |
| <b>III. Врачу-клиницисту: справочная литература по клинической лабораторной диагностике</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <p>Карманный справочник по диагностическим тестам / под общей ред. проф. В.С. Камышникова. Москва: МЕДпресс-информ, 2004. 464 с.</p> <p>Диана Николь, Стивен Дж. Макфи, Мишель Пиньон, Чуани Марк Лу. Более 350 тестов. Немедленные ответы на ваши вопросы: справочник по диагностическим тестам / под общ. ред. проф. В.С. Камышникова. Москва: МЕДпресс-информ, 2009. 560 с. (1-е изд.); 2011. 560 с. (2-е изд.).</p> <p>Камышников В.С. Норма в лабораторной медицине: справочник. Москва: МЕДпресс-информ, 2014. 336 с.</p> <p>Чиркин А.А., Доценко Э.А., Камышников В.С., Улащик В.С., Костин Г.М., Козловская С.П., Чиркина А.А., Нехайчик Е.Н., Васильева Н.Н., Сидо А.А. Физиологические значения лабораторных тестов у населения Республики Беларусь: справочное пособие для медицинских работников / под ред. проф. В.С. Улащика. Минск: Образование и воспитание, 2010. 88 с.</p> <p>Камышников В.С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили: справочное пособие. Москва: МЕДпресс-информ, 2005. 320 с.; 2014. 320 с. (5-е изд.).</p> <p>Карманный справочник врача по лабораторной диагностике. Москва: МЕДпресс-информ, 2002. 463 с.; 2007. 400 с.; 2008. 400 с.; 2011. 400 с.; 2012. 400 с.; 2013. 400 с.; 2020. 400 с.; 2025. 400 с.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>IV. Популярная литература по клинико-лабораторной диагностике для представителей населения, не имеющих специального (медицинского) образования</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>Камышников В.С. О чем говорят медицинские анализы: справочное пособие. Минск: Белорусская наука, 1997. 180 с.; 1998. 180 с.</p> <p>Камышников В.С. О чем говорят медицинские анализы: справочное пособие. Москва: МЕДпресс-информ, 2009. 224 с.; 2013. 304 с.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>V. Информационный материал о становлении лабораторной медицины в Республике Беларусь</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <p>Камышников В.С. Становление лабораторной медицины в Республике Беларусь (история создания профессиональной и научной школы специалистов в области клинической лабораторной диагностики (1920–2020)). Минск: БелМАПО, 2021. 177 с.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |

переизданий в Российской Федерации, вместе с публикуемой в международном научно-практическом журнале «Лабораторная диагностика Восточная Европа» и других периодических изданиях информацией составил потенциально значимую информационную базу для ее использования при проведения Колбовских чтений.

На характере этих чтений сказалось и то, что в Республике Беларусь лабораторная медицина развивалась на платформе сложившихся в советский период времени тесных творческих связей специалистов клинической лабораторной диагностики Белоруссии и России. И такая традиция сохранилась после распада СССР, о чем свидетельствует, в частности, издание многих руководств белорусских ученых в центральных и других книжных издательствах России, а также использование в клинической лабораторной службе достижений российских коллег. Сохранилась и практика совместного участия ведущих специалистов лабораторной медицины в выполнении научных исследований, решении вопросов организации деятельности службы клинической лабораторной диагностики на проводимых в России и Белоруссии форумах: конференциях, съездах и конгрессах. Так, успешно выполняются совместные научно-исследовательские работы с участием сотрудников учреждений науки и образования России и Белоруссии, касающиеся в том числе создания оригинальных наборов реагентов для определения антител к возбудителям вирусных и иных заболеваний.

Все более широко выполняются совместные исследования в рамках программ Союзного государства (Белоруссия – Россия).

Таким образом, профессорско-преподавательским составом коллектива созданной при участии профессора В.Г. Колба кафедры клинической лабораторной диагностики БелГИУВ (БелМАПО) за весь период ее более полувековой деятельности был внесен существенный вклад в формирование фундаментальной информационной базы, составившей теоретическую основу для выбора актуальных направлений дальнейшего развития специальности «клиническая лабораторная диагностика» в условиях постоянно происходящего совершенствования методологии клинко-лабораторного исследования, связанного с использованием в ряде случаев принципиально новой материально-технической базы для его осуществления.

На процессе организации клинко-лабораторной службы в советский период времени существенно сказалась деятельность профессора В.Г. Колба и как члена Президиума Всесоюзного научно-практического общества врачей-лаборантов, его участие во всех проводимых на союзном и международном уровнях мероприятиях, а также в работе Белорусского отделения Всесоюзного биохимического общества.

В.Г. Колб являлся неременным и активным участником практически всех мероприятий союзного значения, проводившихся кафедрой клинической лабораторной диагностики Центрального ордена Ленина института усовершенствования врачей (ЦОЛИУВ), Всесоюзного научно-методического и контрольного центра по лабораторному делу (ВНМКЦЛД) и Всесоюзного научно-практического общества врачей-лаборантов.

К этому следует добавить и значимость деятельности профессора В.Г. Колба как главного внештатного специалиста по клинической лабораторной службе в период с 1968 по 1995 г. и как куратора (научного руководителя) деятельности Республиканского организационно-методического и контрольного центра по лабораторному делу (РОМКЦЛД) (как юридического звена системы Министерства здравоохранения БССР), активно действовавшего в период с 1968 по 1993 г.

Проведение Колбовских чтений приобрело и большое символическое значение как знак признания первого талантливому организатора национальной клинико-лабораторной службы в Республике Беларусь за внесенный им существенный вклад в развитие в стране лабораторной медицины, что, в частности, было ярко проиллюстрировано в ходе проведения в 2023 г. Колбовских чтений на базе Гомельского государственного медицинского университета, посвященных 25-летию созданного в ГомГМУ медико-диагностического факультета.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kolb V.G. Development of clinical biochemistry in Belarus. *Healthcare of Belarus*. 1979;1:7–8. (in Russian)
2. Kolb V.G. Clinical biochemistry and its development in the BSSR. *Laboratory Business*. 1982;12:10(714)–13(717). (in Russian)
3. Kolb V.G. Achievements and prospects for the development of the clinical diagnostic laboratory service of the BSSR. *Healthcare of Belarus*. 1981;48–51. (in Russian)
4. Kolb V.G. Development of clinical diagnostic laboratory service in Belarus. *Healthcare of Belarus*. 1982;12:32–34. (in Russian)
5. Kolb V.G. I Republican Congress of Laboratory Doctors of Belarus. *Laboratory Business*. 1976;2:121–122. (in Russian)
6. Kolb V.G. Decisions of the 1st All-Union Congress of Laboratory Physicians. *Laboratory Business*. 1973;9:571–574. (in Russian)
7. Kamyshnikov V.S. Formation of laboratory medicine in the Republic of Belarus, and contribution to its development of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (on the 50th anniversary of the department). *Laboratory Diagnostics Eastern Europe*. 2020;9(1–2): 9–31. (in Russian)
8. Kamyshnikov V.S. *Formation of laboratory medicine in the Republic of Belarus (history of the creation of a professional and scientific school of specialists in the field of clinical laboratory diagnostics (1920–2020))*. Minsk: BelMAPO; 2021. 177 p. (in Russian)



Пашкевич С.Г.<sup>1</sup>✉, Малашин Р.О.<sup>2</sup>, Волков А.В.<sup>1</sup>, Илюхин Д.А.<sup>2</sup>, Ячная В.О.<sup>2</sup>,  
Михалькова М.А.<sup>2</sup>, Демина Я.Д.<sup>1</sup>, Ксенович Ю.В.<sup>1</sup>, Гуринович Т.А.<sup>3</sup>, Денисов А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Институт физиологии имени И.П. Павлова Российской академии наук,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Научно-практический центр ЛОТИОС, Минск, Беларусь

## Новые подходы к визуализации клеток глиомы С6 на основе использования методов глубокого обучения алгоритмов нейронных сетей для разработки «умной лабораторной посуды»

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** концепция и дизайн исследования, редактирование, обработка, написание текста – Пашкевич С.Г.; концепция и дизайн исследования, редактирование, написание текста – Малашин Р.О.; сбор материала, обработка и подготовка графического материала, оформление рисунков – Волков А.В.; сбор материала – Демина Я.Д.; сбор материала – Ксенович Ю.В.; сбор материала, обработка и подготовка графического материала, оформление рисунков – Илюхин Д.А.; сбор материала, обработка и подготовка графического материала, оформление рисунков – Ячная В.О.; расчеты показателей, редактирование – Михалькова М.А.; сбор материала – Гуринович Т.А.; редактирование, написание текста – Денисов А.А.

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке гранта Санкт-Петербургского научного фонда (№ 23-РБ-05-24) и гранта ГНТ-БРФФИ «Детекция опухолевых клеток нервной ткани с применением методов глубокого обучения» (№ M24СП6F-010).

Подана: 03.03.2025

Принята: 09.07.2025

Контакты: skypasht@mail.ru

### Резюме

**Введение.** Разработка нового технологического пространства для обеспечения полной автоматизации культуральных исследований предусматривает не только роботизированные манипуляторы, но и адаптацию алгоритмов искусственного интеллекта распознавания живых объектов для создания «умной лабораторной посуды». Для обучения алгоритмов искусственных нейронных сетей сформирована база данных при анализировании микрофотографий, полученных с использованием стандартизированных методов фазово-контрастной микроскопии. Разработан алгоритм глубокого обучения. Результаты исследования открывают перспективу использования полученных данных в качестве эталона, весьма необходимого в ходе осуществления детекции с применением сенсорных поверхностей.

**Цель.** На основе прижизненных изображений культуры глиомы С6 сформировать базу данных и с применением алгоритмов искусственного интеллекта детектировать на сенсорных поверхностях клетки глиомы С6.

**Материалы и методы.** Перевиваемые глиальные клетки С6 (ATCC CCL-107) культивировали в стандартных условиях и получали микрофотографии через 24 или 48 часов после начала культивирования.

**Результаты.** Сегментация клеток культуры глиомы С6 выполнена вручную и в полуавтоматическом режиме. Разработаны методы глубокого обучения для прижизненной детекции клеток. Точность определения составила не менее 90%.



**Заключение.** Впервые предпринята попытка прижизненной детекции культуры клеток глиомы C6 через 24 и 48 часов после размещения в чашке Петри. Установлены критерии, позволяющие выявить основные классы клеток и отличить их от артефактов. Полученные данные найдут применение для верификации алгоритмов распознавания клеток, культивируемых на сенсорных поверхностях, а также для создания инструментов новой технологии «умной лабораторной посуды».

**Ключевые слова:** культура глиомы C6, пролиферация, глубокое обучение, сегментация, фазово-контрастная микроскопия, «умная лабораторная посуда»

Pashkevich S.<sup>1</sup>✉, Malashin R.<sup>2</sup>, Volkov A.<sup>1</sup>, Ilyukhin D.<sup>2</sup>, Yachnaya V.<sup>2</sup>, Mikhalkova M.<sup>2</sup>, Dyomina Ya.<sup>2</sup>, Ksenevich Y.<sup>2</sup>, Gurinovich T.<sup>3</sup>, Denisov A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Scientific and Practical Center LOTIOS, Minsk, Belarus

## New Approaches for Visualizing C6 Glioma Cells Based on the Use of Deep Learning Neural Network Algorithms to Design "Smart Laboratory Glassware"

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** study concept and design, editing, processing, text writing – Pashkevich S.; study concept and design, editing, text writing – Malashin R.; material collection, processing and visualizing – Volkov A.; material collection – Dyomina Ya.; material collection – Ksenevich Y.; material collection, processing and visualizing – Ilyukhin D.; material collection, processing and visualizing – Yachnaya V.; calculations of indicators, editing – Mikhalkova M.; material collection – Gurinovich T.; editing, text writing – Denisov A.

**Funding:** the work was carried out with the financial support of a grant from the Saint Petersburg Science Foundation (No. 23-PB-05-24) and the grant from the State Committee on Science and Technology – Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research "Detection of tumor cells of nervous tissue using deep learning methods" (No. M24SPbS-010).

Submitted: 03.03.2025

Accepted: 09.07.2025

Contacts: skypasht@mail.ru

### Abstract

**Introduction.** Designing a new technological space for ensuring fully automated cultural investigations involves not only robotic manipulators, but also adapting artificial intelligence algorithms for recognizing living objects to create "smart laboratory glassware". The database of microphotographs obtained using standardized methods of phase-contrast microscopy was created for training artificial neural network algorithms. A deep learning algorithm was built. The data obtained are necessary as a benchmark in detection methods using sensor surfaces.

**Purpose.** To form a database on the basis of lifetime images of C6 glioma culture and to detect C6 glioma cells using artificial intelligence algorithms.

**Materials and methods.** Transfected C6 glial cells (ATCC CCL-107) were cultured under the recommended conditions and micrographs were obtained 24 or 48 hours after the start of culturing.

**Results.** Segmentation of C6 glioma cell culture was performed manually and semi-automatically. Deep learning methods were designed for lifetime cell detection. The detection accuracy was at least 90%.

**Conclusion.** For the first time an attempt was made to perform lifetime detection of C6 glioma cell culture 24 and 48 hours after placement in a Petri dish. Criteria and major cell classes were identified to distinguish cells from debris and other artifacts, including light glare. The data will be used to verify algorithms for recognizing cells cultured on sensor surfaces to create tools for new "smart laboratory glassware" technology.

**Keywords:** C6 glioma culture, proliferation, deep learning, segmentation, phase-contrast microscopy, smart laboratory glassware

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Клетки культуры глиомы C6 используют для биомоделирования в экспериментальной нейроонкологии с целью изучения влияния потенциальных цитостатических или цитотоксических средств и апробации их терапевтической эффективности при химио- и иммунотерапии, антиангиогенной, генной, фотодинамической, лучевой терапии [1–6].

Применяемые в настоящее время методы детекции опухолевых клеток нервной ткани основаны на анализе изображений зафиксированного биопсийного материала. Однако для диагностики, предсказания развития опухолевых процессов и разработки методов противоопухолевой терапии целесообразно не только своевременно выявлять патологию, но и оценивать динамику ее развития. Различные подходы прижизненной визуализации в определенной степени приближают, но не позволяют получить такие сведения. В базах данных открытого доступа размещены фотографии низкого качества, в поле зрения которых представлены единичные клетки, как правило, сферической формы (например, на ресурсе [github.com: maxKudi/Cell-Dataset/?tab=readme-ov-file](https://github.com/maxKudi/Cell-Dataset/?tab=readme-ov-file)). Низкое разрешение в пикселях имеют такие базы данных, как LiveCell (520×704); CellPose (256×256); OmniPose (512×512), при этом в полях зрения на фазово-контрастных микрофотографиях присутствуют единичные клетки [7, 8]. Адаптация инструментов, основанных на алгоритмах искусственного интеллекта из открытого доступа, требует экспертной оценки и организации этапов ручной обработки изображений.

Для автоматизации необходимы принципиально новые решения. Одним из таких явилось обоснование нового направления, получившего известность как «умная лабораторная посуда». Этот термин впервые появился в связи с внедрением в исследования микроэлектродных матриц, которые стали называть «умные» чашки Петри. Они обеспечили быстрое сравнение ионных/фармакологических/генетических результатов исследований, а также скрининг соединений путем неинвазивного мониторинга спонтанной и вызванной нейронной электрической активности [9]. В настоящее время многие исследователи для культивирования клеток на чашках Петри применяют новые технологии нанесения полимерных термочувствительных слоев [10] и др.

Таким образом, формируется новое направление – «умная лабораторная посуда», хотя именно этот термин до настоящего времени исследователями не применялся. В данной публикации он предложен впервые.



Ориентируясь на использование этой технологии и опережая ее развитие, мы предполагаем ее продуктивность и пользу не только для научных, но и практических приложений. Применительно к решению поставленных задач подложки, на которых происходит процесс роста и дифференцировки культур клеток, должны представлять сенсорные поверхности, интегрирующие информацию о количестве, форме и других характеристиках отдельных живых клеток. Эти технологии позволяют без риска контаминации определять многие показатели, требующие в настоящее время рутинного ручного труда и экспертной оценки. Новые подходы открывают также возможность распознавать живые клетки в гидрогелях, формирующих трехмерные условия.

Таким образом, создание с применением технологий «умной лабораторной посуды» базы данных изображений культуры глиомы С6 и аннотирование этих изображений является основой нового инструмента диагностики и прогноза развития форм патологии центральной нервной системы. Использование таких подходов позволит не вмешиваться в процессы роста и развития культур клеток, отслеживать целевые терапевтические воздействия, фиксируя не только итог, но и динамику, эффективность лечения и к тому же экономить ресурсы на диагностических маркерах.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основе прижизненных изображений культуры глиомы С6 сформировать базу данных и с применением алгоритмов искусственного интеллекта детектировать на сенсорных поверхностях клетки глиомы С6.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для разработки новейших способов детекции как монослоя, так и отдельных клеток выполнена экспертная оценка с применением традиционных методов фазово-контрастной микроскопии и осуществлены сеансы обучения искусственной нейронной сети распознаванию прижизненных изображений.

Для формирования обучающей выборки использовали перевиваемые глиальные клетки С6 (ATCC CCL-107) крысы *Rattus norvegicus* [11]. При культивировании эти клетки достаточно быстро закрепляются на поверхности культуральной посуды, формируют монослой.

Клеточную линию культивировали с изначальной концентрацией  $2 \times 10^5$  клеток/мл в культуральных флаконах в 5 мл среды F-12K с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки и  $10^{-4}$  г/мл раствора сульфата гентамицина. Флаконы размещали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 5%  $\text{CO}_2$  и температуре 37 °C.

Изображения получали с помощью микроскопа BestScope BS-2092 с установленной цифровой камерой TourCam UCMOS05100KPA на увеличениях  $\times 10$  и  $\times 20$  через 24 и 48 часов после высевания суспензии клеток. Морфометрические параметры оценивали по изображениям, полученным для каждой серии (по 10 флаконов) на различных стадиях культивирования. В процессе развития клеточных культур оценивали следующие морфометрические параметры: продольный и поперечный размеры, диаметр ядра и длины отростков. Аннотирование изображений проводили с использованием веб-приложений Computer Vision Annotation Tool (CVAT) в ручном

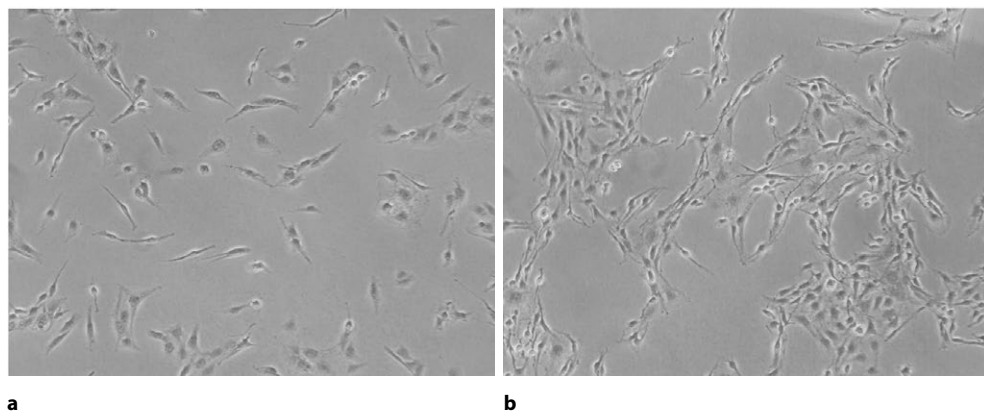
и полуавтоматическом режимах; автоматическое распознавание проводили с использованием нейросетевой модели компьютерного зрения – Segment Anything Model (SAM, по открытой лицензии Apache 2.0).

Для исследования сегментации клеток были апробированы разные модели: YOLOv11, CellPose, MediaFormer, MedSAM и CellSeg1. Поскольку ни одна из этих моделей не продемонстрировала надежных результатов, то выполняли преднастройку моделей на обучающей части из созданной нами базы данных. Осуществлено обучение этих моделей для выделения (сегментации) клеток по выделенным трем типам. Качество сегментации проводили в метрике DiceScore. Обучение всех моделей на нашей базе данных проводили в течение 300 эпох. Такое число было обосновано предварительной оценкой изменения функции потерь, позволившей достигать стабильной сходимости без признаков недообучения. Для контроля переобучения применяли метод ранней остановки через мониторинг функции потерь на валидационной выборке. Для тренировочной, валидационной и тестовой работы выборки формировали случайным образом в соотношении 15, 5 и 10 соответственно. Исходное разрешение созданной базы данных составило 2592×1952 пикселя.

Статистический анализ проводили в программе Statistica 10.0, устанавливали средние значения (Mean), стандартные отклонения (SD).

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование базы данных прижизненных микрофотографий культуры клеток глиомы С6 на 24 и 48 ч., качество и контраст которых делает возможным обучить нейронную сеть детектировать количество элементов, исключая артефакты, позволило отобрать не менее 30 фотографий по каждому разделу (рис. 1). Опыт выполнения исследований показал, что для уточнения количества клеток, особенностей их пролиферации необходимо извлекать чашки Петри из инкубатора и просматривать вручную.



**Рис. 1. Фазово-контрастное изображение клеток глиомы С6 через 24 часа (а) и 48 часов (б) культивирования**

**Fig. 1. Phase-contrast images of C6 glioma cells after 24 hours (a) and 48 hours (b) of cultivation**



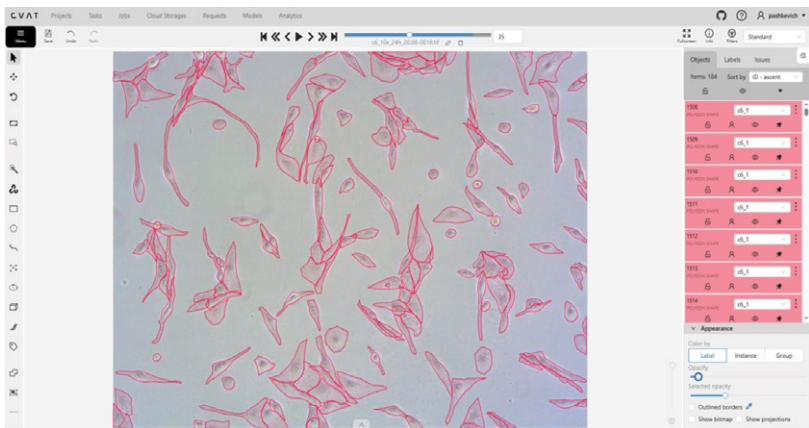
**Морфометрические параметры клеток глиомы С6 в зависимости от времени культивирования**  
**Morphometric parameters of C6 glioma cells as a function of culturing time**

| Параметр               | 24 ч.    | 48 ч.    |
|------------------------|----------|----------|
| Продольный размер, мкм | 21,2±0,7 | 20,3±0,8 |
| Поперечный размер, мкм | 9,0±0,4  | 8,4±0,5  |
| Диаметр ядра, мкм      | 4,2±0,2  | 4,1±0,3  |
| Длина отростков, мкм   | 14,8±0,7 | 16,9±0,6 |

Рутинные методы исследования, предоставляющие экспертную оценку, являются достаточно валидными при условии соответствия условий культивирования требованиям паспорта культуры и качества самого биологического материала. При анализе морфометрических показателей клеток глиомы С6 получены объективные данные, которые соответствуют требованиям, указанным в паспорте. Морфометрические данные суммировали в таблице.

Форма и размер клеток – необходимые критерии их распознавания с применением алгоритмов искусственного интеллекта. Прижизненные микрофотографии (n=120) были подвергнуты ручной обработке с выделением элементов клеток (рис. 2). Аннотирование данных осуществлено с помощью веб-инструмента CVAT, который предоставляет возможности для создания высококачественных разметок, необходимых для обучения и тестирования моделей машинного обучения [12]. Данный инструмент имеет открытый доступ и был разработан российским коллективом для компании Intel.

Для полностью ручной сегментации в CVAT в качестве инструмента применяли многоугольник, точки расставляли по краям объекта. Это позволило получить достаточно приближенную к естественным контурам клетки маску. Для полуавтоматической сегментации применили интеграцию программного пакета OpenCV в CVAT,



**Рис. 2. Интерфейс веб-инструмента Computer Vision Annotation Tool (CVAT) с примером аннотации микрофотографии культуры глиомы С6**  
**Fig. 2. Computer Vision Annotation Tool (CVAT) web interface with an example of annotation of a C6 glioma culture microphotographs**

что позволило отмечать меньшее число точек на границе клетки, самостоятельно достраивая маску.

Сегментацию изображений производили по образцам. При таком подходе определили не только класс объекта на изображении, но и выделили пиксели, принадлежащие каждому конкретному экземпляру (образцу) объекта. Подобная подготовка разметки не противоречила возможному использованию базы данных для задач бинарной классификации. Данный подход оказался перспективным и для применения на сенсорных поверхностях «умной лабораторной посуды».

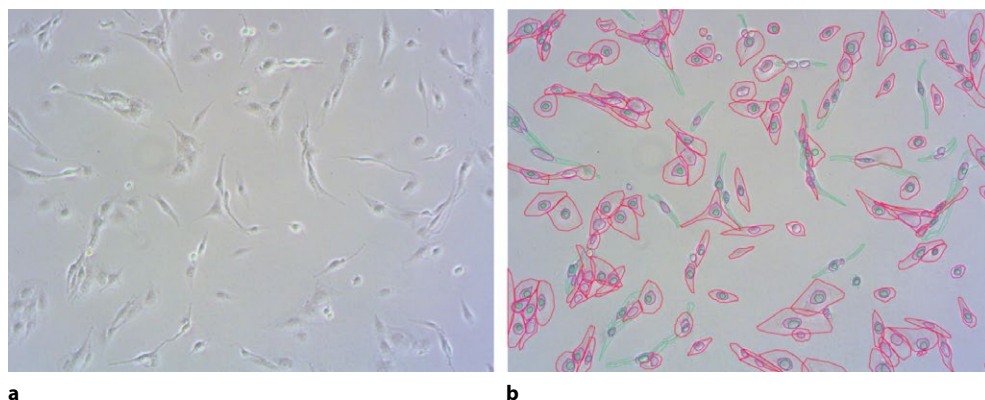
На рис. 3 приведены микрофотографии клеток культуры глиомы С6, размеченные по классам (клетка, ядро) с применением веб-инструмента CVAT при их ручной сегментации.

Для аннотации сложных по морфологии клеток оказалось более целесообразным применение полностью ручной сегментации, так как при полуавтоматическом методе наблюдали ошибки выделения границ. При выделении клеток с более простой формой, без отростков использовали полуавтоматический метод.

Еще одной проблемой, приводящей к неправильной интерпретации изображений при обучении искусственной нейронной сети, является нарушение баланса белого цвета, пример которого приведен на рис. 4.

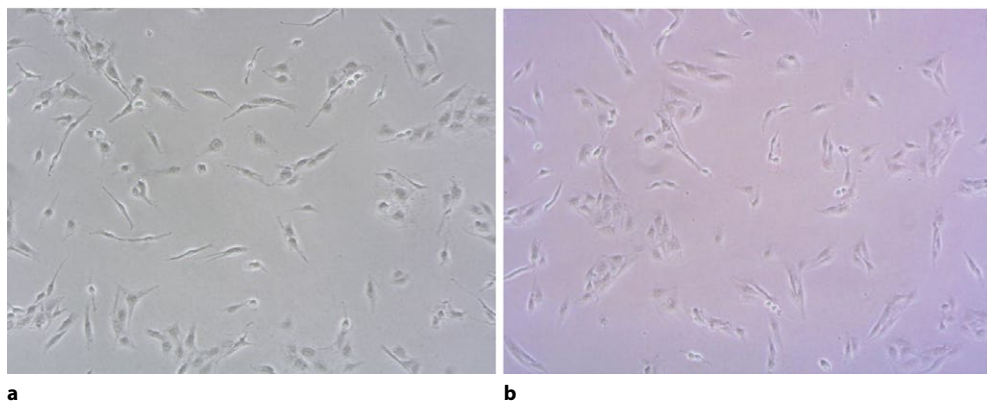
Формирование базы данных из микрофотографий, соответствующих необходимым критериям, удобным для распознавания алгоритмами, является весомым вкладом в снижение числа ошибок.

Ручной метод сегментации хоть и является времязатратным процессом, но при этом остается самым точным. Полуавтоматический метод сегментации с использованием OpenCV позволил ускорить работу, однако при анализировании с его применением сложных изображений также наблюдались ошибки. Ручная сегментация и новая нейросетевая модель компьютерного зрения – SAM [13] – продемонстрировали результаты, наиболее близкие к реальным изображениям живых клеток.



**Рис. 3. Микрофотографии культуры глиомы С6 через 24 часа от начала культивирования: фазово-контрастное изображение (а) и пример семантической маски фазово-контрастного изображения (б)**

**Fig. 3. Microphotographs of a C6 glioma culture 24 hours from the start of cultivation: phase-contrast image (a) and example of a semantic mask phase-contrast image (b)**



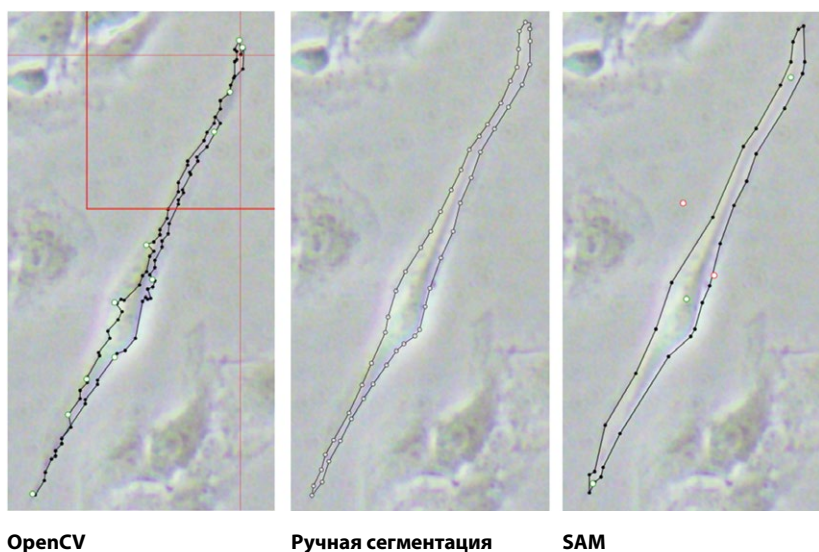
**а**

**б**

**Рис. 4. Микрофотографии культуры глиомы С6: а) фазово-контрастное изображение без артефактов, б) фазово-контрастное изображение с нарушением баланса белого цвета**  
**Fig. 4. Microphotographs of C6 glioma culture: a) phase-contrast image without artifacts, b) phase-contrast image with white balance disturbance**

Для алгоритмов распознавания применение базовых моделей сегментации изображений требует значительного количества необходимых обучающих данных, которые в настоящее время отсутствуют онлайн. Базы данных клеточных культур из открытого доступа [7, 8] стали основой для сопоставления и предобучения нейронной сети.

Поскольку особенностью выполненного исследования явилось изучение живых объектов в водной среде, то мы столкнулись с тем, что до настоящего времени



**OpenCV**

**Ручная сегментация**

**SAM**

**Рис. 5. Микрофотографии клеток культуры глиомы С6 при разных способах сегментации**  
**Fig. 5. Microphotographs of C6 glioma culture cells at different segmentation methods**

не были разработаны математические модели, их программные или аппаратные воплощения, построенные по принципу организации биологических нейронных сетей. Базу данных сформировали для последовательной работы с нейросетью. Этот процесс включал следующие этапы:

- 1) подготовка базы данных;
- 2) выбор/создание архитектуры нейросети;
- 3) обучение;
- 4) тестирование;
- 5) использование и внедрение.

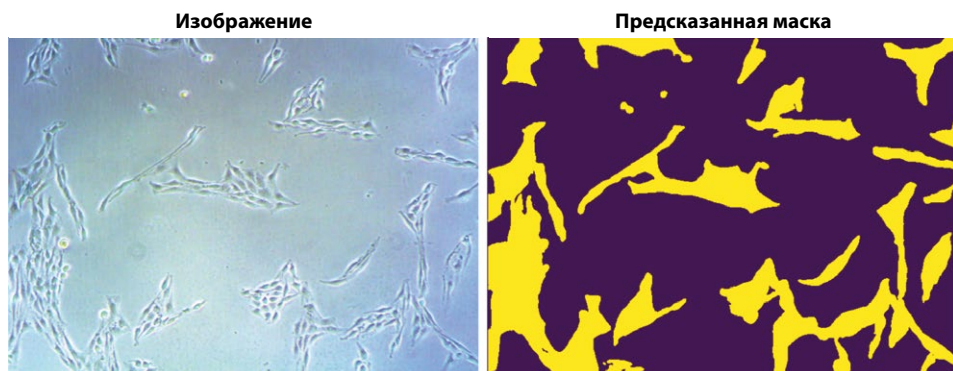
Для решения задач сегментации выбрана нейросетевая модель на основе архитектуры U-Net [14], которая изначально и создавалась для сегментации биомедицинских изображений. Данная обученная нейросеть позволяет анализировать изображения культуры глиомы С6 за короткий промежуток времени, выдавая в результате не только число живых или мертвых клеток на изображении, но также их морфометрические параметры, такие как: поперечный и продольный размеры клетки и ее площадь, количество ядер.

При выполнении исследований обосновано применение моделей глубокого обучения, на их основе реализован алгоритм определения количественной информации о клетках и ядрах на изображениях, а также их местоположении. В качестве веб-сервера для маршрутизации запросов использована библиотека FastAPI для языка Python, пользовательский интерфейс приложения реализован на языке JavaScript с привлечением библиотеки ReactJs для данного языка.

Архитектура U-Net позволила реализовать стандартный подход в построении нейронных сетей для сегментации изображений, заключающийся в применении так называемых сетей с кодировщиком и декодировщиком. Для повышения эффективности модели на целевых данных стала возможна их модификация. Например, использование более сложных архитектур в качестве кодирующей части, таких как ResNet или VGG (U-Net-MiT-B3 или U-Net-VGG19). Оценивали метрики в DiceScore<sup>AV</sup> ( $\chi$ , 2592p), где в качестве  $\chi$  использовали разрешение, которое доступно в нашей базе данных. В данном подходе с применением архитектуры U-Net-VGG19 (полностью сверточная нейронная сеть) удалось достичь максимального значения метрики (0,907). То есть маска оказалась достаточно близкой к оригиналу (рис. 6).

На основе базы данных создан алгоритм, который позволяет распознавать другие типы клеток. Он может быть адаптирован для детекции с помощью сенсорных поверхностей благодаря обучению на микрофотографиях, полученных в режиме фазового контраста.

Сформированная база данных включает набор фазово-контрастных фотографий культуры клеток глиомы С6 крысиной, полученных через 24 и 48 часов после начала культивирования в стандартных условиях. В полях зрения отчетливо различимы группы клеток, особенности их распределения и закрепления к поверхности лабораторной посуды или находящихся в водной среде. Фотографии получены с использованием объективов микроскопа  $\times 10$  и  $\times 20$ . Ко всем фотографиям выполнено аннотирование. Для хранения микрофотографий не требуется большого объема памяти. Они имеют большое количество параметров и демонстрируют широкие возможности обобщения на небольших наборах данных. Для каждой фотографии из созданной базы есть выполненная экспертами маска. Маска включает распределение



**Рис. 6. Сопоставление микрофотографий клеток глиомы С6, полученных в фазово-контрастном режиме (изображение). Результаты бинарной сегментации на неразмеченном изображении (предсказанная маска)**

**Fig. 6. Comparison micrographs of C6 glioma cells obtained in phase-contrast mode (image). Binary segmentation results on an unlabeled image (predicted mask)**

на три класса: 1) распластанная клетка; 2) вытянутая клетка; 3) ядро клетки – и позволяет продолжить классификацию для повышения качества исследований.

Таким образом, достижение высокого качества фотоматериала, позволяющего выполнить более четкую аннотацию, важнее, чем количество аннотаций. И это является важным шагом для разработки методов детекции для «умной лабораторной посуды».

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Автоматизированные системы непрерывного мониторинга процессов развития клеточных культур требуют новых подходов к выполнению методов культивирования и разработке новых инструментов. Стандартные методы подходят для периодического кратковременного наблюдения, поскольку перемещение чашки Петри из инкубатора к микроскопу сопровождается снижением температуры до комнатной, а снижение концентрации углекислого газа в окружающем воздухе относительно газовой смеси в инкубаторе приводит к изменению pH культуральной среды, что может негативно сказаться на интерпретации результатов экспериментов.

Лабораторная технология разметки цифровых изображений опухолевых клеток может быть выполнена как в полуавтоматическом, так и в автоматическом режиме. Разработанные алгоритмы детекции клеток являются универсальными и могут быть применены в качестве программного приложения к данным, получаемым с применением сенсорной поверхности «умной лабораторной посуды».

С помощью обученной нейросети анализ изображений культуры клеток глиомы С6 и обработка морфометрических параметров могут быть выполнены в автоматическом режиме. Такой подход увеличивает скорость выполнения эксперимента, позволяет повысить точность результатов исследования, а детекция клеток с патологическими признаками может осуществляться в живых культурах без необходимости применения флуоресцентных меток. Данный метод планируется распространить

для детекции других культур клеток при соответствующем наборе изображений без меток, т. е. без дополнительного применения химических, физических и биологических реагентов.

Сформированная база данных имеет разрешение 2592×1952 пикселя, что значительно превосходит базы данных из открытого доступа [7, 8] и представляет новый инструмент цитологических исследований, который может служить эталоном для анализа последствий применения цитостатических или цитотоксических воздействий химических, физических и иных факторов. Тренд на развитие технологий «умной лабораторной посуды» в начале активного развития, новые сенсорные материалы и способы детекции фактически созданы и ожидают объединения, чтобы предоставить принципиально новые подходы к безопасным и экологически чистым методам культивирования.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shamshiripour P, Rahnama M, Nikoobakht M, Rad V.F., Moradi A.R., Ahmadvand D. Extracellular vesicles derived from dendritic cells loaded with VEGF-A siRNA and doxorubicin reduce glioma angiogenesis in vitro. *J Control Release*. 2024;369:128–145. doi: 10.1016/j.jconrel.2024.03.042. Epub 2024 Mar 26.
2. Pournajaf S., Afsordeh N., Bayat H., Pourgholami M.H. Fingolimod Inhibits C6 Rat Glioma Proliferation and Migration, Induces Sub-G1 Cell Cycle Arrest, Mitochondrial and Extrinsic Apoptosis In Vitro and Reduces Tumour Growth In Vivo. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2025;52(1):e70012. doi: 10.1111/1440-1681.70012
3. Singh G., Famta P., Shah S., Vambhurkar G., Pandey G., Kumar R., Kumar P., Mourya A., Madan J., Srivastava S., Khatri D.K. Nanoparticle-enhanced delivery of resveratrol for targeted therapy of glioblastoma: Modulating the Akt/GSK-3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B pathway in C6 glioma cells. *Brain Res*. 2025;1848:149411. doi: 10.1016/j.brainres.2024.149411. Epub 2024 Dec 21.
4. Long Z., Yi Z., Yan W., Wang H. Trends in the immunotherapy for glioblastoma: A two-decade bibliometric analysis. *Hum Vaccin Immunother*. 2025;21(1):2466299. doi: 10.1080/21645515.2025.2466299. Epub 2025 Feb 14.
5. Marinho M.A.G., da Silva Marques M., de Oliveira Vian C., de Moraes Vaz Batista Filgueira D., Horn A.P. Photodynamic therapy with curcumin and near-infrared radiation as an antitumor strategy to glioblastoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2024;100:105917. doi: 10.1016/j.tiv.2024.105917. Epub 2024 Aug 12.
6. Ghasemi E., Zamanzade Z., Seif F., Mondanizadeh M. Quantification of the Most Effective X-Ray Dosage for Inhibiting Invasion of Glioma Cell Line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2024;25(12):4299–4303. doi: 10.31557/APJCP.2024.25.12.4299
7. Wang S., Zhou Y., Qin X., Nair S., Huang X., Liu Y. Label-free detection of rare circulating tumor cells by image analysis and machine learning. *Sci Rep*. 2020;10(1):12226. doi: 10.1038/s41598-020-69056-1
8. Shen C., Rawal S., Brown R., et al. Automatic detection of circulating tumor cells and cancer associated fibroblasts using deep learning. *Sci Rep*. 2023;13(1):5708. doi: 10.1038/s41598-023-32955-0
9. Mahmud M., Pulizzi R., Vasilaki E., Giugliano M. QSpoke tools: a generic framework for parallel batch preprocessing of extracellular neuronal signals recorded by substrate microelectrode arrays. *Front Neuroinform*. 2014;8:26. doi: 10.3389/fninf.2014.00026
10. Nakayama M., Toyoshima Y., Kikuchi A., Okano T. Micropatterned Smart Culture Surfaces via Multi-Step Physical Coating of Functional Block Copolymers for Harvesting Cell Sheets with Controlled Sizes and Shapes. *Macromol Biosci*. 2021;21(3):e2000330. doi: 10.1002/mabi.202000330. Epub 2020 Dec 28.
11. Benda P., Lightbody J., Sato G., Levine L., Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*. 1968;161(3839):370–1. doi: 10.1126/science.161.3839.370
12. Kim D., Jeong Y. Development of Robust Lane-Keeping Algorithm Using Snow Tire Track Recognition in Snowfall Situations. *Sensors (Basel)*. 2024;24(23):7802. doi: 10.3390/s24237802
13. Zhang Y., Zhao S., Gu H., Mazurowski M.A. How to Efficiently Annotate Images for Best-Performing Deep Learning-Based Segmentation Models: An Empirical Study with Weak and Noisy Annotations and Segment Anything Model. *J Imaging Inform Med*. 2025 Jan 22. doi: 10.1007/s10278-025-01408-7. Epub ahead of print.
14. Wang C., Jiang M., Li Y., Wei B., Li Y., Wang P., Yang G. MP-FocalUNet: Multiscale parallel focal self-attention U-Net for medical image segmentation. *Comput Methods Programs Biomed*. 2025;260:108562. doi: 10.1016/j.cmpb.2024.108562. Epub 2024 Dec 9.



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.3.018>  
УДК 616.344-002:616.34-008.87:612.017.1



Нижегородова Д.Б.✉, Назаренко Е.М., Иванчик Г.И., Шулейко А.Ч., Кулинич С.С.,  
Величко А.В., Зафранская М.М.

Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины  
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

## Клеточный и гуморальный иммунный ответ к компонентам микробиоты у пациентов с болезнью Крона

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Нижегородова Д.Б. – концепция и дизайн исследования, проведение иммунологических исследований и статистическая обработка данных, написание исходного варианта и окончательное редактирование текста рукописи; Назаренко Е.М. – постановка культуральных и иммунологических исследований; Иванчик Г.И. – проведение диссоциации ткани, гематологические исследования; Шулейко А.Ч. – сбор и статистическая обработка клинических и морфологических данных, забор биологического материала; Кулинич С.С. – постановка культуральных исследований и криоконсервация клеток; Величко А.В. – проведение иммунохимического анализа; Зафранская М.М. – концепция и дизайн исследования, окончательное редактирование текста рукописи.

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма 3.1 «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2», № госрегистрации 20230295.

Подана: 21.05.2025  
Принята: 01.09.2025  
Контакты: nzh@tut.by

### Резюме

**Введение.** Иммунопатогенез болезни Крона ассоциируется не только с изменением состава микробиоты, но и с нарушением ее взаимодействия с мукозальной иммунной системой в результате срыва механизмов иммунологической толерантности. Существующие классические методы не позволяют напрямую определять исходную частоту микробиота-реактивных лимфоцитов. В данной статье представлен методологический подход идентификации Т-клеток, реагирующих на флагеллин, олигоманнан или бактериальный липопроtein, которая включает определение поверхностной экспрессии активационного маркера CD154 в сочетании с внутриклеточной продукцией цитокинов CD3<sup>+</sup>-лимфоцитами и позволяет выделять субпопуляции антиген-специфических клеток у пациентов с болезнью Крона.

**Цель.** Охарактеризовать субпопуляции Т-лимфоцитов, реактивных к компонентам микробиоты, в периферической крови и слизистой оболочке подвздошной кишки и установить их взаимосвязь с продукцией аутоантител у пациентов с болезнью Крона.

**Материалы и методы.** Материалом исследования явились биопсийный материал подвздошной кишки и периферическая кровь 16 пациентов (10 мужчин, 6 женщин) с болезнью Крона в возрасте от 22,5 до 30,5 года (X 25,0 года). Мукозальные лимфоидные клетки получали путем программной диссоциации тканей кишки. Лимфоидные клетки культивировали в присутствии компонентов микробиоты в течение 12 ч., после чего оценивали количество антиген-специфических Т-клеток методом проточной цитометрии. Статистическую обработку проводили в GraphPad Prism.

**Результаты.** У пациентов с болезнью Крона установлено статистически значимое увеличение количества T1- и T17-клеток в культурах PBLs, стимулированных флагеллином и липопротеином, которые коррелировали с локализацией ( $R=0,54$ ,  $p<0,05$ ) и фенотипом ( $R=0,86$ ,  $p<0,05$ ) болезни. В культурах IELs пациентов с болезнью Крона регистрировались изменения только среди клеток Т-хелперов 17-го типа в ответ на флагеллин ( $p<0,05$ ) и олигоманнан ( $p<0,01$ ) относительно ГС, коррелирующих с циркулирующими флагеллин-специфическими T1 PBLs ( $R=0,80$ ,  $p<0,01$ ). В культурах LPLs наблюдалась противоположная картина, характеризующаяся повышением как спонтанного ( $p<0,01$ ), так и маннан-специфического ( $p<0,05$ ) уровня T1-клеток у пациентов с болезнью Крона относительно ГС, зависящего от тяжести фенотипа болезни ( $R=0,85$ ,  $p<0,01$ ). Маннан-специфические мукозальные T17 IELs и T1 LPLs обратно пропорционально коррелировали с концентрацией ASCA IgG ( $R=-0,64$  и  $R=-0,86$ ,  $p<0,05$  соответственно) в сыворотке пациентов и не зависели от продукции ASCA IgA.

**Заключение.** В данном исследовании продемонстрирована идентификация циркулирующих и мукозальных микробиота-специфических Т-клеток, эффекторные реакции которых приводят к основному повреждению ткани, что необходимо учитывать при комплексной диагностике болезни Крона.

**Ключевые слова:** болезнь Крона, мукозальные иммунные клетки, антиген-специфический иммунный ответ, микробиота, Т-лимфоциты, аутоантитела, проточная цитометрия

---

Nizheharodava D.✉, Nazaranka E., Ivanchyk G., Shuleika A., Kulinich S., Vialichka A., Zafranskaya M.

Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

## Cellular and Humoral Immune Response to Microbiota Components in Patients with Crohn's Disease

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Nizheharodava D. – study concept and design, immunological tests and statistical processing of data, writing the original version and final editing of the manuscript; Nazaranka E. – cultural and immunological tests; Ivanchyk G. – tissue dissociation, hematological tests; Shuleika A. – clinical and morphological data processing, biological material sampling; Kulinich S. – cultural tests and cells cryopreservation; Vialichka A. – enzyme-linked immunosorbent assay; Zafranskaya M. – study concept and design, final editing of manuscript.

**Funding:** the work was financially supported by the state research program "Biotechnologies-2", subprogram 3.1 "Molecular and cellular biotechnologies-2", registration number 20230295.

Submitted: 21.05.2025

Accepted: 01.09.2025

Contacts: nzh@tut.by

---

### Abstract

**Introduction.** Crohn's disease immunopathogenesis is associated not only with changes in microbiota composition, but also with disrupted interaction with the mucosal immune system as a result of the immunological tolerance breakdown. Existing classical methods do not allow a direct determination of microbiota-reactive lymphocytes baseline frequency.



The article presents a methodology to identify T cells reacting to flagellin, oligomannan, or bacterial lipoprotein, based on surface expression of the activating marker CD154 in combination with intracellular production of cytokines by CD3<sup>+</sup>lymphocytes and allows determining antigen-specific cell subsets in patients with Crohn's disease.

**Purpose.** To characterize T-lymphocytes subsets reactive to microbiota components in peripheral blood and ileum mucosa and to establish their correlation with autoantibodies production in patients with Crohn's disease.

**Materials and methods.** The study material was intestinal biopsy material from the ileum and peripheral blood of 16 patients (10 men, 6 women) with Crohn's disease aged from 22.5 to 30.5 years (with average age of 25.0 years). Mucosal lymphoid cells were obtained by programmatic dissociation of intestinal tissues. Lymphoid cells were cultured in the presence of microbiota components for 12 h, after which the number of antigen-specific T cells was estimated by flow cytometry. Statistical processing was performed in GraphPad Prism.

**Results.** A statistically significant increased T1 and T17 cells numbers were detected in PBLs cultures stimulated with flagellin and lipoprotein in patients with Crohn's disease, which correlated with disease localization ( $R=0.54$ ,  $p<0.05$ ) and phenotype ( $R=0.86$ ,  $p<0.05$ ). Changes only among T-helper 17 cells in response to flagellin ( $p<0.05$ ) and oligomannan ( $p<0.01$ ) were established in IELs cultures of Crohn's disease patients as compared to CG, correlating with circulating flagellin-specific T1 PBLs ( $R=0.80$ ,  $p<0.01$ ). The opposite pattern was observed in LPLs cultures, characterized by increased level in both spontaneous ( $p<0.01$ ) and mannan-specific ( $p<0.05$ ) T1 cells in patients with Crohn's disease relative to CG, depending on disease phenotype ( $R=0.85$ ,  $p<0.01$ ). Mannan-specific mucosal T17 IELs and T1 LPLs were inversely correlated with serum level of ASCA IgG ( $R=-0.64$  and  $R=-0.86$ ,  $p<0.05$ , respectively) in Crohn's disease patients and did not depend on ASCA IgA level.

**Conclusion.** The study demonstrates the identification of circulating and mucosal microbiota-specific T cells, effector responses of which result in the tissue damage, what should be considered in the comprehensive diagnosis of Crohn's disease.

**Keywords:** Crohn's disease, mucosal immune cells, antigen-specific immune response, microbiota, T-lymphocytes, autoantibodies, flow cytometry

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Крона представляет собой хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание кишечника, характеризующееся мультифакториальной этиологией и генетически обусловленной абберантной иммунной реакцией на компоненты микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1]. Развитие аутоиммунного воспаления при болезни Крона ассоциируется не только с изменением количественного и качественного состава микробиоты, сопровождающимся снижением разнообразия и перераспределением в представителях Firmicutes и Bacteroides с превалированием условно-патогенных и патогенных бактерий, но и с нарушением взаимодействия микробиоты с мукозальной иммунной системой ЖКТ в результате срыва механизмов иммунологической толерантности [2]. Однако до сих пор не выяснено, являются

ли эти эффекты причиной или следствием развития заболевания, что требует детального изучения формирования антиген-индуцированного иммунного ответа на компоненты микробиоты при болезни Крона.

Среди основных предполагаемых эффекторных механизмов повреждения ткани отмечают иммунологические реакции, опосредованные Т-хелперами 1-го и 17-го типов [3]. Однако большинство выполненных в данном аспекте исследований касается характеристики данных популяций в периферической крови, и только единичные исследования рассматривают их реакцию на компоненты микробиоты [4, 5]. Кроме того, особое внимание уделяется продукции аутоантител к компонентам микробиоты, несмотря на то, что их роль считается вторичной в патогенезе болезни Крона [6]. К настоящему времени к потенциальным аутоантигенам, представляющим собой компоненты микробиоты и играющим основную роль в патогенезе болезни Крона, относят бактериальный флагеллин, олигоманнан дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактериальный липопроtein [6–8]. В связи с этим высокоактуальными являются исследования мукозальных эффекторных клеток, способных реагировать на потенциальные аутоантигены, и определение их взаимосвязи с циркулирующими в периферической крови микробиота-специфическими Т-лимфоцитами.

Система мукозального иммунитета желудочно-кишечного тракта представлена несколькими клеточными компартментами, классифицируемыми как интраэпителиальные лимфоидные клетки (IELs – англ. Intraepithelial Lymphoid Cells), лимфоциты собственной пластинки слизистых оболочек (LPLs – англ. Lamina Propria Cells), неорганизованные лимфоидные скопления и Пейеровы бляшки. К наиболее перспективным в плане поиска мишеней для таргетной клеточной терапии относят IELs и LPLs, так как данные клетки активно вовлекаются в эффекторную фазу развития мукозального иммунного ответа, в то время как неорганизованные лимфоидные скопления и Пейеровы бляшки отвечают за индуктивную фазу иммунного ответа. Все эти компартменты выполняют протективную и иммунорегуляторную роль, вместе с тем они могут вовлекаться в патологические процессы ЖКТ аутоиммунной природы, что до сих пор является предметом активных дискуссий [9, 10].

Существующие классические методы определения антиген-специфических Т-клеток, праймированных аутоантигеном, включают методы оценки пролиферации Т-клеток (по включению [<sup>3</sup>H] тимидина, CFSE-метод), секреции цитокинов (ELISA, ELISPOT) и анализ маркеров, индуцированных активацией. Каждый из этих методов имеет свои индивидуальные ограничения в установлении конкретных показателей, а их использование по отдельности не позволяет напрямую определять исходную частоту антиген-реактивных Т-клеток, как и цитокиновый профиль, синтезируемый конкретным лимфоцитом. Предыдущие исследования показали, что CD40L (CD154) сверхэкспрессируется на циркулирующих Т-клетках при болезни Крона, а индукция CD40L участвует в патогенной продукции цитокинов [7]. Используя преимущество данного временно экспрессируемого лиганда, представляется возможным напрямую подсчитать и охарактеризовать антиген-специфические клетки после кратковременной стимуляции, что снижает риск потенциальных фенотипических и функциональных изменений из-за эффектов *in vitro* во время длительного культивирования *ex vivo*. Экспрессию CD154 можно эффективно обнаружить после 7-часовой стимуляции лимфоидных клеток поликлональными стимуляторами или микробными антигенами [11].



Принимая во внимание высокую актуальность изучения состояния специфических мукозальных иммунных клеток в локальном микроокружении аутоиммунного воспаления, в данной статье представлен методологический подход идентификации антиген-специфических Т-лимфоцитов к компонентам микробиоты у пациентов с болезнью Крона на основе экспрессии CD154, индуцированной флагеллином, олигоманнаном или бактериальным липопроотеином на циркулирующих и тканерезидентных лимфоцитах в сочетании с внутриклеточной продукцией цитокинов для идентификации субпопуляций Т-хелперов 1-го и 17-го типов, которые принимались за подлинные антиген-специфические Т-клетки у пациентов с болезнью Крона. Кроме того, рассмотрена их взаимосвязь не только между компартментами IELs и LPLs, но и с гуморальным компонентом аутоиммунного воспаления.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Охарактеризовать субпопуляции Т-лимфоцитов, реактивных к компонентам микробиоты, в периферической крови и слизистой оболочке подвздошной кишки и установить их взаимосвязь с продукцией аутоантител у пациентов с болезнью Крона.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились биопсийный материал подвздошной кишки и периферическая кровь 16 пациентов (10 мужчин, 6 женщин) с болезнью Крона в возрасте от 22,5 до 30,5 года (X 25,0 года), находившихся на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница». Диагноз подтверждался морфологическим исследованием биопсийного материала. Тяжесть болезни Крона устанавливалась в соответствии с Монреальской классификацией воспалительных заболеваний кишечника (ALBP система). Пациенты имели следующие особенности локализации патологического процесса: толстокишечное поражение – 4 пациента, тонкокишечное – 7 пациентов, тонко-толстокишечное – 5 пациентов. Из них у 3 пациентов определялся воспалительный фенотип заболевания, у 5 пациентов – стенозирующий/стриктурирующий и у 6 пациентов – пенетрирующий/свищевой фенотип; у 2 пациентов диагностировалось также перианальное повреждение.

Группу сравнения (ГС) составили 7 пациентов (4 мужчин и 3 женщины) со спаечной болезнью ЖКТ или дивертикулезом в возрасте от 36,0 до 55,0 года (X 46,0), находившихся на лечении в хирургическом отделении УЗ «Минская областная клиническая больница». Все исследуемые пациенты предоставили информированное согласие.

### **Выделение лимфоидных клеток**

Мононуклеары периферической крови (PBLs – англ. peripheral blood lymphocytes) выделяли путем наслаивания разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиент плотности Roti-Sep (CarlRoth, Германия) с последующим центрифугированием в течение 30 мин. при 1500 об/мин (366 g) при 4 °C. Осадок 2-кратно отмывали в физиологическом растворе с добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки в течение 10 мин. при 1500 об/мин (366 g). Концентрацию подсчитывали с помощью гематологического анализатора Micros-60 (ABX, Франция).

IELs и LPLs получали из биопсийного материала путем комбинированной диссоциации ткани с использованием автоматизированного диссоциатора gentleMACS (Miltenyi Biotec, Германия) и набора ферментов Lamina Propria Dissociation Kit

(Miltenyi Biotec, Германия). Образец ткани кишки механически измельчали на небольшие фрагменты размером 0,5 см<sup>2</sup>, после чего инкубировали в растворе для первичной диссоциации, представляющем собой раствор Хенкса без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> (LT Biotech, Литва) с добавлением 5 mM ЭДТА (AppliChem, Германия), 5% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn, Германия), 1 mM ДТТ (AppliChem, Германия), в течение 20 мин. при 37 °C при непрерывном помешивании. Полученную смесь фильтровали через сетчатый фильтр с порами 100 мкм и повторяли инкубирование в растворе для первичной диссоциации. Объединяли клеточные суспензии IELs и отмывали центрифугированием при 1500 об/мин (366 g) в течение 10 мин. После механической дезагрегации выполняли ферментативную диссоциацию ткани с использованием набора Lamina Propria Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия). Ткань кишки помещали в пробирку для клеточной диссоциации, содержащую RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) и ферменты R, A и H в концентрациях согласно инструкции производителя, инкубировали в течение 30 мин. при 37 °C при непрерывном перемешивании. После инкубации пробирки с образцами помещали в программный диссоциатор gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Германия) и выполняли дезагрегацию ткани. Полученную клеточную суспензию LPLs отмывали центрифугированием при 1500 об/мин (366 g) в течение 10 мин. Жизнеспособность выделенных клеток IELs и LPLs определяли по окрашиванию трипановым синим.

**Культуральный метод**

Для оценки антиген-специфического ответа исследуемые иммунные клетки (PBLs, IELs, LPLs) культивировали в концентрации 2×10<sup>5</sup>/лунку в культуральной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 5% сыворотки АВ (РНПЦ ТимБ, Беларусь), 1% антибиотика-антимикотика (Elabscience, Китай) и 1% L-глутамина (Elabscience, Китай) в присутствии стимуляторов (см. таблицу) в течение 12 ч. в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C. За 4 ч. до конца инкубации культуры клеток добавляли 10 мкг/мл брефельдина А (Cayman Chemicals, США).

**Метод проточной цитометрии**

Количество антиген-реактивных Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля в клеточных культурах PBLs, IELs и LPLs после in vitro стимуляции антигенами микробиоты определяли методом проточной цитометрии. Культуры фиксировали с помощью реагента Inside Fix (Miltenyi Biotec, Германия) в течение 20 мин., отмывали в реагенте Inside Perm (Miltenyi Biotec, Германия) и окрашивали моноклональными антителами

**Характеристика антигенных компонентов микробиоты для оценки специфического ответа Т-лимфоцитов**

**Microbiota antigens used for estimation of T-lymphocytes specific response**

| Стимулятор                                                    |                                                  | Концентрация стимулятора | Производитель         |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Смесь рекомбинатных флагеллинов (Fla)                         | Рекомбинантный флагеллин (full length, 503 a.a.) | 100 нг/мл                | Abcam, Великобритания |
|                                                               | Рекомбинантный флагеллин FliA(H) Lys150~Ile448   | 100 нг/мл                | Prospec, США          |
| Олигоманнан (OM) Saccharomyces cerevisiae                     |                                                  | 10 мкг/мл                | Sigma-Aldrich, США    |
| Рекомбинантный бактериальный липопротеин (Lp) Asp1719~Arg2038 |                                                  | 100 нг/мл                | Cloud-Clone, США      |



CD3-APC, CD4-VioBright-B515, CD8-VioGreenTM, IFN- $\gamma$ -PE, CD14-VioBlue, CD20-VioBlue, CD154-APC-Vio770 в течение 20 мин. при температуре 18–25 °C в темноте в соответствии с инструкцией производителя набора T Cell Analysis Kit (REAfinity™, Miltenyi Biotec, Германия).

Результаты измерения регистрировали на 30 000 Т-лимфоцитов, используя 10-канальный проточный цитометр CytoFlex (Beckman Coulter, США). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения CytExpert software (version 2.3.0.84, Beckman Coulter, США). Дублеты, клеточный дебрис и CD14<sup>+</sup> или CD20<sup>+</sup> клетки исключали из анализа. Среди антиген-специфических лимфоцитов выделяли следующие субпопуляции клеток: CD3<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> $\gamma$ IFN<sup>+</sup> клетки (T1), CD3<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> клетки (T17), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> $\gamma$ IFN<sup>+</sup> клетки (Th1), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>(Th17), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> $\gamma$ IFN<sup>+</sup> клетки (CTL1), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> клетки (CTL17).

### Иммуноферментный анализ

Концентрацию аутоантител ASCA IgG и ASCA IgA в сыворотках пациентов исследуемых групп определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием следующих коммерческих наборов: Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA (IgG) (Euroimmun, Германия, аналитическая чувствительность – 1,0 RU/мл) и Anti-Saccharomyces cerevisiae ELISA (IgA) (Euroimmun, Германия, аналитическая чувствительность – 1,0 RU/мл). Все этапы исследований осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны  $\lambda=450$  нм. Пороговым значением (cut-off) считали 20 RU/мл.

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли в программе GraphPad Prism. Нормальность распределения определяли по критерию Шапиро – Уилка. Статистически значимые различия определяли при уровне  $p<0,05$ . Для характеристики исследуемых групп использовались показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (25-й процентиль ÷ 75-й процентиль). Сравнение групп и определение статистической значимости различий осуществлялось с помощью теста Краскела – Уоллиса с поправкой Данна. Корреляционный анализ выполняли по Спирмену с определением коэффициентов корреляции (R).

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля, специфических к компонентам микробиоты, в периферической крови пациентов с болезнью Крона

Для характеристики циркулирующих и мукозальных Т-лимфоцитов, реактивных к компонентам микробиоты, в исследуемых группах оценивали количество цитокин-синтезирующих активированных клеток с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> $\gamma$ IFN<sup>+</sup> (Т-клетки 1-го цитокинового профиля, T1) и с фенотипом CD3<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> клетки (Т-клетки 17-го цитокинового профиля, T17), реагирующих на смесь рекомбинатных флагеллинов (Fla), олигоманнан (OM) *Saccharomyces cerevisiae* и бактериальный липопrotein (Lp). Кроме того, идентифицировали хелперные субпопуляции Th1 и Th17 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup> $\gamma$ IFN<sup>+</sup> клетки и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> клетки, соответственно)

и цитотоксические субпопуляции CTL1 и CTL17 ( $CD3^+CD8^+CD154^+IFN^+$  клетки и  $CD3^+CD8^+CD154^+IL-17^+$  клетки соответственно), представляющие собой процент от общего числа Т-лимфоцитов.

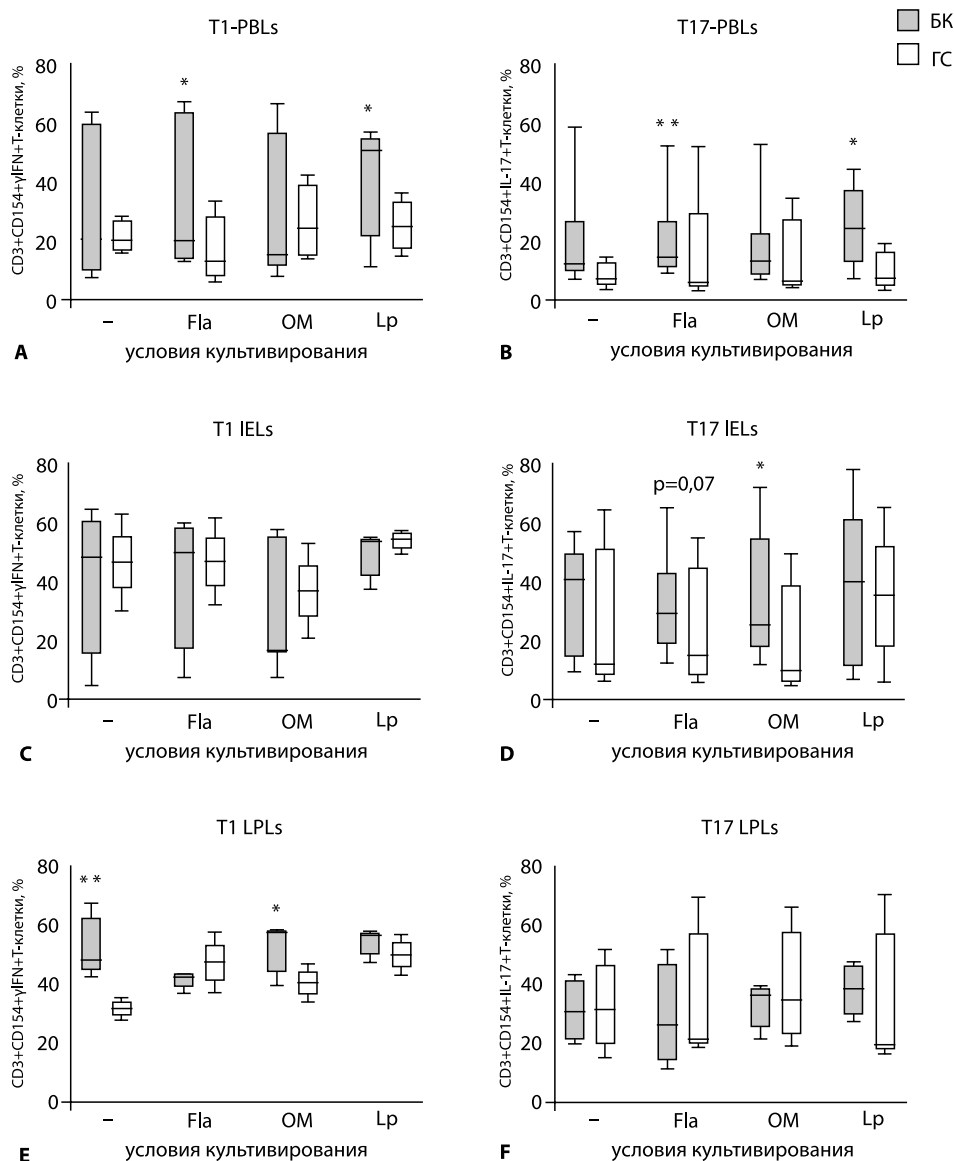
У пациентов с болезнью Крона установлено статистически значимое увеличение количества Т1-клеток (рис. 1А) и Т17-клеток (рис. 1В) в культурах PBLs, стимулированных компонентами микробиоты: в присутствии флагеллинов – в 1,6 раза (Т1,  $p < 0,05$ ) и 2,6 раза (Т17,  $p < 0,01$ ), липопроотеина А – в 2,0 раза (Т1,  $p < 0,05$ ) и 3,1 раза (Т17,  $p < 0,05$ ) относительно ГС. Соотношение микробиота-реактивных популяций Т1/Т17 определялось как больше 1,0 у пациентов с болезнью Крона ( $k_{Fla}=1,38$ ;  $k_{OM}=1,16$  и  $k_{Lp}=2,13$ ), однако за счет выраженной стимуляции Т17-клеток уровень показателей снижался относительно аналогичных в ГС ( $k_{Fla}=2,26$ ;  $k_{OM}=4,10$  и  $k_{Lp}=3,35$ ,  $p < 0,05$ ).

При этом количество циркулирующих Fla-специфических Т1-клеток коррелировало с уровнем Fla-специфических Т17-клеток ( $R=0,90$ ,  $p < 0,001$ ) у пациентов с болезнью Крона. Кроме того, наибольший процент Fla-специфических Т17-лимфоцитов отмечался при тонко-толстокишечной локализации аутоиммунного воспаления ( $R=0,54$ ,  $p < 0,05$ ), в то время как количество Lp-реактивных Т1-клеток повышалось с увеличением фенотипической тяжести патологического процесса ( $R=0,86$ ,  $p < 0,05$ ) у пациентов с болезнью Крона согласно Монреальской классификации болезни.

Характеристика субпопуляционного состава показала, что среди Fla-специфических Т1-клеток преимущественно реагировали цитотоксические CTL1-лимфоциты ( $p < 0,01$ ), в то время как среди Fla-реактивных Т17-клеток отвечали как хелперные Th17 ( $p < 0,05$ ), так и цитотоксические CTL17-лимфоциты ( $p < 0,05$ ) в культурах PBLs пациентов с болезнью Крона относительно ГС. В то же время статистически значимых различий в общем количестве маннан-специфических Т1- и Т17-клеток в периферической крови исследуемых групп не было выявлено, однако установлено повышение содержания OM-реактивных CTL17-лимфоцитов ( $p < 0,01$ ) в культурах PBLs у пациентов с болезнью Крона относительно уровня их содержания у пациентов ГС. Полученные результаты свидетельствуют о преимущественно реагирующей на компоненты микробиоты субпопуляции циркулирующих цитотоксических Т-лимфоцитов.

Согласно данным литературы, флагеллин является основным структурным белком жгутиков и обеспечивает подвижность преимущественно грамотрицательных комменсальных и патогенных бактерий. Взаимодействуя с паттерн-распознающими рецепторами (TLR5, NLR, CARD) на врожденных иммунных клетках, флагеллин инициирует синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, участвуя в развитии воспалительной реакции [12]. В отношении клеток приобретенного иммунитета показан двойственный эффект флагеллина: прямая активация через TLR5 [13] и опосредованная через процессинг эпитопов флагеллина дендритными клетками и презентацию  $CD3^+CD4^+$ -хелперам с последующей их активацией и дифференцировкой в эффекторные или регуляторные флагеллин-специфические клетки [14]. У пациентов с болезнью Крона флагеллин-специфические  $CD3^+CD4^+$ -Т-клетки обнаруживаются как в циркуляции, так и ткани кишки, при этом их профиль характеризуется преимущественно как Т-хелперы 17-го типа [5], что согласуется с нашими данными.

Бактериальный липопротеин, наряду с флагеллином, рядом авторов идентифицирован как потенциальный аутоантиген в иммунопатогенезе воспалительных заболеваний кишечника. В частности,  $CD4^+$ -Т-клетки пациентов с болезнью Крона



**Рис. 1. Количество Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля, реактивных к компонентам микробиоты, у пациентов с болезнью Крона и группы сравнения, Ме (25; 75)%о: А – Т1-клетки периферической крови, В – Т17-клетки периферической крови, С – интерэпителиальные Т1-клетки, D – интерэпителиальные Т17-клетки, Е – Т1-клетки lamina propria, F – Т17-клетки lamina propria**  
**Fig. 1. Number of profile 1 and 17 T-lymphocytes reactive to microbiota components in Crohn's disease patients and comparison group, Me (25; 75)%o: А – Т1-cells of peripheral blood, В – Т17-cells of peripheral blood, С – intraepithelial Т1-cells, D – intraepithelial Т17-cells, Е – Т1-cells of lamina propria, F – Т17-cells of lamina propria**

Примечания: PBLs – лимфоциты периферической крови, IELs – интерэпителиальные лимфоциты, LPLs – лимфоциты lamina propria, Fla – флагеллин, OM – олигоманнан, Lp – липопротеин, БК – пациенты с болезнью Крона, ГС – группа сравнения, Ме (25; 75)%о – медиана, 25-й и 75-й процентиля; \* p<0,05; \*\* p<0,01.

демонстрировали повышенный ответ на него с преобладанием Th17-клеточного фенотипа, по сравнению с характером аналогичной реакции клеток у пациентов здоровой группы. Однако патогенетическая значимость бактериального липопротеина практически не изучена, что дает основание не рассматривать его в качестве иммунодоминантного аутоантигена [5].

### **Характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов 1-го и 17-го профиля, специфических к компонентам микробиоты, в ткани кишки пациентов с болезнью Крона**

Для оценки мукозального специфического иммунного ответа проведены аналогичные исследования в слизистой оболочке подвздошной кишки с характеристикой субпопуляционного состава среди микробиота-реактивных цитокин-синтезирующих субпопуляций в культурах IELs и LPLs исследуемых групп. Несмотря на то, что оба компартмента отвечают за формирование эффекторной фазы иммунного ответа в слизистых оболочках ЖКТ, их субпопуляционный состав различается: среди IELs доминируют преимущественно киллерные клетки с выраженным цитолитическим потенциалом (CTL), который помогает регулировать взаимодействие IELs с эпителиальными клетками, микробиотой и люминальными антигенами ЖКТ, в то время как среди LPLs преобладают хелперные лимфоциты (Th) [10]. Это, в свою очередь, определяет необходимость сравнительной характеристики антиген-специфических IELs и LPLs в условиях аутоиммунного воспаления.

Показано, что в культурах IELs пациентов с болезнью Крона регистрировались изменения только среди клеток профиля T17 (рис. 1D), характеризующиеся повышением (в частности, за счет субпопуляции IL-17-синтезирующих Th17) в ответ на флагеллины ( $p < 0,05$ ) и олигоманнан ( $p < 0,01$ ), в то время как среди клеток профиля T1 статистически значимых изменений не выявлено относительно ГС (рис. 1C). При этом установлена корреляция количества мукозальных Fla-реактивных T17 IELs с циркулирующими Fla-специфическими T1 PBLs ( $R = 0,80$ ,  $p < 0,01$ ) у пациентов с болезнью Крона, что позволяет выделять данную популяцию антиген-специфических клеток в качестве кандидата на потенциальный биомаркер эффекторного повреждения ткани кишки. Тем не менее данная популяция мукозальных клеток не зависела от локализации или фенотипа патологического процесса. Известно, что наряду с Th17 источником IL-17 может являться субпопуляция неклассических  $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, составляющая 15–30% от всех IELs и способная намного быстрее синтезировать данный цитокин на больших уровнях относительно классических T-клеток [15].

В культурах LPLs наблюдалась противоположная культурам IELs картина: у пациентов с болезнью Крона регистрировалось статистически значимое повышение как спонтанного ( $p < 0,01$ ), так и ОМ-специфического ( $p < 0,05$ ) уровня T1-клеток (рис. 1E) при отсутствии различий среди T17-лимфоцитов (рис. 1F) в сочетании с установленной тенденцией к снижению субпопуляции Fla-специфических Th17 ( $p = 0,07$ ) относительно ГС. При этом на олигоманнан преимущественно реагировала субпопуляция цитотоксических CTL1 клеток ( $p < 0,05$ ), обратно пропорционально коррелирующая с локализацией аутоиммунного процесса ( $R = -0,86$ ,  $p < 0,05$ ), что обуславливает преимущественную реализацию эффекторных механизмов в тонкой кишке, и прямо пропорционально зависящая от тяжести фенотипа болезни ( $R = 0,85$ ,  $p < 0,01$ ). Однако



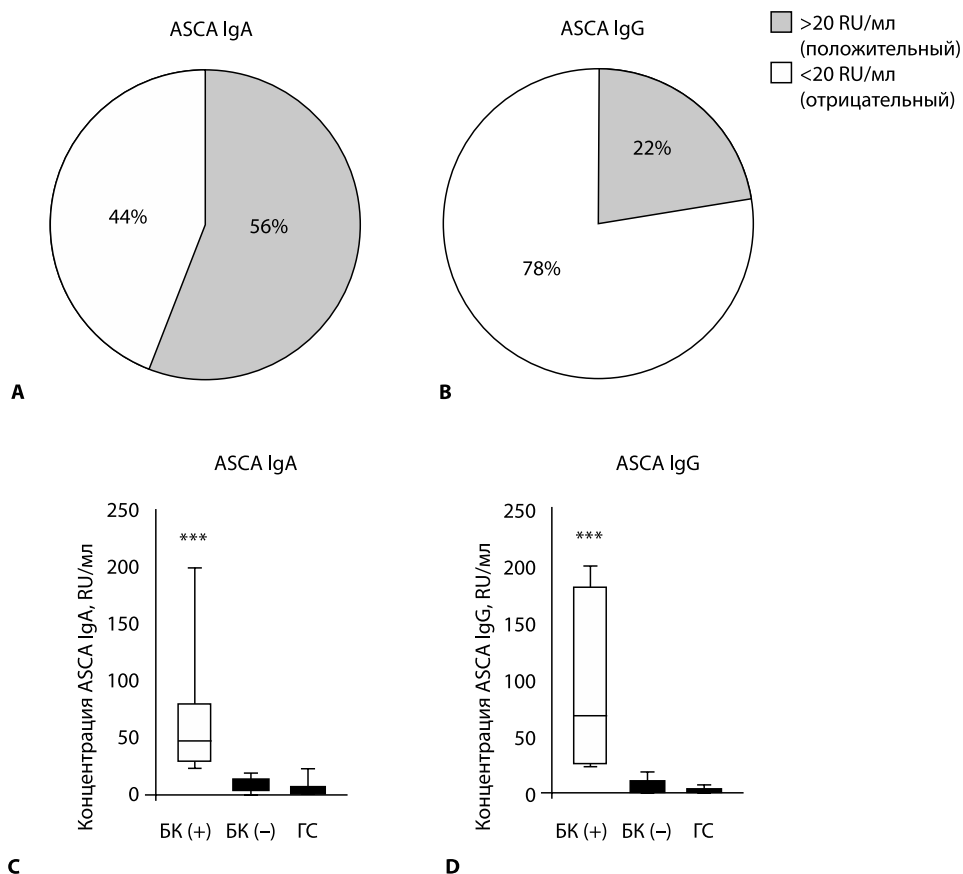
в данном исследовании не выявлено взаимосвязи LPLs с циркулирующими или мукозальными клетками других компартментов, что, возможно, определяет их отличную от других функциональную роль в поддержании и развитии специфического аутоиммунного воспаления в ЖКТ.

Согласно данным литературы, маннан не только представляет собой компонент пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, но и входит в состав клеточной стенки *Candida albicans*, *Mycobacterium bovis*, *Micobacterium chelonae*. В норме маннан ингибирует пролиферацию лимфоцитов, но при болезни Крона имеет обратный эффект, усиливая пролиферацию Т-клеток, что объясняется потерей толерантности к кишечным антигенам [6]. Маннан, будучи нетипичным Т-клеточным антигеном, способен влиять на врожденный и приобретенный иммунный ответ разными путями. Антигенная роль маннана *S. cerevisiae* до сих пор не установлена, при этом известно, что он является сильным активатором макрофагов, распознающих его с помощью маннозного рецептора или CD1b-рецептора, и В-лимфоцитов, а ASCA продукция может быть и Т-зависимой природы. При болезни Крона показано, что маннан способен активировать лимфоциты и усиливать ими продукцию провоспалительных цитокинов, в частности TNF $\alpha$ , вне зависимости от активности болезни, что указывает на его иницилирующую роль в поддержании воспаления и гиперответа на компоненты микробиоты [6, 16]. Обнаружение ASCA косвенно указывает на роль маннана в качестве аутоантигена, однако это до сих пор остается дискуссионным вопросом. Проведенное в 2023 г. Martinini и соавторами исследование определило, что воздействие пищевых дрожжей приводит к повышению реактивности Т-хелперных клеток 1-го типа как в крови, так и в биопсийной слизистой ткани, что было специфично для пациентов с болезнью Крона. Установлено, что повторное воздействие комменсальных дрожжевых антигенов иницирует каскад нисходящих реакций, способствующих повышенной цитотоксичности, хронической активации Т-клеток, повреждению слизистого барьера и усилению воспаления [4].

### **Характеристика продукции аутоантител к олигоманнану *Saccharomyces cerevisiae* у пациентов с болезнью Крона**

Серологические, как и клеточные, маркеры также характеризуются высокой специфичностью и могут играть важную роль как в первичной диагностике болезни Крона, так и в ее прогрессировании или при уточнении диагноза неклассифицированных воспалительных заболеваний кишечника до оперативного вмешательства, что было нами показано в предыдущих исследованиях [17]. В связи с выявленными маннан-реактивными популяциями Т-лимфоцитов (профиля Т17 среди IELs и профиля Т1 среди LPLs) у пациентов с болезнью Крона охарактеризован специфический гуморальный иммунный ответ по продукции сывороточных аутоантител к олигоманнану *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) класса IgA и IgG. Результаты исследования частоты встречаемости и концентрации ASCA в сыворотке пациентов с болезнью Крона представлены на рис. 2.

В сыворотке пациентов с болезнью Крона ASCA IgA и IgG определялись соответственно в 56% (рис. 2А) и 22% (рис. 2В) случаев, их уровень превышал аналогичные показатели в ГС ( $p < 0,001$ ). При этом у пациентов с болезнью Крона во всех серопозитивных образцах выявлялись антитела класса IgA (100%) и реже – антитела класса IgG (40%). Отличительной особенностью антител ASCA класса IgG являлся



**Рис. 2. Уровень аутоантител ASCA IgA и IgG в сыворотке пациентов с болезнью Крона и группы сравнения, Ме (25; 75)%:** А – соотношение пациентов с БК с положительным и отрицательным уровнем аутоантител ASCA IgA, В – соотношение пациентов с БК с положительным и отрицательным уровнем аутоантител ASCA IgG, С – концентрация аутоантител ASCA IgA в исследуемых группах, D – концентрация аутоантител ASCA IgG в исследуемых группах  
**Fig. 2. Serum levels of ASCA IgA and IgG in Crohn's disease patients and comparison group, Me (25; 75)%:** А – ratio of Crohn's disease patients with positive and negative ASCA IgA level, В – ratio of Crohn's disease patients with positive and negative ASCA IgG level, С – ASCA IgA concentration in investigated groups, D – ASCA IgG concentration in investigated groups

Примечания: БК (+) – пациенты с БК с положительным уровнем аутоантител, БК (-) – пациенты с БК с отрицательным уровнем аутоантител, ГС – группа сравнения, Ме (25; 75)% – медиана, 25-й и 75-й процентиля; \*\*\*  $p < 0,001$ .

их высокий сывороточный уровень в образцах серопозитивных пациентов с болезнью Крона: ASCA IgG – 81,1 (27,3 ÷ 150,3) RU/мл (рис. 2C) vs ASCA IgA – 47,9 (30,2 ÷ 64,4) RU/мл (рис. 2D). При этом концентрация ASCA IgA коррелировала с уровнем ASCA IgG в сыворотке пациентов с болезнью Крона ( $R=0,72$ ,  $p<0,001$ ). В ГС количественные показатели ASCA IgA и IgG составили <20 RU/мл, что соответствовало серонегативному результату.



Для установления взаимосвязи маннан-специфического клеточного и гуморального иммунного ответа у пациентов с болезнью Крона проведен корреляционный анализ маннан-реактивных мукозальных Т-клеток 1-го и 17-го профиля с сывороточной концентрацией аутоантител ASCA IgA и ASCA IgG. Установлено, что выявленные повышенные уровни маннан-специфических T17 IELs и T1 LPLs в ткани кишки обратно пропорционально коррелировали с концентрацией ASCA IgG ( $R=-0,64$ ,  $p<0,05$  и  $R=-0,86$ ,  $p<0,05$  соответственно) в сыворотке пациентов и не зависели от продукции ASCA IgA. Полученные результаты предполагают автономный механизм действия эффекторных реакций клеточной и гуморальной природы, что еще раз подчеркивает мультинаправленность развития аутоиммунного воспаления при болезни Крона.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный методологический подход позволяет определять Т-лимфоциты, реактивные к компонентам микробиоты, демонстрируя превалирование различных циркулирующих и мукозальных Т-клеточных субпопуляций в зависимости от компартмента иммунной системы. У пациентов с болезнью Крона среди мукозальных IELs преимущественно реагируют Т-клетки 17-го профиля в ответ на флагеллин и маннан, в то время как в lamina propria идентифицируется ответ маннан-специфических Т-лимфоцитов 1-го профиля. В то же время в периферической крови определяются флагеллин- и липопротеин-специфические Т-клетки обоих профилей. Несмотря на отсутствие циркулирующих маннан-специфических Т-лимфоцитов, в сыворотке периферической крови у большинства пациентов с болезнью Крона идентифицируются маннан-специфические антитела.

Выявлена различная локализация микробиота-специфических Т-клеток, эффекторные реакции которых приводят к основному повреждению ткани, что необходимо учитывать как при комплексной иммунологической диагностике болезни Крона (включая корректный выбор биологического материала пациентов – периферическая кровь против биопсийного материала и лабораторного метода исследования – проточная цитометрия против иммуно(cito)гистохимии), так и при поиске новых терапевтических мишеней.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ahluwalia B., Moraes L., Magnusson M.K., Öhman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2018;53(4):379–389. doi: 10.1080/00365521.2018.1447597
2. Calvez V., Puca P., Di Vincenzo F., Del Gaudio A., Bartocci B., Murgiano M., Iaccarino J., Parand E., Napolitano D., Pugliese D., Gasbarrini A., Scaldaferrì F. Novel Insights into the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Biomedicines*. 2025;13(2):305. doi: 10.3390/biomedicines13020305
3. Cao H., Diao J., Liu H., Liu S., Liu J., Yuan J., Lin J. The Pathogenicity and Synergistic Action of Th1 and Th17 Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2023;29(5):818–829. doi: 10.1093/ibd/izac199
4. Martini G.R., Tikhonova E., Rosati E. et al. Selection of cross-reactive T cells by commensal and food-derived yeasts drives cytotoxic  $T_H1$  cell responses in Crohn's disease. *Nat Med*. 2023;29:2602–2614. doi: 10.1038/s41591-023-02556-5
5. Calderón-Gómez E., Bassolas-Molina H., Mora-Buch R., Dotti I., Planell N., Esteller M., Gallego M., Martí M., García-Martín C., Martínez-Torró C., Ordás I., Singh S., Panés J., Benítez-Ribas D., Salas A. Commensal-Specific CD4(+) Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology*. 2016;151(3):489–500.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2016.05.050
6. Sendid B., Cornu M., Cordier C., Bouckaert J., Colombel J.F., Poulain D. From ASCA breakthrough in Crohn's disease and *Candida albicans* research to thirty years of investigations about their meaning in human health. *Autoimmunity Reviews*. 2024;23(2):103486. doi: 10.1016/j.autrev.2023.103486
7. Morgan N.N., Duck L.W., Wu J., Rujani M., Thomes P.G., Elson C.O., Mannon P.J. Crohn's Disease Patients Uniquely Contain Inflammatory Responses to Flagellin in a CD4 Effector Memory Subset. *Inflamm Bowel Dis*. 2022;28(12):1893–1903. doi: 10.1093/ibd/izac146
8. Van Bodegraven A.A., Meuwissen S.G. Lipoprotein (a), thrombophilia and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(12):1407–9. doi: 10.1097/00042737-200112000-00002

9. Velikova T., Kaouri I.E., Bakopoulou K., Gulina M., Naydenova K., Dimitrov M., Peruhova M., Lazova S. Mucosal Immunity and Trained Innate Immunity of the Gut. *Gastroenterology Insights*. 2024;15(3):661–675. doi: 10.3390/gastroent15030048
10. White Z., Cabrera I., Kapustka I., Sano T. Microbiota as key factors in inflammatory bowel disease. *Front Microbiol*. 2023;14:1155388. doi: 10.3389/fmicb.2023.1155388
11. Hegazy A.N., West N.R., Stubbington M.J.T., Wendt E., Suijker K.I.M., Datsi A., et al. Circulating and Tissue-Resident CD4<sup>+</sup> T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology*. 2017;153(5):1320–1337.e16. doi: 10.1053/j.gastro.2017.07.047
12. Cook L., Lisko D.J., Wong M.Q., Garcia R.V., Himmel M.E., Seidman E.G., Bressler B., Levings M.K., Steiner T.S. Analysis of Flagellin-Specific Adaptive Immunity Reveals Links to Dysbiosis in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9(3):485–506. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.11.012
13. Hajam I.A., Dar P.A., Shah Nawaz I., Jaume J.C., Lee J.H. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Exp Mol Med*. 2017;49(9):e373. doi: 10.1038/emmm.2017.172
14. Alexander K.L., Zhao Q., Reif M., Rosenberg A.F., Mannon P.J., Duck L.W., Elson C.O. Human Microbiota Flagellins Drive Adaptive Immune Responses in Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2021;161(2):522–535. doi: 10.1053/j.gastro.2021.03.064
15. Schmitt H., Neurath M.F., Atreya R. Role of the IL23/IL17 Pathway in Crohn's Disease. *Front. Immunol*. 2021;12:622934. doi: 10.3389/fimmu.2021.622934
16. Zonna X., Banta C., Hossein-Javaheeri N. The Association Between Crohn's Disease and Patient Response to Yeast: A Review of the Literature. *Gastroenterology Insights*. 2024;15(4):1064–1074. doi: 10.3390/gastroent15040073
17. Nizhegorodova D., Adamovich A., Ivanchyk G., Dybov O., Kulinich S., Shadrina V., Vorobei A., Zafranskaya M. Antibody profile in patients with inflammatory bowel diseases. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2020;3:30–38. doi: 10.14427/jipai.2020.3.30 (in Russian)



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.3.019>



Asmaa E. Mohammed<sup>1</sup>, Abdulelah A. Almayah<sup>2</sup>✉, Qutaiba A. Qasim<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Al-Fayhaa Teaching Hospital, Basrah Health Directory, Basrah, Iraq

<sup>2</sup> College of Pharmacy, Basrah University, Basrah, Iraq

<sup>3</sup> College of Pharmacy, Al-Ayen Iraqi University, Thi-Qar, Iraq

## The Effect of Type 2 Diabetes Mellitus on Some Immunological Parameters (C4, IgA, IgM)

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Asmaa E. Mohammed – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, software, visualization, writing – original draft and editing; Abdulelah A. Almayah – conceptualization, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, visualization, writing – editing; Qutaiba A. Qasim – conceptualization, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, visualization, writing – original draft.

The article is published in author's edition.

Submitted: 01.06.2024

Accepted: 12.03.2025

Contacts: Abdulelah.Suhain@uobasrah.edu.iq

### Abstract

**Introduction.** Diabetes mellitus is a long-term metabolic disorder that affects the condition of various organs and functional systems of the body. It is considered that patients with diabetes mellitus are more susceptible to various diseases because their immune system is compromised due to high blood glucose levels.

**Purpose.** To determine correlation features between the main criteria for type 2 diabetes mellitus and parameters for assessing the immune system status based on the results of C4, IgA, and IgM measurements in the blood of Basra residents (Iraq).

**Materials and methods.** This observational study was achieved in Basra City, Iraq. One hundred and seventy-one participants were registered and divided into 50 healthy and 121 patients with type 2 DM (divided into newly and old diagnosed groups). Hematological tests were performed on each subject.

**Results.** IgA and C4 concentrations appeared to be significantly higher in patients with type 2 diabetes mellitus than in healthy volunteers. At the same time, no significant difference was found in IgM and C4 levels between patients with newly diagnosed and long-standing diabetes.

**Conclusion.** In type 2 diabetes mellitus, an increase in IgA and C4 blood levels occurs, reflecting changes in the functional status of the immune system of the study participants, residents of the city of Basra (Iraq).

**Keywords:** immunological indicators, C4, IgA, type 2 diabetes mellitus, glycated hemoglobin

Асмаа Э. Мохаммед<sup>1</sup>, Абдулелах А. Альмайах<sup>2</sup>✉, Кутайба А. Касим<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Учебная больница Аль-Файхаа Управления здравоохранения Басры, Басра, Ирак

<sup>2</sup> Фармацевтический колледж Университета Басры, Басра, Ирак

<sup>3</sup> Фармацевтический колледж Иракского университета Аль-Айен, Ти-Кар, Ирак

## Влияние сахарного диабета 2-го типа на некоторые иммунологические показатели (C4, IgA, IgM)

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Асмаа Э. Мохаммед – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Абдулелах А. Альмайах – концепция, научное руководство, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, проверка подлинности полученных данных, визуализация, редактирование текста статьи; Кутайба А. Касим – концепция, научное руководство, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание текста статьи.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 01.06.2024

Принята: 12.03.2025

Контакты: Abdulelah.Suhain@uobasrah.edu.iq

### Резюме

---

**Введение.** Сахарный диабет (СД) – это продолжительное нарушение обмена веществ, которое затрагивает состояние различных органов и функциональных систем организма. Считается, что пациенты, страдающие с сахарным диабетом, чаще подвержены различным заболеваниям, поскольку их иммунная система ослаблена вследствие высокого уровня глюкозы в крови.

**Цель.** Установить особенности корреляции между основными критериями течения СД 2-го типа и параметрами оценки состояния иммунной системы по результатам определения C4, IgA и IgM в крови жителей Басры (Ирак).

**Материалы и методы.** Данное обсервационное исследование было проведено в городе Басра, Ирак. В исследовании принял участие 171 испытуемый, в том числе 50 здоровых добровольцев и 121 пациент с СД 2-го типа. Пациенты с СД были разделены на две группы: с недавно и давно установленным диагнозом СД. Всем пациентам выполнено определение содержания гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в крови.

**Результаты.** Концентрация IgA и C4 оказалась значительно выше у пациентов с СД 2-го типа, чем у здоровых добровольцев. В то же время не было выявлено существенной разницы в показателях концентрации IgM C4 у пациентов с недавно и давно установленным диагнозом СД.

**Заключение.** При СД 2-го типа происходит увеличение содержания IgA и C4 в крови, что отражает изменение функционального состояния иммунной системы организма исследованных лиц – жителей Басры (Ирак).

**Ключевые слова:** иммунологические показатели, C4, IgA, сахарный диабет 2-го типа, гликозилированный гемоглобин

---



## ■ INTRODUCTION

A group of metabolic diseases called type 2 diabetes mellitus (DM 2) concerns 12% of people in the middle-age [1]. DM has various effects on people's health and can cause both big and small blood vessel diseases that can be life-threatening [2]. It is now one of the world's most significant threats to public health because of this [3]. The problem is made even more difficult by the fact that up to half of all DM2 patients have no idea they have it since their blood sugar can be above average levels without any apparent symptoms [4, 5].

People with diabetes mellitus (DM) are more likely to get infections than healthy people, and the course of the infection is also more difficult in this group of patients. One probable reason for this rise in infectivity is problems with the immune system, as diabetes changes parts of the defense system [6].

Serum immunoglobulin levels are regularly checked in clinical practice because they give important information about the health of the humoral immune system. B cells' main job is to make immunoglobulins, which are very important in many inflammatory diseases like lupus, rheumatoid arthritis, and atherosclerosis. Inflammation is also thought to play a role in T2D [7, 8].

Immunoglobulins are unique because they can be made in many different places. They work in two ways: they find antigens and set off effector systems that destroy them. Immunoglobulins are made and released in plasma cells. 10% to 15% of blood immunoglobulin is IGA, which has a half-life of six days. IGA is not in the baby's blood because it can't get through the placenta. After birth, the production of IGA happens slowly. By the end of the first year, a baby has about 25% of the adult level. By the age of 3.5 years, they have 50%, and by age 16, they have the adult level. A more important type of IGA is secretory IGA. Milk, sweat, spit, and tears can all have it in them [9].

IGM is the only immunoglobulin that newborns normally make. In adults, it makes up 5–10% of all immunoglobulins. It can't get into extravascular areas because of its huge molecular weight (900,000 Daltons) and pentamer form, which comprises five IGG molecules [10].

IgM levels are lower in diseases linked to inherited or acquired problems with making immunoglobulins. When you have an infection, your blood immunoglobulin levels usually rise across all cells. The IgM level usually increases when someone has a virus or a bloodstream disease like malaria or primary biliary cirrhosis. If the paraprotein turns out to be IgM, it is most likely that the person has Waldenström macroglobulinemia [10].

The complement system in the immune system is made up of about 25 proteins. It is a chemical that removes bacteria wrapped in antibodies in one way or another. The different parts of the complement system work together to set off a chain of events that gets rid of the invaders. They also play a part in the inflammation response system. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) makes cells resistant to insulin because inflammatory factors like C3 and C4 are higher in people with T2DM. There is more inflammation in these people. People know about acute-phase reactants because they cause inflammation in many diseases. Most APRs go up due to several diseases controlled by the immune system, such as infections, injuries, surgery, burns, tissue infarctions, and cancer. They are used as clinical indicators to diagnose and treat several illnesses because they show whether inflammation is present and how bad it is. Some Acute-phase proteins may also be able to cause inflammation [11].

One explanation says that the complement system comprises heat-labile chemicals that either help or kill microorganisms when heat-stable blood antibodies are present. In the course of time, it has been identified as a group of proteins that control the adaptive immune response and work with humoral immunity to boost natural immunity. As a bridge between innate and adaptive immunity, the complement system's main job is to clear immune complexes and eliminate apoptotic cells. They are also very important in shielding the body against infection. Complement proteins are turned on in the plasma and extracellular space. A part of innate defense is the complement system, which also plays a part in metabolic processes. No question complements subunits C3 and C4 are connected to metabolic syndrome, heart disease risk, and diabetes mellitus [12].

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

To determine correlation features between the main criteria for type 2 diabetes mellitus and parameters for assessing the immune system status based on the results of C4, IgA, and IgM measurements in the blood of Basra residents (Iraq).

## ■ MATERIALS AND METHODS

### **Study Design**

The current investigation was an observational cross-sectional study handled on 171 subjects, including 57 newly diagnosed diabetes mellitus patients, 64 old diagnosed diabetes mellitus patients, and 50 control subjects.

All samples were collected from Basrah City, Iraq. Four mL of blood were taken from patients and controls, ranked into Gel tubes, left for 15 min at room temperature, and centrifuged at 2000× g for ten min to get the serum that was used to measure IgM, IgA, and C4. HbA1c for all subjects was assessed by the ready-to-use kit SD BIOSENSOR 200 [13].

### **Inclusion Criteria**

- Patients diagnosed with DM2 had no insulin therapy for at least one year.
- The subject with type 2 DM had glycosylated hemoglobin A1c (HbA1c) more than 6.1%.
- Healthy group without any acute or chronic disease.
- All subjects within the age interval (40–50).

### **Exclusion Criteria**

The study excluded cases with chronic complications (retinopathy, nephropathy, neuropathy), acute diseases, hypothyroidism, hyperthyroidism, autoimmune diseases, hepatitis, chronic digestive diseases and obese patients [14]. Subjects outside the age interval (40–50) and subjects under immunosuppressive drugs therapy.

### **Determination of the Serum Levels of Total IgA, IgM, and Fourth Complement Components (C4)**

The serum levels of IgA, IgM, and the fourth component of the complement system (C4) were measured by the turbidimetric method, using Gesan production S. R. I. – Italy Kits for the quantitative determination of C4, IgA, and IgM by Piccolo Chem (Autoanalyzer Clinical Chemistry) [15].

## Statistical Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 26 was used for the statistical study to determine whether numerical data had a normal distribution. We used Skewness, Shapiro-Wilk, and Kolmogorov Smirnov tests, along with mean and median comparisons. We also used an independent sample t-test for normally distributed data and the Mann – Whitney U test for non-normally distributed data. We used Spearman's rank and Pearson's correlation values to determine how strong the link between the two variables was. A statistical significance was set at a P-value of less than 0.05.

## ■ RESULTS

Following the selection criteria, 171 people agreed to participate in this study, including 121 with DM2 and 50 healthy controls. Diabetes people who were diagnosed within the last 5 years are called "newly diagnosed," while those diagnosed more than 5 years ago are called "old diagnosed". Table 1 summarizes the medical and biographical details of healthy individuals and people with diabetes. The average age, occupation, education level, marital status, family history, and number of men to women in each group were all the same. When the data was analyzed statistically, there was no significant difference ( $p<0.05$ ), but HbA1c differed significantly between diabetic patients and healthy controls ( $p<0.05$ ).

The immunological parameters for healthy controls when compared with all DM2 patients, regardless of the duration of diabetes mellitus. The comparison revealed that immunological parameters (C4, IgA) were elevated in DM2 patients ( $P<0.05$ ) compared to

**Table 1**  
**Demographic data of healthy individuals and DM2 patients**

| Parameters           | Control (n=50) |    | Patients (n=121) | P value |
|----------------------|----------------|----|------------------|---------|
| Mean age (years)     | 46.1±1.619     |    | 46.537±2.642     | 0.408   |
| Gender               | Female         | 34 | 77               | 0.632   |
|                      | Male           | 16 | 44               |         |
| Education            | Yes            | 35 | 77               | 0.37    |
|                      | No             | 13 | 44               |         |
| Marital status       | Married        | 42 | 112              | 0.089   |
|                      | No             | 8  | 9                |         |
| Family history of DM | Positive       | 21 | 69               | 0.073   |
|                      | Negative       | 29 | 52               |         |
| Occupation           | Central        | 38 | 83               | 0.370   |
|                      | Peripheral     | 12 | 38               |         |
| Mean HbA1c           | 5.592±0.991    |    | 8.814±1.942      | 0.001   |

**Table 2**  
**Immunological parameters of diabetic patients and healthy controls**

| Parameters  | Control (n=50) | Patients (n=121) | P value |
|-------------|----------------|------------------|---------|
|             | Mean±SD        |                  |         |
| C4 (mg/dL)  | 28.722±6.338   | 40.48±11.455     | 0.001   |
| IgA (mg/dL) | 245.044±67.083 | 327.199±106.996  | 0.001   |
| IgM (mg/dL) | 127.145±39.546 | 118.469±44.748   | 0.236   |

**Table 3**  
**Immunological parameters for diabetic patients' groups and healthy controls**

| Parameters  | Control (1)    | New (2)         | Old (3)         | P value<br>1 vs 2 | P value<br>1 vs 3 | P value<br>2 vs 3 |
|-------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             | Mean±SD        |                 |                 |                   |                   |                   |
| C4 (mg/dL)  | 28.722±6.338   | 36.593±8.629    | 43.88±12.556    | <b>0.001</b>      | <b>0.001</b>      | <b>0.001</b>      |
| IgA (mg/dL) | 245.044±67.083 | 314.869±102.368 | 337.988±110.555 | <b>0.001</b>      | <b>0.001</b>      | <b>0.194</b>      |
| IgM (mg/dL) | 127.145±39.546 | 112.834±40.541  | 123.709±47.623  | 0.088             | 0.673             | 0.167             |

**Table 4**  
**Correlation of HbA1c with Immunological parameters for all, old and newly diagnosed patients**

| Diagnosed patients | HbA1c   |              |              |        |
|--------------------|---------|--------------|--------------|--------|
|                    |         | C4           | IgA          | IgM    |
| All                | r       | 0.420        | 0.308        | -0.045 |
|                    | P value | <b>0.001</b> | <b>0.001</b> | 0.557  |
| Old                | r       | 0.247        | 0.056        | 0.002  |
|                    | P value | <b>0.047</b> | 0.658        | 0.986  |
| New                | r       | 0.076        | 0.107        | 0.202  |
|                    | P value | 0.579        | 0.434        | 0.135  |

Note: pearson correlation – r.

healthy controls, while IgM displayed a non-significant difference ( $P>0.05$ ), as illustrated in Table 2.

The C4 level showed a highly significant difference ( $P=0.001$ ) between the three groups (controls, newly diagnosed, old diagnosed). IgA results showed a highly significant difference between the healthy control group and the newly diagnosed group ( $P=0.001$ ), no significant difference between the newly diagnosed group and the old diagnosed group ( $P=0.194$ ), and no significant differences in the IGM test between the three groups ( $P=0.088$ ,  $P=0.673$ ,  $P=0.167$ ) (Table 3).

Correlation is investigated for immunological parameters (C4, IgA, IgM) with HbA1c (glycemic control). There was a positive correlation between C4, IgA, and HbA1c levels; this correlation is significant, with a  $p<0.05$ . On the other hand, IgM revealed a statistically non-significant relation with HbA1c ( $P>0.05$ ). Accordingly, it indicates a rise in C4 and IgA values when HbA1c values rise. For old diagnosed patients, there is a significant correlation between C4 and HbA1c ( $P=0.047$ ), indicating a rise in C4 levels when the values of HbA1c rise, while other parameters show non-significant correlations with glycemic control (HbA1c). There was a non-significant relation between immunological parameters for newly diagnosed patients and glycemic control (Table 4).

## ■ DISCUSSION

Differences in age [16], education, family history, marital status, occupation, and gender can change immunological parameters [17]. For this reason, those who took part in the current investigation were matched in the most basic ways, such as age and gender, to improve the accuracy of the statistics and make the results easier to understand, especially when looking at subgroups. We excluded obesity because it can affect immunity [18], as reported by a previous study [14]. This factor, along with others in the exclusion criteria,



such as hypertension and cardiovascular diseases that impact the immune system [19], was also excluded from obtaining matching criteria.

One important result of our research was that individuals with diabetes had elevated serum IgA levels compared to healthy control participants. This result aligns with the information provided by Gonzales-Quintela et al. [8].

IgA is the type of immunoglobulin found in the largest quantities in bodily fluids, including saliva, mucus, and the surfaces of the respiratory and intestinal systems.

To explain why diabetic patients produced more IgA than a normal subject group, we postulated that these patients had more mucosal surface permeability, which led to increased antigen uptake by the intestinal mucosa membrane and the subsequent synthesis of IgA antibodies in response to these antigens, this is logical according to the Outi study, that reported increased levels of permeability in diabetic patients because of leaky intestine. The three groups' serum IgM levels did not differ significantly. The findings from this study thus demonstrate that diabetes individuals produce enough serum IgA and IgM to fend against harmful germs [20].

Research Guo et al., 2016 agree with our study in part of IGA higher levels in diabetes groups than in controls. Still, they reported that IGM was negatively related to type 2 DM (they decreased in patients with type 2 diabetes than in controls), which disagrees with our result that they were not significantly different in all study groups [7].

We chose HbA1c to correlate with the immunological parameters in diabetes as it is the most sensitive index of glycemic control over a period (3–4 months) [21].

According to the previous investigation, elevated serum antibodies may be linked to inadequate glycemic management [22, 23]. Our study's results predict higher levels of IgA in patients with higher HbA1c percentages than in the control group ( $p=0.001$ ).

Investigation has demonstrated that people with T2DM typically reveal raised levels of C4. Costantini et al., 2021 study suggested excessive plasma levels of C4 in DM patients [24]. The interplay of underlying inflammation in T2DM might influence these changes. The possible significance of these shifts leads to extra research and discovery.

Ardawi 32 stated a positive correlation between HbA1c and IGA concentrations and a negative correlation between HbA1C and IGM concentrations [23, 24]. Costantini et al. [24] cohort study detected significant negative links between HbA1c and IGM. Furthermore, linear regression analysis of the Costantini et al. study showed that plasma IGM levels are in part affected by HbA1c, advising that hyperglycemia or hyperinsulinemia in T2DM may add to changes in immunoglobulins [24].

## ■ CONCLUSION

Type 2 DM contributes significantly to the progression of transmittable diseases, and the immune system, like other systems, is a target system in diabetes. Immunological parameters such as C4 and IGA significantly increase in type 2 diabetic patients, while IGM is non-significantly reduced. Preventing and treating diabetes is crucial for preventing future restrictive immune function deterioration.

## ■ REFERENCES

1. Unwin N, Gan D, Whiting D. The IDF Diabetes Atlas: providing evidence, raising awareness and promoting action. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87(1):2–3.
2. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93(1):137–88.
3. Patil SR, Chavan AB, Patel AM, et al. A Review on Diabetes Mellitus its Types, Pathophysiology, Epidemiology and its Global Burden. *Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology.* 2023;2(4):73–79.
4. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia.* 2012;55:88–93.
5. Abdulsaid RT, Jabbar AS, Akar TK. Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Pulmonary Function Tests. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2023;32(2):25–32.
6. Geerlings SE, Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999;26(3–4):259–65.
7. Guo X, Meng G, Liu F, et al. Serum levels of immunoglobulins in an adult population and their relationship with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016;115:76–82.
8. Gonzalez-Quintela A, Alende R, Gude F, et al. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(1):42–50.
9. Ardawi MS, Nasrat HA, Bahnassy AA. Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients. *Diabet Med.* 1994;11(4):384–7.
10. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
11. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res.* 2001;89(9):763–71.
12. Saad-eldin R, Fathy N, El-Nashar A, Abo Al-Fadl E. The relation of systemic lupus erythematosus activity and histopathology of renal biopsy. *Sohag Medical Journal.* 2021;25(2):100–105.
13. Weykamp C. HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Ann Lab Med.* 2013;33(6):393–400.
14. Martí A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev.* 2001;2(2):131–40.
15. Khalaf HY, Hussein TA, Fadheel BM. The Study of Serum Complement C3, C4 and Immunoglobulin E IgE in Psoriasis Patients. *Baghdad Science Journal.* 2025;12:708–714.
16. Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis.* 2000;31(2):578–85.
17. Agarwal D, Paul S, Lele P, et al. Changes in immunological parameters by ageing in rural healthy Indian adults and their associations with sex and lifestyle. *Sci Rep.* 2022;12:15012.
18. Muscogiuri G, Pugliese G, Laudisio D, et al. The impact of obesity on immune response to infection: Plausible mechanisms and outcomes. *Obes Rev.* 2021 Jun;22(6):e13216.
19. Drummond GR, Vinh A, Guzik TJ, Sobey CG. Immune mechanisms of hypertension. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(8):517–532.
20. Moazezi Z, Hosseinian A, Ahmad Moazam E, et al. Evaluation of immunological parameters in diabetic patients: are these patients immunodeficient? *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2014;13(2):110–9.
21. Abdulsaid RT, Jabbar AS, Akar TK. Disorders of pulmonary function in type 2 diabetes mellitus patients with different types of oral hypoglycemic medications: metformin, metformin plus thiazolidinedione and metformin plus sulfonylurea. *Farmacia.* 2022;70(6):1050–1056.
22. Deepti C, Reena K, Pooja S, et al. Co-relating HbA1c and serum IgA in diabetic and non-diabetic patients with and without periodontitis. *Asian Journal of Medical Sciences.* 2014;6(2):72–77.
23. Nasrat HA, Ajabnoor MA, Ardawi MSM. Fructosamine as a screening-test for gestational diabetes mellitus: a reappraisal. 1990;34:27–33.
24. Costantini E, Carlin M, Porta M, Brizzi MF. Type 2 diabetes mellitus and sepsis: state of the art, certainties and missing evidence. *Acta Diabetol.* 2021;58(9):1139–1151.



<https://doi.org/10.34883/PL.2025.14.3.020>  
УДК 616.12-008.331.1-06:616-056.52]-078.088.7



Руденкова Т.В.✉, Костюк С.А., Штонда М.В., Акола Т.В.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

## Изучение ассоциации полиморфизмов гена рецептора витамина D с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Руденкова Т.В. – дизайн исследования, проведение лабораторных тестов, анализ и интерпретация результатов, подготовка и редактирование статьи; Костюк С.А. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, редактирование статьи; Штонда М.В. – концепция и дизайн исследования, сбор данных, анализ и интерпретация результатов, редактирование статьи; Акола Т.В. – дизайн исследования, сбор данных, анализ литературы, подготовка статьи.

Подана: 26.05.2025

Принята: 28.08.2025

Контакты: t.rudenkova@mail.ru

### Резюме

**Цель.** Провести оценку распространенности однонуклеотидных полиморфизмов rs7975232 (Apol), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене рецептора витамина D (VDR) и выявить их ассоциацию с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела.

**Материалы и методы.** В исследование включены пациенты (n=231) в возрасте 40 лет и старше с установленным диагнозом «артериальная гипертензия» и индексом массы тела более 25 кг/м<sup>2</sup>. В контрольную группу были включены практически здоровые пациенты (n=18) старше 50 лет без артериальной гипертензии и с индексом массы тела менее 25 кг/м<sup>2</sup>. Из периферической крови пациентов проводили выделение ДНК, из которой амплифицировали фрагменты гена VDR, проводили их рестрикцию и идентификацию полиморфизмов.

**Результаты.** В составе полиморфизма rs1544410 (BsmI) в гене VDR генотипы GG (BB) и GA (Bb) были ассоциированы с увеличением риска развития артериальной гипертензии (ОШ=6,42 (95% ДИ 2,38–14,51)). У пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела для генотипа GA (Bb) была выявлена ассоциация с увеличением риска развития ишемической болезни сердца (ОШ=3,32 (95% ДИ 1,28–6,21)) и фибрилляции предсердий (ОШ=3,53 (95% ДИ 1,21–5,59)). Генотип AA (bb) был ассоциирован со снижением риска развития артериальной гипертензии (ОШ=6,42 (95% ДИ 2,38–14,51)), ишемической болезни сердца (ОШ=4,17 (95% ДИ 1,99–9,74)) и фибрилляции предсердий (ОШ=4,92 (95% ДИ 1,21–9,09)). В составе полиморфизма rs2228570 (FokI) в гене VDR генотип TC (ff) был ассоциирован с увеличением риска развития ишемической болезни сердца (ОШ=3,12 (95% ДИ 0,92–6,42)), а также со снижением риска развития фибрилляции предсердий (ОШ=3,62 (95% ДИ 1,88–7,36)) у пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела. Для генотипа TT (ff) была установлена ассоциация со снижением риска развития ишемической болезни

сердца (ОШ=3,67 (95% ДИ 1,27–9,61)) и фибрилляции предсердий (ОШ=3,78 (95% ДИ 1,83–8,83)). Увеличение риска развития фибрилляции предсердий было ассоциировано с генотипом CC (FF) (ОШ=4,93 (95% ДИ 1,12–9,31)).

**Заключение.** Установлен высокий уровень распространенности полиморфизмов rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене VDR среди пациентов с артериальной гипертензией и избыточной массой тела и здоровых лиц контрольной группы. В гене VDR идентифицировано 2 полиморфизма, ассоциированных с увеличением/снижением риска развития артериальной гипертензии и сердечно-сосудистых осложнений (ишемическая болезнь сердца, фибрилляция предсердий): полиморфизм rs1544410 (BsmI) и полиморфизм rs2228570 (FokI).

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые осложнения, рецептор витамина D, ген, полиморфизм

---

Rudenkova T.✉, Kostiuk S., Shtonda M., Akola T.  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

## Study of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Association with Cardiovascular Complications Risk in Patients with Arterial Hypertension and Overweight

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Rudenkova T. – study design, laboratory tests, results analysis and interpretation, text writing and editing; Kostiuk S. – study concept and design, results analysis and interpretation, article editing; Shtonda M. – study concept and design, data collection, results analysis and interpretation, editing; Akola T. – data collection, literature analysis, text writing.

Submitted: 26.05.2025

Accepted: 28.08.2025

Contacts: t.rudenkova@mail.ru

---

### Abstract

**Purpose.** To assess the prevalence of single nucleotide polymorphisms rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) in the VDR gene and identify their association with cardiovascular complications risk in patients with arterial hypertension and overweight.

**Materials and methods.** The study included patients (n=231) aged 40 years and older with diagnosis of arterial hypertension and body mass index of more than 25 kg/m<sup>2</sup>. The control group included practically healthy patients (n=18) over 50 years old, without arterial hypertension and with body mass index of less than 25 kg/m<sup>2</sup>. DNA was isolated from patients' peripheral blood, from which fragments of the VDR gene were amplified; their restriction and polymorphisms identification were carried out.

**Results.** The GG (BB) and GA (Bb) genotypes within the rs1544410 (BsmI) polymorphism in the VDR gene were associated with an increased risk of arterial hypertension (OR=6.42 (95% CI 2.38–14.51)). In patients with arterial hypertension and overweight, the GA (Bb) genotype was associated with an increased risk of coronary heart disease (OR=3.32 (95% CI 1.28–6.21)) and atrial fibrillation (OR=3.53 (95% CI 1.21–5.59)). The GG (BB) genotype was associated with a decreased risk of coronary heart disease (OR=4.58 (95% CI 1.87–8.87)).



The AA (bb) genotype was associated with a reduced risk of arterial hypertension (OR=6.42 (95% CI 2.38–14.51)), coronary heart disease (OR=4.17 (95% CI 1.99–9.74)) and atrial fibrillation (OR=4.92 (95% CI 1.21–9.09)). In patients with arterial hypertension and overweight, the TC (ff) genotype within the rs2228570 (FokI) polymorphism in the VDR gene was associated with an increased risk of coronary heart disease (OR=3.12 (95% CI 0.92–6.42)), as well as a reduced risk of atrial fibrillation (OR=3.62 (95% CI 1.88–7.36)). The TT (ff) genotype was associated with a reduced risk of coronary heart disease (OR=3.67 (95% CI 1.27–9.61)) and atrial fibrillation (OR=3.78 (95% CI 1.83–8.83)). An increased risk of atrial fibrillation was associated with the CC (FF) genotype (OR=4.93 (95% CI 1.12–9.31)).

**Conclusion.** A high prevalence of rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) polymorphisms in the VDR gene was established among patients with arterial hypertension and overweight and healthy individuals of the control group. Two polymorphisms associated with an increase/decrease risk of arterial hypertension and cardiovascular complications (coronary heart disease, atrial fibrillation) were identified in the VDR gene: rs1544410 (BsmI) polymorphism and rs2228570 (FokI) polymorphism.

**Keywords:** arterial hypertension, cardiovascular complications, vitamin D receptor, gene, polymorphism

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Ишемическая болезнь сердца (ИБС), фибрилляция предсердий (ФП), инсульт являются распространенными осложнениями артериальной гипертензии (АГ), так как по мере прогрессирования АГ происходят структурные и/или функциональные изменения в различных органах и системах, в том числе повреждение сосудов и поражение органов сердечно-сосудистой системы с прогрессированием хронической сердечной недостаточности (ХСН). Несмотря на достижения в медицинских технологиях, по-прежнему актуальными остаются вопросы совершенствования методов профилактики, диагностики, лечения, прогнозирования и контроля АГ и ее осложнений. К факторам риска, которые способствуют развитию АГ и сердечно-сосудистых осложнений, традиционно относят возраст, пол, несбалансированное питание, избыточный вес, ожирение, злоупотребление алкоголем, курение, дефицит витамина D, отсутствие физической активности, психологический стресс, социально-экономические факторы и недостаточный доступ к оказанию специфической медицинской помощи в системе здравоохранения [1–3].

В организме человека витамин D выполняет множество функций, принимая участие в различных физиологических процессах. Играя важную роль в регуляции уровней кальция и фосфора, витамин D контролирует минеральный обмен в костной ткани, выступая также в качестве фактора, регулирующего транскрипцию генов, участвует в антиоксидантной защите, оказывает влияние на пролиферацию клеток, иммуномодуляцию, онкогенез, эндотелиальную функцию, секрецию инсулина, воспалительные реакции, модулирует активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), которая принимает участие в регуляции артериального давления [1, 4–6].

Многочисленные исследования подтверждают, что дефицит витамина D и/или альтерация его метаболизма приводят к нарушению кальциевого обмена и развитию заболеваний (рахит, остеопороз, остеоартрит алопеция и др.). При этом многообразии физиологических процессов, в которых ключевая роль принадлежит витамину D, определило вектор для исследований, направленных на изучение его роли в развитии не только патологий опорно-двигательного аппарата, но и таких заболеваний, как сахарный диабет, метаболический синдром и ожирение, сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия, злокачественные новообразования, нейродегенеративные заболевания и др. [7–14].

Одним из механизмов, лежащих в основе взаимосвязи между развитием АГ и нарушением метаболизма и/или функций витамина D, является участие его активной изоформы (кальцитриол, 1,25-дигидроксивитамин D или 1,25-(OH)<sub>2</sub>D) в регуляции РААС путем ингибирования экспрессии гена, кодирующего ренин – ключевой компонент в контроле артериального давления. Кроме того, с учетом способности витамина D регулировать иммунные реакции и его противовоспалительной активности, нарушение метаболизма и/или функций витамина D связано с запуском опосредованных цитокинами воспалительных процессов, которые приводят к эндотелиальной дисфункции, повышению жесткости сосудов, усилению процессов атеросклероза, что способствует повышению артериального давления и развитию АГ и сердечно-сосудистых заболеваний. Одним из эффектов витамина D является ингибирование продукции сосудистого эндотелиального фактора роста, что приводит к замедлению ангиогенеза и снижению образования и роста атеросклеротических бляшек, обеспечивая тем самым снижение риска ИБС, инфаркта миокарда, АГ. Именно поэтому дефицит витамина D относят к потенциальным факторам риска развития АГ и ее осложнений [15, 16].

Витамин D оказывает свое действие посредством связывания с ядерным рецептором витамина D (VDR – vitamin D receptor), который присутствует в большинстве клеток организма. Находясь в цитоплазме или на цитоплазматической мембране, белок VDR специфически связывает активную форму витамина D, подвергается гетеродимеризации с образованием комплекса, который связывается с промоторными областями таргетных генов, регулируя их экспрессию и контролируя синтез факторов, модулирующих в клетках различных типов процессы пролиферации, дифференцировки, метаболизма, транспорта ионов, апоптоза и т. д. [17–20].

VDR является членом суперсемейства ядерных гормональных рецепторов лиганд-индуцируемых факторов транскрипции, на работу которого влияют внутренние факторы (генетические особенности, гормональный профиль, наличие патологических процессов, диета и др.) и внешние воздействия (уровень инсоляции, качество воды и питания и др.) [15, 16, 21, 22].

Белок VDR состоит из N-концевого ДНК-связывающего домена (DBD – DNA-binding domain) и C-концевого лиганд-связывающего домена (LBD – ligand-binding domain). Другие функциональные домены VDR обеспечивают его связывание с кофакторами и гетеродимеризацию с рецептором ретиноида X (RXR – retinoid X receptor). Действуя как транскриптор, VDR связывается с лигандом, проникает в ядро, образует гетеродимер с RXR, связывается с кофакторами и активирует таргетные гены. Нарушение какого-либо из этих этапов (например, при возникновении мутаций в гене VDR) приводит к отклонениям в обменных процессах и развитию патологии [23, 24].



Ген VDR имеет размер 75 кб, расположен на длинном плече 12-й хромосомы (локус 12q13.11) и включает 5 промоторных областей, 9 экзонов и 8 интронов. Данный ген относят к высокополиморфным, так как для него зарегистрировано более 500 аллельных вариантов, большая часть из которых не связана с изменением структуры и/или функций белка VDR и не ассоциирована с развитием патологических процессов. В то же время для ряда полиморфных вариантов гена VDR были выявлены ассоциации с изменением активности самого гена VDR (изменения его структуры и функционального состояния) или его регуляторной функции (изменение уровней экспрессии таргетных генов, регулируемых VDR). Таким образом, полиморфизмы потенциально могут влиять на экспрессию самого гена VDR, стабильность мРНК, структуру и функции белка VDR. Например, полиморфизм в иницирующем кодоне гена VDR приводит к образованию альтернативного сайта начала трансляции и изменению длины белкового продукта. Для ряда полиморфизмов описаны альтернативные варианты сплайсинга с образованием новых вариантов транскрипта и синтезом различных изоформ белка VDR [25, 26].

Ген VDR широко экспрессируется в клетках различных органов и тканей (кишечник, костная ткань, почки, парашитовидные железы, мозг, молочные железы, простата, сосуды, клетки иммунной системы и др.), поэтому многие исследования направлены на изучение ассоциации полиморфизмов в гене VDR с развитием и прогрессированием различных заболеваний. Результаты исследований, направленных на изучение ассоциации полиморфизмов в гене VDR с возникновением АГ и риском развития сердечно-сосудистых осложнений, часто противоречивы, и точные механизмы, лежащие в основе влияния полиморфных вариантов гена VDR на патогенез АГ и сердечно-сосудистых осложнений, до конца не изучены. Выявленные при локальных исследованиях ассоциации полиморфизмов в гене VDR с развитием АГ и сердечно-сосудистых осложнений в ходе проведения метаанализов зачастую не подтверждаются для объединенных смешанных популяций. Противоречия в результатах исследований, возможно, связаны с особенностями распределения полиморфных вариантов гена VDR в различных расовых, этнических, популяционных группах [5, 15, 20].

В гене VDR выделяют 4 широко распространенных полиморфизма, которые были проанализированы в ассоциации с различными патологическими процессами и для которых была установлена частота минорного аллеля (MAF – minor allele frequency) более 10% (табл. 1).

**Таблица 1**  
**Полиморфизмы с высокой частотой минорного аллеля в гене VDR**  
**Table 1**  
**Polymorphisms with high frequency of minor allele in the VDR gene**

| № rs      | Фермент рестрикции | Замена нуклеотида | Аллель (минорный (a) / мажорный (A)) | Положение в гене | Положение в нуклеотидной последовательности |
|-----------|--------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------|---------------------------------------------|
| rs7975232 | Apal               | c.1025–49A>C      | A>a                                  | 8-й интрон       | 47845054                                    |
| rs1544410 | BsmI               | c.1024 + 283G>A   | B>b                                  | 8-й интрон       | 47846052                                    |
| rs2228570 | FokI               | c.2T>C            | f>F                                  | 2-й экзон        | 47879112                                    |
| rs731236  | TaqI               | c.1056T>C         | T>t                                  | 9-й экзон        | 47844974                                    |

Полиморфизмы rs7975232 (ApaI) и rs1544410 (BsmI) находятся в 8-м интроне и не оказывают влияния на аминокислотную последовательность и структуру белка VDR. Полиморфизм rs731236 (TaqI) находится в 9-м экзоне и является синонимичной заменой, которая не приводит к изменению аминокислотной последовательности (Ile352Ile) белкового продукта. Данные полиморфизмы обнаруживаются в 3'-С-концевой области гена VDR, который несет короткие и длинные микросателлитные последовательности, поэтому считается, что данные полиморфизмы влияют на трансляционную активность гена VDR и стабильность мРНК [5, 25, 26].

Полиморфизм rs2228570 (FokI) находится в экзоне 2 и приводит к изменению длины белка VDR. Минорный вариант f (аллель T) кодирует образование полного белка, состоящего из 427 аминокислот, с более низкой биологической активностью по сравнению с таковым белка, кодируемого полиморфной формой, несущей мажорный вариант F (аллель C). Полиморфный вариант гена приводит к синтезу более короткого белкового продукта из 424 аминокислот с повышенной активностью. Белок VDR у пациентов с гомозиготным мажорным (FF) генотипом обладает повышенной активностью по сравнению с белками пациентов носителей гетерозиготных (Ff) или гомозиготных минорных (ff) вариантов. В ряде исследований было показано, что для пациентов с генотипом FF характерно развитие дефицита витамина D [5, 25, 27].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести оценку распространенности однонуклеотидных полиморфизмов rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене рецептора витамина D (VDR) и выявить их ассоциацию с риском развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с АГ и избыточной массой тела.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены пациенты (n=231) в возрасте 40 лет и старше с установленным диагнозом «артериальная гипертензия», находившиеся на лечении в УЗ «2-я городская клиническая больница» г. Минска. Критерии включения пациентов в исследование: возраст старше 40 лет; наличие артериальной гипертензии; индекс массы тела (ИМТ) более 25 кг/м<sup>2</sup>.

После обследования пациенты были распределены на 2 группы: основную группу (n=175) составили пациенты, имеющие сердечно-сосудистые осложнения, а группу сравнения (n=56) – пациенты, не имеющие сердечно-сосудистых осложнений. В контрольную группу были включены практически здоровые пациенты (n=18) старше 50 лет, без артериальной гипертензии и с ИМТ менее 25 кг/м<sup>2</sup>. Медиана возраста в основной группе составила 63,5 года, в группе сравнения – 59,5 года; в контрольной группе – 58,0 года.

Все пациенты, включенные в исследование, подвергались общеклиническому объективному осмотру с опросом и сбором анамнеза. В исследовании учитывались пол, возраст, масса тела, ИМТ, сопутствующие заболевания, прогрессирование АГ, наличие сердечно-сосудистых осложнений (фибрилляция предсердий (ФП), хроническая сердечная недостаточность (ХСН), ишемическая болезнь сердца (ИБС)).

В качестве биологического материала у пациентов проводили взятие периферической крови в объеме не менее 3 мл. Кровь забирали в стерильные вакуумные пробирки («МиниМед», РФ). В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия



или ЭДТА. Выделение ДНК из крови проводили с использованием набора реагентов NucleoSpin Blood QuickPure (Macherey-Nagel). Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific) ( $A_{260/280}$ ).

ДНК, выделенную из биологического материала пациентов, использовали для амплификации фрагментов гена VDR. Амплификацию образцов проводили в конечном объеме смеси 25 мкл с использованием 12,5 мкл «ArtMix Форез ДНК-полимераза» («АртБиоТех», Республика Беларусь); 0,2 мкл смеси эквивалентных концентраций прямого и обратного праймеров; 0,5 мкл красителя ZubrGreen для ПЦР-РВ («Прайм-тех», Республика Беларусь); 8,8 мкл деионизированной воды, 3 мкл выделенной ДНК.

Амплификацию ДНК проводили с применением специфических пар праймеров (прямого (F – Forward) и обратного (R – Reverse)); последовательности праймеров и ферменты, использованные в ходе рестрикционного анализа, приведены в табл. 2 [28–30].

**Таблица 2**  
**Последовательности праймеров и ферменты для рестрикции фрагментов гена VDR**  
**Table 2**  
**Primers sequences and enzymes for VDR gene fragments restriction**

| № rs      | Фермент рестрикции | Последовательность праймера  | Температура отжига | Длина фрагмента |
|-----------|--------------------|------------------------------|--------------------|-----------------|
| rs7975232 | ApaI               | F-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG     | 64                 | 745             |
|           |                    | R-ACTCCTCATGGCTGAGGTCTCA     |                    |                 |
| rs1544410 | BsmI               | F-GACCTGTGGCAACCAAGACT       | 62                 | 831             |
|           |                    | R-AACCAGCGGAAGAGGTCAAG       |                    |                 |
| rs2228570 | FokI               | F-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCT | 69                 | 267             |
|           |                    | R-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCCCTC  |                    |                 |
| rs731236  | TaqI               | F-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA      | 68                 | 832             |
|           |                    | R-AGGCAGCGGTGGAGGCATCTCT     |                    |                 |

**Таблица 3**  
**Длина продуктов амплификации, вариант генотипа и длина продуктов рестрикции фрагментов гена VDR**  
**Table 3**  
**Length of amplification products, genotype variant and length of VDR gene fragments restriction products**

| № rs      | Фермент рестрикции | Длина фрагмента (п. о.) | Вариант генотипа | Длина фрагментов после рестрикции (п. о.) |
|-----------|--------------------|-------------------------|------------------|-------------------------------------------|
| rs7975232 | ApaI               | 745                     | AA (AA)          | 745                                       |
|           |                    |                         | AC (Aa)          | 745+528+217                               |
|           |                    |                         | CC (aa)          | 528+217                                   |
| rs1544410 | BsmI               | 831                     | GG (BB)          | 655+176                                   |
|           |                    |                         | GA (Bb)          | 831+655+176                               |
|           |                    |                         | AA (bb)          | 831                                       |
| rs2228570 | FokI               | 267                     | TT (ff)          | 197+70                                    |
|           |                    |                         | TC (fF)          | 267+197+70                                |
|           |                    |                         | CC (FF)          | 267                                       |
| rs731236  | TaqI               | 832                     | TT (TT)          | 494+338                                   |
|           |                    |                         | TC (Tt)          | 494+338+293+201                           |
|           |                    |                         | CC (tt)          | 338+293+201                               |

Для амплификации использовали прибор QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific). С целью идентификации уровней амплификации специфических и неспецифических фрагментов проводили анализ кривых плавления и электрофоретический анализ полученных ампликонов.

Далее проводили рестрикцию амплифицированных фрагментов с использованием ферментов: Apal (SibEnzyme, РФ), PctI (аналог BsmI) (SibEnzyme, РФ), FokI (SibEnzyme, РФ), TaqI (SibEnzyme, РФ) (табл. 3). Анализ результатов рестрикции амплифицированных фрагментов проводили методом электрофоретического анализа в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась при помощи компьютерной программы Statistica 10. Для категориальных признаков статистический анализ осуществляли с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. При уровне значимости  $p < 0,05$  различия считались статистически достоверными. Для описания частоты выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения. Для сравнения исследуемых групп по частоте выявления факторов риска использовали расчет отношения шансов (ОШ), расчет показателей проводили с использованием онлайн-калькулятора medstatistic.ru.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После проведения клинического обследования пациенты с АГ были разделены на группы на основании наличия/отсутствия в анамнезе проявлений сердечно-сосудистых осложнений: ИБС (инфаркт миокарда, стенокардия, реваскуляризация), ФП, стадия ХСН по классификации Н.Д. Стражеско, В.Х. Василенко (табл. 4).

У обследованных пациентов с АГ и избыточной массой тела сердечно-сосудистые осложнения были выявлены в 75,76% случаев (n=175), наиболее распространенным осложнением была ИБС (72,73%, n=168).

В образцах ДНК, выделенной из крови пациентов, проводили определение 4 полиморфизмов в гене VDR: rs7975232 (Apal), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI). Полученные результаты распространенности изученных полиморфизмов

**Таблица 4**  
**Результаты распределения пациентов с АГ по группам в зависимости от наличия осложнений (n=231)**  
**Table 4**  
**Results of patients with hypertension distribution into groups depending on the presence of complications (n=231)**

| Показатель                                                           | Группа         | Частота выявления |       |
|----------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------|-------|
|                                                                      |                | n                 | %     |
| Сердечно-сосудистые осложнения (ИБС и/или ФП и/или ХСН 2А-2Б стадия) | с осложнениями | 175               | 75,76 |
|                                                                      | без осложнений | 56                | 24,24 |
| ИБС                                                                  | без ИБС        | 63                | 27,27 |
|                                                                      | с ИБС          | 168               | 72,73 |
| Фибрилляция предсердий                                               | без ФП         | 132               | 57,14 |
|                                                                      | с ФП           | 99                | 42,86 |
| ХСН                                                                  | 0–1-я стадия   | 141               | 61,04 |
|                                                                      | 2А–2Б стадия   | 90                | 38,96 |



**Таблица 5**

**Результаты выявления полиморфизмов в гене VDR у обследованных пациентов с АГ и избыточной массой тела и лиц контрольной группы**

**Table 5**

**Results of polymorphisms in the VDR gene detection in examined patients with hypertension and overweight and in control group subjects**

| Полиморфизм      | Генотип/Аллель | Распространенность полиморфизма |       |                           |       | Значения $\chi^2$ и p     |
|------------------|----------------|---------------------------------|-------|---------------------------|-------|---------------------------|
|                  |                | Пациенты с АГ (n=231)           |       | Контрольная группа (n=18) |       |                           |
|                  |                | n                               | %     | n                         | %     |                           |
| rs7975232 (ApaI) | Генотип        |                                 |       |                           |       | $\chi^2=0,049$<br>p=0,98  |
|                  | AA (AA)        | 84                              | 36,36 | 7                         | 38,89 |                           |
|                  | AC (Aa)        | 108                             | 46,75 | 8                         | 44,44 |                           |
|                  | CC (aa)        | 39                              | 16,88 | 3                         | 16,67 |                           |
|                  | Аллель         | n=462                           |       | n=36                      |       | $\chi^2=0,41$<br>p=0,88   |
|                  | A (A)          | 276                             | 59,74 | 22                        | 61,11 |                           |
|                  | C (a)          | 186                             | 40,26 | 14                        | 38,89 |                           |
| rs1544410 (BsmI) | Генотип        |                                 |       |                           |       | $\chi^2=16,69$<br>p<0,001 |
|                  | GG (BB)        | 81                              | 35,06 | 3                         | 16,67 |                           |
|                  | GA (Bb)        | 119                             | 51,52 | 6                         | 33,33 |                           |
|                  | AA (bb)        | 31                              | 13,42 | 9                         | 50,00 |                           |
|                  | Аллель         | n=462                           |       | n=36                      |       | $\chi^2=10,42$<br>p=0,001 |
|                  | G (B)          | 281                             | 60,82 | 12                        | 33,33 |                           |
|                  | A (b)          | 181                             | 39,18 | 24                        | 66,67 |                           |
| rs2228570 (FokI) | Генотип        |                                 |       |                           |       | $\chi^2=2,13$<br>p=0,35   |
|                  | TT (ff)        | 35                              | 15,15 | 5                         | 27,78 |                           |
|                  | TC (fF)        | 109                             | 47,19 | 8                         | 44,44 |                           |
|                  | CC (FF)        | 87                              | 37,66 | 5                         | 27,78 |                           |
|                  | Аллель         | n=462                           |       | n=36                      |       | $\chi^2=1,77$<br>p=0,18   |
|                  | T (f)          | 179                             | 38,74 | 18                        | 50,00 |                           |
|                  | C (F)          | 283                             | 61,26 | 18                        | 50,00 |                           |
| rs731236 (TaqI)  | Генотип        |                                 |       |                           |       | $\chi^2=2,02$<br>p=0,36   |
|                  | TT (TT)        | 96                              | 41,56 | 5                         | 27,78 |                           |
|                  | TC (Tt)        | 106                             | 45,89 | 9                         | 50,00 |                           |
|                  | CC (tt)        | 29                              | 12,55 | 4                         | 22,22 |                           |
|                  | Аллель         | n=462                           |       | n=36                      |       | $\chi^2=1,98$<br>p=0,16   |
|                  | T (T)          | 298                             | 64,50 | 19                        | 52,78 |                           |
|                  | C (t)          | 164                             | 35,50 | 17                        | 47,22 |                           |

среди пациентов с АГ и избыточной массой тела и практически здоровых лиц контрольной группы представлены в табл. 5.

В ходе идентификации полиморфизма rs7975232 (ApaI) в гене VDR среди обследованных пациентов всех групп было установлено доминирование аллеля A (A), доминирующими геновариантами были гетерозиготный AC (Aa) и гомозиготный AA (AA). Достоверных отличий по распространенности различных генотипов, а также аллелей для данного полиморфизма между группами обследованных пациентов установлено не было (p>0,05), что согласуется с данными литературных источников. Так, по результатам метаанализа, проведенного Zhu Y.B. и соавт., не было выявлено

достоверной корреляции между полиморфизмом rs7975232 (ApaI) в гене VDR и восприимчивостью к АГ и/или сердечно-сосудистым заболеваниям [5].

У пациентов с АГ и избыточной массой тела при изучении полиморфизма rs1544410 (BsmI) доминирующим был аллель G (B), распространенность которого у пациентов данной группы была достоверно выше ( $p=0,001$ ) в сравнении с пациентами контрольной группы, у которых доминирующим был аллель A (b). Генотипы GG (BB) и GA (Bb) достоверно чаще были выявлены у пациентов с АГ и избыточной массой тела ( $p<0,001$ ), а у пациентов контрольной группы в качестве доминирующего был идентифицирован гомозиготный генотип AA (bb) (50,00% случаев). Таким образом, генотип AA (bb) и аллель A (b), которые распространены среди пациентов контрольной группы без АГ, можно рассматривать как протективный фактор, в то время как аллель G (B) и генотипы GG (BB) и GA (Bb) можно отнести к факторам риска развития АГ.

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, согласуются с данными, представленными в источниках литературы. Так, Zhu Y.B. и соавт. при проведении метаанализа подтвердили, что частота генотипа AA (BsmI) в гене VDR была ниже у пациентов с АГ по сравнению с таковой у здоровых пациентов контрольной группы. В метаанализ были включены исследования, проведенные в разных странах для людей из различных популяций, поэтому авторами был сделан вывод, что в большинстве популяций носители генотипа AA в составе полиморфизма rs1544410 (BsmI) в гене VDR имеют более низкий риск развития АГ по сравнению с носителями генотипов GA или GG [5].

При изучении частоты встречаемости полиморфизма rs2228570 (FokI) в гене VDR доминирующим генотипом во всех группах пациентов (более 40% образцов в каждой группе) был генотип TC (ff). Высокая распространенность генотипа CC (FF) была выявлена у пациентов с АГ и избыточной массой тела (37,66% случаев). Для пациентов контрольной группы было зафиксировано увеличение частоты встречаемости генотипа TT (ff) (27,78% случаев). Достоверных отличий по распространенности различных генотипов, а также аллелей для данного полиморфизма между группами обследованных пациентов установлено не было ( $p>0,05$ ).

Необходимо отметить, что на основании метаанализа, включающего ряд исследований, проведенных в разных странах, Zhu Y.B. и соавт. подтвердили ассоциацию минорного аллеля T (f) в составе полиморфизма rs2228570 (FokI) со снижением риска развития АГ для смешанной популяции [5]. Однако в ходе проведенного нами исследования для полиморфизма rs2228570 (FokI) не была подтверждена ассоциация какого-либо из генотипов или аллелей с восприимчивостью к АГ в группах пациентов, включенных в исследование, несмотря на то, что среди обследованных пациентов также прослеживалась тенденция к увеличению частоты аллеля T (f) (ОШ=1,58 (95% ДИ 0,81–3,12)) и генотипа TT (ff) (ОШ=2,12 (95% ДИ 0,72–6,42)) у пациентов контрольной группы, которая не была статистически значимой.

Анализ данных по распространенности полиморфизма rs731236 (TaqI) в гене VDR позволил установить, что доминирующим генотипом во всех группах пациентов (более 45% образцов в каждой группе) был генотип TC (ff). Высокая распространенность генотипа TT (ff) была выявлена у пациентов с АГ и избыточной массой тела (41,56% случаев). Для пациентов контрольной группы было выявлено равновеликое распределение частоты гомозиготных генотипов TT (ff) (27,78% случаев) и CC (FF) (22,22%



случаев). Достоверных отличий по распространенности различных генотипов, а также аллелей для данного полиморфизма между группами обследованных пациентов установлено не было ( $p>0,05$ ).

В ходе дальнейшего анализа полученных данных проводили выявление ассоциаций полиморфизмов в гене VDR с развитием сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с АГ и избыточной массой тела. Полученные результаты распределения частот полиморфизмов и результаты статистического анализа представлены в табл. 6.

**Таблица 6**  
**Результаты выявления полиморфизмов rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене VDR у пациентов с АГ (n=231)**  
**Table 6**  
**Results of polymorphisms rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) in the VDR gene detection in patients with hypertension (n=231)**

| Полиморфизм      | Генотип/Аллель | Распространенность полиморфизма                      |       |                                                    |       | Значения $\chi^2$ и p    |
|------------------|----------------|------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------|-------|--------------------------|
|                  |                | Пациенты с сердечно-сосудистыми осложнениями (n=175) |       | Пациенты без сердечно-сосудистых осложнений (n=56) |       |                          |
|                  |                | n                                                    | %     | n                                                  | %     |                          |
| rs7975232 (ApaI) | Генотип        |                                                      |       |                                                    |       | $\chi^2=0,2$<br>p=0,91   |
|                  | AA (AA)        | 65                                                   | 37,14 | 19                                                 | 33,93 |                          |
|                  | AC (Aa)        | 81                                                   | 46,29 | 27                                                 | 48,21 |                          |
|                  | CC (aa)        | 29                                                   | 16,57 | 10                                                 | 17,86 | $\chi^2=0,31$<br>p=0,93  |
|                  | Аллель         | n=350                                                |       | n=112                                              |       |                          |
|                  | A (A)          | 211                                                  | 60,29 | 65                                                 | 58,04 |                          |
|                  | C (a)          | 139                                                  | 39,71 | 47                                                 | 41,96 |                          |
| rs1544410 (BsmI) | Генотип        |                                                      |       |                                                    |       | $\chi^2=6,51$<br>p=0,039 |
|                  | GG (BB)        | 54                                                   | 30,86 | 27                                                 | 48,21 |                          |
|                  | GA (Bb)        | 98                                                   | 56,00 | 21                                                 | 37,50 |                          |
|                  | AA (bb)        | 23                                                   | 13,14 | 8                                                  | 14,29 | $\chi^2=2,34$<br>p=0,13  |
|                  | Аллель         | n=350                                                |       | n=112                                              |       |                          |
|                  | G (B)          | 206                                                  | 58,86 | 75                                                 | 66,96 |                          |
|                  | A (b)          | 144                                                  | 41,14 | 37                                                 | 33,04 |                          |
| rs2228570 (FokI) | Генотип        |                                                      |       |                                                    |       | $\chi^2=1,16$<br>p=0,56  |
|                  | TT (ff)        | 26                                                   | 14,86 | 9                                                  | 16,07 |                          |
|                  | TC (fF)        | 86                                                   | 49,14 | 23                                                 | 41,07 |                          |
|                  | CC (FF)        | 63                                                   | 36,00 | 24                                                 | 42,86 | $\chi^2=1,32$<br>p=0,37  |
|                  | Аллель         | n=350                                                |       | n=112                                              |       |                          |
|                  | T (f)          | 138                                                  | 39,43 | 41                                                 | 36,61 |                          |
|                  | C (F)          | 212                                                  | 60,57 | 71                                                 | 63,39 |                          |
| rs731236 (TaqI)  | Генотип        |                                                      |       |                                                    |       | $\chi^2=0,21$<br>p=0,87  |
|                  | TT (TT)        | 73                                                   | 41,71 | 23                                                 | 41,07 |                          |
|                  | TC (Tt)        | 81                                                   | 46,29 | 25                                                 | 44,64 |                          |
|                  | CC (tt)        | 21                                                   | 12,00 | 8                                                  | 14,29 | $\chi^2=0,43$<br>p=0,84  |
|                  | Аллель         | n=350                                                |       | n=112                                              |       |                          |
|                  | T (T)          | 227                                                  | 64,86 | 71                                                 | 63,39 |                          |
|                  | C (t)          | 123                                                  | 35,14 | 41                                                 | 36,61 |                          |

Для групп пациентов с сердечно-сосудистыми осложнениями (n=175) и без сердечно-сосудистых осложнений (n=56) с применением критерия  $\chi^2$  Пирсона было установлено наличие статистически значимых отличий в частоте выявления различных генотипов для полиморфизма rs1544410 (BsmI) ( $\chi^2=6,51$ ,  $p=0,039$ ). Генотип GG (BB) чаще был выявлен у пациентов без сердечно-сосудистых осложнений, а у пациентов с сердечно-сосудистыми осложнениями чаще встречался генотип GA (Bb). Для других изученных полиморфизмов не было установлено достоверных отличий в частоте выявления различных генотипов и аллелей ( $p>0,05$ ).

**Таблица 7**  
**Результаты выявления полиморфизмов rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене VDR у пациентов с ИБС и без ИБС (n=231)**  
**Table 7**  
**Results of polymorphisms rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) in the VDR gene detection in patients with and without coronary heart disease (n=231)**

| Полиморфизм      | Генотип/Аллель | Распространенность полиморфизма |       |                            |       | Значения $\chi^2$<br>и p |
|------------------|----------------|---------------------------------|-------|----------------------------|-------|--------------------------|
|                  |                | Пациенты с ИБС<br>(n=168)       |       | Пациенты без ИБС<br>(n=63) |       |                          |
|                  |                | n                               | %     | n                          | %     |                          |
| rs7975232 (ApaI) | Генотип        |                                 |       |                            |       |                          |
|                  | AA (AA)        | 62                              | 36,90 | 22                         | 34,92 | $\chi^2=0,081$<br>p=0,96 |
|                  | AC (Aa)        | 78                              | 46,43 | 30                         | 47,62 |                          |
|                  | CC (aa)        | 28                              | 16,67 | 11                         | 17,46 |                          |
|                  | Аллель         | n=336                           |       | n=126                      |       |                          |
|                  | A (A)          | 202                             | 60,12 | 74                         | 58,73 | $\chi^2=0,12$<br>p=0,92  |
|                  | C (a)          | 134                             | 39,88 | 52                         | 41,27 |                          |
| rs1544410 (BsmI) | Генотип        |                                 |       |                            |       |                          |
|                  | GG (BB)        | 54                              | 32,14 | 27                         | 42,86 | $\chi^2=8,65$<br>p=0,013 |
|                  | GA (Bb)        | 96                              | 57,14 | 23                         | 36,51 |                          |
|                  | AA (bb)        | 18                              | 10,71 | 13                         | 20,63 |                          |
|                  | Аллель         | n=336                           |       | n=126                      |       |                          |
|                  | G (B)          | 204                             | 60,71 | 77                         | 61,11 | $\chi^2=0,22$<br>p=0,81  |
|                  | A (b)          | 132                             | 39,29 | 49                         | 38,89 |                          |
| rs2228570 (FokI) | Генотип        |                                 |       |                            |       |                          |
|                  | TT (ff)        | 19                              | 11,31 | 16                         | 25,40 | $\chi^2=8,09$<br>p=0,017 |
|                  | TC (fF)        | 86                              | 51,19 | 23                         | 36,51 |                          |
|                  | CC (FF)        | 63                              | 37,50 | 24                         | 38,10 |                          |
|                  | Аллель         | n=336                           |       | n=126                      |       |                          |
|                  | T (f)          | 124                             | 36,90 | 55                         | 43,65 | $\chi^2=1,17$<br>p=0,56  |
|                  | C (F)          | 212                             | 63,10 | 71                         | 56,35 |                          |
| rs731236 (TaqI)  | Генотип        |                                 |       |                            |       |                          |
|                  | TT (TT)        | 71                              | 42,26 | 25                         | 39,68 | $\chi^2=0,13$<br>p=0,94  |
|                  | TC (Tt)        | 76                              | 45,24 | 30                         | 47,62 |                          |
|                  | CC (tt)        | 21                              | 12,50 | 8                          | 12,70 |                          |
|                  | Аллель         | n=336                           |       | n=126                      |       |                          |
|                  | T (T)          | 218                             | 64,88 | 80                         | 63,49 | $\chi^2=0,15$<br>p=0,91  |
|                  | C (t)          | 118                             | 35,12 | 46                         | 36,51 |                          |



В ходе дальнейшего анализа контингент пациентов с АГ и избыточной массой тела распределяли по группам в зависимости от наличия/отсутствия у них конкретных сердечно-сосудистых осложнений (ИБС, ФП, ХСН) с целью выявления их ассоциаций с полиморфизмами в гене VDR. Между группами пациентов с ИБС (n=168) и без ИБС (n=63) достоверные отличия в распространенности были выявлены для полиморфизмов rs1544410 (BsmI) ( $\chi^2=8,65$ ,  $p=0,013$ ) и rs2228570 (FokI) ( $\chi^2=8,09$ ,  $p=0,017$ ) (табл. 7).

Генотип AA (bb) в составе полиморфизма rs1544410 (BsmI) и генотип TT (ff) в составе полиморфизма rs2228570 (FokI) достоверно чаще встречались у пациентов

**Таблица 8**

**Результаты выявления полиморфизмов rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене VDR у пациентов с ФП и без ФП (n=231)**

**Table 8**

**Results of polymorphisms rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) in the VDR gene detection in patients with and without atrial fibrillation (n=231)**

| Полиморфизм      | Генотип/Аллель | Распространенность полиморфизма |       |                         |       | Значения $\chi^2$ и p    |
|------------------|----------------|---------------------------------|-------|-------------------------|-------|--------------------------|
|                  |                | Пациенты с ФП (n=99)            |       | Пациенты без ФП (n=132) |       |                          |
|                  |                | n                               | %     | n                       | %     |                          |
| rs7975232 (ApaI) | Генотип        |                                 |       |                         |       | $\chi^2=1,05$<br>p=0,59  |
|                  | AA (AA)        | 36                              | 36,36 | 48                      | 36,36 |                          |
|                  | AC (Aa)        | 49                              | 49,49 | 59                      | 44,70 |                          |
|                  | CC (aa)        | 14                              | 14,14 | 25                      | 18,94 | $\chi^2=1,24$<br>p=0,56  |
|                  | Аллель         | n=198                           |       | n=264                   |       |                          |
|                  | A (A)          | 121                             | 61,11 | 155                     | 58,71 |                          |
|                  | C (a)          | 77                              | 38,89 | 109                     | 41,29 |                          |
| rs1544410 (BsmI) | Генотип        |                                 |       |                         |       | $\chi^2=6,44$<br>p=0,04  |
|                  | GG (BB)        | 35                              | 35,35 | 46                      | 34,85 |                          |
|                  | GA (Bb)        | 57                              | 57,58 | 62                      | 46,97 |                          |
|                  | AA (bb)        | 7                               | 7,07  | 24                      | 18,18 | $\chi^2=2,33$<br>p=0,08  |
|                  | Аллель         | n=198                           |       | n=264                   |       |                          |
|                  | G (B)          | 127                             | 64,14 | 154                     | 58,33 |                          |
|                  | A (b)          | 71                              | 35,86 | 110                     | 41,67 |                          |
| rs2228570 (FokI) | Генотип        |                                 |       |                         |       | $\chi^2=6,26$<br>p=0,044 |
|                  | TT (ff)        | 11                              | 11,11 | 24                      | 18,18 |                          |
|                  | TC (fF)        | 42                              | 42,42 | 67                      | 50,76 |                          |
|                  | CC (FF)        | 46                              | 46,46 | 41                      | 31,06 | $\chi^2=3,06$<br>p=0,06  |
|                  | Аллель         | n=198                           |       | n=264                   |       |                          |
|                  | T (f)          | 64                              | 32,32 | 115                     | 43,56 |                          |
|                  | C (F)          | 134                             | 67,68 | 149                     | 56,44 |                          |
| rs731236 (TaqI)  | Генотип        |                                 |       |                         |       | $\chi^2=4,59$<br>p=0,11  |
|                  | TT (TT)        | 37                              | 37,37 | 59                      | 44,70 |                          |
|                  | TC (Tt)        | 53                              | 53,54 | 53                      | 40,15 |                          |
|                  | CC (tt)        | 9                               | 9,09  | 20                      | 15,15 | $\chi^2=0,12$<br>p=0,93  |
|                  | Аллель         | n=198                           |       | n=264                   |       |                          |
|                  | T (T)          | 127                             | 64,14 | 171                     | 64,77 |                          |
|                  | C (t)          | 71                              | 35,86 | 93                      | 35,23 |                          |

без ИБС. Для пациентов с ИБС наиболее распространенными были гетерозиготные генотипы GA (Bb) в составе rs1544410 (BsmI) и TC (fF) в составе rs2228570 (FokI). Для других изученных полиморфизмов не было установлено достоверных отличий в частоте выявления различных генотипов и аллелей ( $p>0,05$ ).

В результате анализа данных, полученных для групп пациентов с ФП ( $n=99$ ) и без ФП ( $n=132$ ), были установлены достоверные отличия в распространенности полиморфизмов rs1544410 (BsmI) ( $\chi^2=6,44$ ,  $p=0,04$ ) и rs2228570 (FokI) ( $\chi^2=6,26$ ,  $p=0,044$ ) (табл. 8).

**Таблица 9**  
**Результаты выявления полиморфизмов rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене VDR у пациентов с ХСН и без ХСН ( $n=231$ )**  
**Table 9**  
**Results of polymorphisms rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) in the VDR gene detection in patients with and without chronic heart failure ( $n=231$ )**

| Полиморфизм      | Генотип/Аллель | Распространенность полиморфизма |       |                             |       | Значения $\chi^2$<br>и p |
|------------------|----------------|---------------------------------|-------|-----------------------------|-------|--------------------------|
|                  |                | Пациенты с ХСН<br>(n=90)        |       | Пациенты без ХСН<br>(n=141) |       |                          |
|                  |                | n                               | %     | n                           | %     |                          |
| rs7975232 (ApaI) | Генотип        |                                 |       |                             |       | $\chi^2=2,19$<br>p=0,33  |
|                  | AA (AA)        | 31                              | 34,44 | 53                          | 37,59 |                          |
|                  | AC (Aa)        | 47                              | 52,22 | 61                          | 43,26 |                          |
|                  | CC (aa)        | 12                              | 13,33 | 27                          | 19,15 | $\chi^2=1,66$<br>p=0,71  |
|                  | Аллель         | n=180                           |       | n=282                       |       |                          |
|                  | A (A)          | 109                             | 60,56 | 167                         | 59,22 |                          |
|                  | C (a)          | 71                              | 39,44 | 115                         | 40,78 |                          |
| rs1544410 (BsmI) | Генотип        |                                 |       |                             |       | $\chi^2=2,75$<br>p=0,25  |
|                  | GG (BB)        | 29                              | 32,22 | 52                          | 36,88 |                          |
|                  | GA (Bb)        | 52                              | 57,78 | 67                          | 47,52 |                          |
|                  | AA (bb)        | 9                               | 10,00 | 22                          | 15,60 | $\chi^2=1,18$<br>p=0,85  |
|                  | Аллель         | n=180                           |       | n=282                       |       |                          |
|                  | G (B)          | 110                             | 61,11 | 171                         | 60,64 |                          |
|                  | A (b)          | 70                              | 38,89 | 111                         | 39,36 |                          |
| rs2228570 (FokI) | Генотип        |                                 |       |                             |       | $\chi^2=1,06$<br>p=0,56  |
|                  | TT (ff)        | 11                              | 12,22 | 24                          | 17,02 |                          |
|                  | TC (fF)        | 43                              | 47,78 | 66                          | 46,81 |                          |
|                  | CC (FF)        | 36                              | 40,00 | 51                          | 36,17 | $\chi^2=2,05$<br>p=0,55  |
|                  | Аллель         | n=180                           |       | n=282                       |       |                          |
|                  | T (f)          | 65                              | 36,11 | 114                         | 40,43 |                          |
|                  | C (F)          | 115                             | 63,89 | 168                         | 59,57 |                          |
| rs731236 (TaqI)  | Генотип        |                                 |       |                             |       | $\chi^2=3,61$<br>p=0,17  |
|                  | TT (TT)        | 42                              | 46,67 | 54                          | 38,30 |                          |
|                  | TC (Tt)        | 41                              | 45,56 | 65                          | 46,10 |                          |
|                  | CC (tt)        | 7                               | 7,78  | 22                          | 15,60 | $\chi^2=4,01$<br>p=0,11  |
|                  | Аллель         | n=180                           |       | n=282                       |       |                          |
|                  | T (T)          | 125                             | 69,44 | 173                         | 61,35 |                          |
|                  | C (t)          | 55                              | 30,56 | 109                         | 38,65 |                          |



У пациентов без ФП уровень распространенности генотипа AA (bb) в составе полиморфизма rs1544410 (BsmI) и генотипов TT (ff) и TC (fF) в составе полиморфизма rs2228570 (FokI) был выше, чем у пациентов с ФП. Для пациентов с ФП наиболее распространенными были генотип GA (Bb) в составе rs1544410 (BsmI) и генотип CC (FF) в составе rs2228570 (FokI). Для других изученных полиморфизмов не было установлено достоверных отличий в частоте выявления различных генотипов и аллелей ( $p > 0,05$ ).

В ходе анализа результатов, полученных для групп пациентов, разделенных в зависимости от стадии ХСН, не было выявлено статистически значимых отличий в распространенности изученных полиморфизмов между группами пациентов без ХСН (0–1-я стадии ( $n=141$ )) и с ХСН (2А и 2Б стадии ( $n=90$ )) (табл. 9).

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения исследования установлен высокий уровень распространенности полиморфизмов rs7975232 (ApaI), rs1544410 (BsmI), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI) в гене VDR среди пациентов с АГ и избыточной массой тела и здоровых лиц контрольной группы. Выявлено 2 полиморфизма в гене VDR, которые ассоциированы с увеличением/снижением риска развития АГ и сердечно-сосудистых осложнений (ИБС, ФП): полиморфизм rs1544410 (BsmI) и полиморфизм rs2228570 (FokI).

На основании анализа полученных данных установлено, что аллель G (B) и генотипы GG (BB) и GA (Bb) в составе полиморфизма rs1544410 (BsmI) в гене VDR ассоциированы с увеличением риска развития АГ, так как данные геноварианты достоверно чаще встречались у пациентов с АГ и избыточной массой тела в сравнении с таковой у пациентов контрольной группы. У пациентов с генотипами GG (BB) и GA (Bb) риск развития АГ увеличивался в 6,42 раза (95% ДИ 2,38–14,51) в сравнении с пациентами – носителями генотипа и AA (bb). Для генотипа GA (Bb) была также выявлена ассоциация с развитием сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с АГ и избыточной массой тела, частота выявления данного генотипа была выше среди пациентов с ИБС (ОШ=3,32 (95% ДИ 1,28–6,21)) и ФП (ОШ=3,53 (95% ДИ 1,21–5,59)). Генотип GG (BB) был ассоциирован со снижением риска развития сердечно-сосудистых осложнений, частота его выявления была выше среди пациентов без ИБС (ОШ=4,58 (95% ДИ 1,87–8,87)).

Генотип AA (bb) и аллель A (b) в составе полиморфизма rs1544410 (BsmI) в гене VDR были ассоциированы со снижением риска развития АГ (ОШ=6,42 (95% ДИ 2,38–14,51)), их распространенность была выше у пациентов контрольной группы. Также генотип AA (bb) был ассоциирован со снижением риска развития ИБС (ОШ=4,17 (95% ДИ 1,99–9,74)) и ФП (ОШ=4,92 (95% ДИ 1,21–9,09)), его частота была выше в группах пациентов без ИБС и без ФП.

Таким образом, для полиморфизма rs1544410 (BsmI) установлено, что генотип GG (BB), с одной стороны, ассоциирован с увеличением риска развития АГ, а с другой – со снижением риска развития сердечно-сосудистых осложнений (ИБС) у пациентов с АГ и избыточной массой тела; генотип GA (Bb) ассоциирован с увеличением риска развития как АГ, так и таких сердечно-сосудистых осложнений, как ИБС и ФП; генотип AA (bb) ассоциирован со снижением риска развития АГ и сердечно-сосудистых осложнений (ИБС и ФП).

Для аллеля T (f) и генотипа TT (ff) в составе полиморфизма rs2228570 (FokI) ассоциация со снижением риска развития АГ не была подтверждена в ходе статистического

анализа полученных данных. Генотип TC (ff) был ассоциирован с увеличением риска развития ИБС (ОШ=3,12 (95% ДИ 0,92–6,42)), а также со снижением риска развития ФП (ОШ=3,62 (95% ДИ 1,88–7,36)). Для генотипа TT (ff) была установлена ассоциация со снижением риска развития ИБС (ОШ=3,67 (95% ДИ 1,27–9,61)) и ФП (ОШ=3,78 (95% ДИ 1,83–8,83)). Увеличение риска развития ФП было ассоциировано с генотипом CC (FF) (ОШ=4,93 (95% ДИ 1,12–9,31)).

Таким образом, для полиморфизма rs2228570 (FokI) установлено, что у пациентов с АГ и избыточной массой тела генотип TT (ff) ассоциирован со снижением риска развития таких сердечно-сосудистых осложнений, как ИБС и ФП; генотип TC (ff) ассоциирован с увеличением риска развития ИБС, но со снижением риска развития ФП; генотип CC (FF) ассоциирован с увеличением риска ФП.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Rojo-Tolosa S., Márquez-Pete N., Gálvez-Navas J.M., et al. Single Nucleotide Polymorphisms in the Vitamin D Metabolic Pathway and Their Relationship with High Blood Pressure Risk. *Int J Mol Sci.* 2023;24(6):5974. doi: 10.3390/ijms24065974
2. Visseren F.L.J., Mach F., Smulders Y.M., et al. ESC National Cardiac Societies; ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J.* 2021;42(34):3227–3337. doi: 10.1093/eurheartj/ehab484
3. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet.* 2021;398(10304):957–980. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01330-1
4. Nunes I.F.O.C., Cavalcante A.A.C.M., Alencar M.V.O.B., et al. Meta-Analysis of the Association Between the rs228570 Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Arterial Hypertension Risk. *Adv Nutr.* 2020;11(5):1211–1220. doi: 10.1093/advances/nmaa076
5. Zhu Y.B., Li Z.Q., Ding N., et al. The association between vitamin D receptor gene polymorphism and susceptibility to hypertension: a meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(20):9066–9074. doi: 10.26355/eurrev\_201910\_19309
6. Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B., et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004;338(2):143–56. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.014
7. Imani D., Razi B., Motallebnezhad M., et al. Association between vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and the risk of multiple sclerosis (MS): an updated meta-analysis. *BMC Neurol.* 2019;19(1):339. doi: 10.1186/s12883-019-1577-y
8. Makoui M.H., Imani D., Motallebnezhad M., et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and susceptibility to asthma: Meta-analysis based on 17 case-control studies. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2020;124(1):57–69. doi: 10.1016/j.anaai.2019.10.014
9. Liu H., He H., Li S., et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of osteoarthritis: a meta-analysis. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(5):559–67. doi: 10.1177/1535370213514920
10. Izzo M., Carrizzo A., Izzo C., et al. Vitamin D: Not Just Bone Metabolism but a Key Player in Cardiovascular Diseases. *Life (Basel).* 2021;11(5):452. doi: 10.3390/life11050452
11. Köstner K., Denzer N., Müller C.S., et al. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res.* 2009;29(9):3511–36.
12. Gnagnarella P., Raimondi S., Aristarco V., et al. Vitamin D Receptor Polymorphisms and Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1268:53–114. doi: 10.1007/978-3-030-46227-7\_4
13. Wysoczańska-Klaczynska A., Słezak A., Hetman M., et al. The impact of VDR gene polymorphisms on obesity, metabolic changes, bone mass disorders and neoplastic processes. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2018;24(2):96–105. doi: 10.18544/PEDM-24.02.0108. (in Polish)
14. Pal R., Choudhury S., Kumar H., et al. Vitamin D deficiency and genetic polymorphisms of vitamin D-associated genes in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2023;58(5):3362–3377. doi: 10.1111/ejn.16098
15. Kunutsor S.K., Burgess S., Munroe P.B., et al. Vitamin D and high blood pressure: causal association or epiphenomenon? *Eur J Epidemiol.* 2014;29(1):1–14. doi: 10.1007/s10654-013-9874-z
16. Jeong H.Y., Park K.M., Lee M.J., et al. Vitamin D and Hypertension. *Electrolyte Blood Press.* 2017;15(1):1–11. doi: 10.5049/EBP.2017.15.1.1
17. Zhao J.G., Zeng X.T., Wang J., et al. Association Between Calcium or Vitamin D Supplementation and Fracture Incidence in Community-Dwelling Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA.* 2017;318(24):2466–2482. doi: 10.1001/jama.2017.19344
18. Rasouli M.A., Darvishzadehdaledari S., Alizadeh Z., et al. Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Disease Risks in More Than 134000 Individuals in 29 Randomized Clinical Trials and 157000 Individuals in 30 Prospective Cohort Studies: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *J Res Health Sci.* 2023;23(4):e00594. doi: 10.34172/jrhs.2023.129
19. Brunström M., Carlberg B. Association of Blood Pressure Lowering With Mortality and Cardiovascular Disease Across Blood Pressure Levels: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Intern Med.* 2018;178(1):28–36. doi: 10.1001/jamainternmed.2017.6015
20. Christakos S., Dhawan P., Verstuyf A. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev.* 2016;96(1):365–408. doi: 10.1152/physrev.00014.2015
21. Carlberg C. Vitamin D and Its Target Genes. *Nutrients.* 2022;14(7):1354. doi: 10.3390/nu14071354
22. Carlberg C., Muñoz A. An update on vitamin D signaling and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022;79:217–230. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.05.018
23. Tamura M., Ishizawa M., Isojima T., et al. Functional analyses of a novel missense and other mutations of the vitamin D receptor in association with alopecia. *Sci Rep.* 2017;7(1):5102. doi: 10.1038/s41598-017-05081-x
24. Long M.D., Sucheston-Campbell L.E., Campbell M.J. Vitamin D receptor and RXR in the post-genomic era. *J Cell Physiol.* 2015;230(4):758–66. doi: 10.1002/jcp.24847



25. Lu S., Guo S., Hu F., et al. The Associations Between the Polymorphisms of Vitamin D Receptor and Coronary Artery Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(21):e3467. doi: 10.1097/MD.0000000000003467
26. Górczyńska-Kosiorz S., Tabor E., Niemiec P., et al. Associations between the VDR Gene rs731236 (TaqI) Polymorphism and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women from the RAC-OST-POL. *Biomedicines*. 2024;12(4):917. doi: 10.3390/biomedicines12040917
27. Dakota I., Adda'i M.F., Maulana R. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and essential hypertension: An updated systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *PLoS One*. 2024;19(12):e0314886. doi: 10.1371/journal.pone.0314886
28. Salimi S., Eskandari F., Rezaei M., et al. Vitamin D Receptor rs2228570 and rs731236 Polymorphisms are Susceptible Factors for Systemic Lupus Erythematosus. *Adv Biomed Res*. 2019;8:48. doi: 10.4103/abr.abr\_19\_19
29. Othman G.O. VDR Gene Polymorphisms in Kurdish Population and Its Relation to T1DM in Erbil-Iraq. *Cellular and Molecular Biology*. 2022;68(1):8–13. doi: 10.14715/cmb/2022.68.1.2
30. Cafiero C., Grippaudo C., Dell'Aquila M., et al. Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Periodontal Bacteria: A Clinical Pilot Study. *Biomolecules*. 2022;12(6):833. doi: 10.3390/biom12060833



Гриневич Т.Н.✉, Кот М.О., Гладкий М.Л.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

## Различия в частотах генотипов и аллелей по полиморфным локусам генов матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 и их ингибиторов TIMP-2 у женщин с привычным невынашиванием беременности и физиологически протекающей гестацией

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Гриневич Т.Н. – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка данных, написание текста; Кот М.О. – обзор литературы, написание текста; Гладкий М.Л. – сбор и обработка материала.

Подана: 18.05.2025

Принята: 20.08.2025

Контакты: tgrinevich@yandex.by

### Резюме

**Введение.** Привычное невынашивание беременности ассоциировано с генетическими особенностями, включая полиморфизм однонуклеотидных замен (SNPs) в генах матриксных металлопротеиназ, изменяющих экспрессию белков внеклеточного матрикса и влияющих на процессы плацентации и гемостаза.

**Цель.** Изучение роли однонуклеотидных генных полиморфизмов матриксных металлопротеиназ (MMP) 2-го и 9-го типов и их ингибиторов в структуре ранних репродуктивных потерь у женщин с привычным невынашиванием беременности.

**Материалы и методы.** Обследовано 26 женщин с привычным невынашиванием беременности и ранними репродуктивными потерями в анамнезе и 23 женщины с 3 и более физиологическими родами. Генотипирование полиморфных локусов в тканях плаценты осуществлялось методом полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP) и в режиме реального времени (Real-Time PCR).

**Результаты.** У женщин с привычным невынашиванием беременности выявлено преобладание мутантного аллеля Т полиморфизма 735 С>Т гена MMP-2, тогда как у женщин с физиологической беременностью мутантный гомозиготный генотип ТТ данного полиморфизма не встречался. Гетерозиготный вариант GC полиморфизма 418 G>C гена TIMP-2 и гомозиготный по «диному» аллелю генотип AA полиморфизма Gln279Arg гена MMP-9 чаще встречались в группе женщин с привычным невынашиванием беременности. Минорный аллель С полиморфизма 418 G>C гена TIMP-2 и аллель А, являющийся мажорным («дикиим»), полиморфизма Gln279Arg гена MMP-9 чаще выявлялись в группе с привычным невынашиванием беременности.

**Заключение.** Носительство аллеля Т полиморфизма 735 С>Т гена MMP-2 наряду с присутствием аллеля С и генотипом GC полиморфизма 418 G>C гена TIMP-2 может



рассматриваться в качестве одного из потенциальных генетических индикаторов в структуре ранних репродуктивных потерь у женщин с привычным невынашиванием беременности. Наличие аллеля А полиморфизма Gln279Arg гена MMP-9 может быть связано с низкой экспрессией данного гена, однако для подтверждения полученных результатов и изучения практического значения этой ассоциации требуются дополнительные исследования.

**Ключевые слова:** привычное невынашивание, матриксные металлопротеиназы, тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ, полиморфизм, внеклеточный матрикс

Grinevich T.✉, Kot M., Gladky M.  
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

## Differences in Genotype and Allele Polymorphic Loci of MMP-2 and MMP-9 Matrix Metalloproteinase Genes and their Inhibitors TIMP-2 in Women with Recurrent Miscarriage and Physiologically Proceeding Gestation

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Grinevich T. – study concept and design, statistical data processing, text writing; Kot M. – literature review, text writing; Gladky M. – material collection and processing.

Submitted: 18.05.2025

Accepted: 20.08.2025

Contacts: tgrinevich@yandex.by

### Abstract

**Introduction.** Recurrent miscarriage is associated with genetic features, including single nucleotide polymorphisms (SNPs) in matrix metalloproteinase genes, which alter the expression of extracellular matrix proteins and affect placentation and hemostasis processes.

**Purpose.** To study the role of single nucleotide gene polymorphisms of matrix metalloproteinases (MMP) types 2 and 9 and their inhibitors in the structure of early reproductive losses in women with recurrent miscarriage.

**Materials and methods.** 26 women with recurrent miscarriage and early reproductive losses in the history and 23 women with three or more physiological births were examined. Genotyping of polymorphic loci in placental tissues was performed by polymerase chain reaction with restriction fragment lengths (PCR-RFLP) and Real-Time PCR.

**Results.** The prevalence of the mutant T allele of the 735 C>T polymorphism of the MMP-2 gene was found in women with recurrent miscarriage, while the mutant homozygous TT genotype of this polymorphism was not found in women with physiological pregnancy. Heterozygous variant of GC genotype and minor allele C of 418 G>C polymorphism of TIMP-2 gene were significantly more frequent in women with recurrent miscarriage. The heterozygous GC variant of the TIMP-2 gene 418 G>C polymorphism and the homozygous "wild" allele AA genotype of the MMP-9 gene Gln279Arg polymorphism were more

common in the group of women with recurrent miscarriage. The minor allele C of the TIMP-2 gene 418 G>C polymorphism and the major ("wild") allele A of the MMP-9 gene Gln279Arg polymorphism were more common in the group with recurrent miscarriage.

**Conclusion.** The carriage of the T allele of the 735 C>T polymorphism of the MMP-2 gene along with the presence of the C allele and the GC genotype of the 418 G>C polymorphism of the TIMP-2 gene can be considered as one of potential genetic indicators in the pattern of early reproductive losses in women with recurrent miscarriage. The presence of allele A of the Gln279Arg polymorphism of the MMP-9 gene may be associated with low expression of this gene, but additional studies are required to confirm the findings and to investigate the practical significance of this association.

**Keywords:** recurrent miscarriage, matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, polymorphism, extracellular matrix

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Проблема невынашивания беременности – одна из самых трудных областей в репродуктивной медицине, так как патофизиология данного состояния многообразна, а диагностика причин невынашивания все еще недостаточно эффективна. В структуре репродуктивных потерь преобладает прерывание беременности на ранних сроках, одной из основных причин которого являются нарушения имплантации оплодотворенной яйцеклетки в слизистую матки. Решающую роль во время имплантации эмбриона человека и плацентации играет инвазия клеток трофобласта в материнский эндометрий. Этот процесс неотъемлемо связан с преобразованием базальной мембраны и экстрацеллюлярного матрикса, в котором принимают участие целый ряд ферментов, в том числе система матриксных металлопротеиназ [1, 2].

Матриксные металлопротеиназы (MMP) представляют собой семейство цинк-зависимых эндопептидаз, обладающих каталитической активностью в отношении белковых молекул, способных инициировать деградацию основных компонентов внеклеточного пространства [3]. К настоящему времени насчитывается более 20 матриксных металлопротеиназ. На основании первичной структуры, субстратной специфичности и клеточной локализации MMP делятся на коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины и мембранно-связанные металлопротеиназы [4, 5]. При плацентации ключевыми факторами протеолиза являются ферменты группы желатиназ. Причем на ранних сроках беременности особенно вовлечены в успешную инвазию цитотрофобластов металлопротеиназы 2-го (MMP-2) и 9-го (MMP-9) типа, поскольку они считаются ключевыми ферментами в деградации базальной мембраны, которая в основном состоит из коллагена IV типа [6, 7].

Активность MMP контролируется ингибиторами тканевых металлопротеиназ (TIMP), которые блокируют разрушение экстрацеллюлярного матрикса и характеризуются определенной избирательной специфичностью. Концентрация TIMP зависит от концентрации MMP в тканях и внеклеточной жидкости, ограничивая тем самым протеолитическую активность в фокальном окологлобальном пространстве [8]. Изменение структурной организации коллагенов может быть обусловлено нарушением как синтеза, так и метаболизма самих металлопротеиназ, а также нарушением баланса с их ингибиторами. Любой дисбаланс в этом регулирующем механизме



может оказать существенное влияние на состояние матрикса и, соответственно, на течение беременности.

Количество вновь синтезируемых MMP поддается регуляции на уровне транскрипции их структурных генов. Известно, что некоторые полиморфизмы влияют на экспрессию генов, активность белка, стабильность белка и белок-белковые взаимодействия, а некоторые из них связаны с повышенным риском развития акушерской патологии. При мутациях генов MMP-2 и MMP-9 в терминальных ворсинах происходит снижение содержания коллагена IV типа в базальных мембранах, что, вероятно, может приводить к нарушению формирования фетоплацентарного барьера. Поэтому оценка полиморфизма генов системы MMP может быть одним из важных прогностических факторов успешного формирования плаценты и развития гестации.

Данные литературы об ассоциации отдельных аллельных вариантов генов MMP-2, MMP-9 и TIMP с репродуктивными потерями на ранних сроках беременности немногочисленны и зачастую противоречивы. Получение более полной информации о роли матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов в структуре репродуктивных потерь является актуальным направлением медико-биологических исследований.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение роли однонуклеотидных генных полиморфизмов MMP 2-го и 9-го типов и их ингибиторов в структуре ранних репродуктивных потерь у женщин с привычным невынашиванием беременности.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 49 женщин репродуктивного возраста, из которых 26 пациенток с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и ранними репродуктивными потерями (до 12 недель беременности в анамнезе) составили основную группу. Возраст обследованных варьировался от 25 до 39 лет (медиана (Me) – 31 год, нижний квартиль (Q25) – 28 лет, верхний квартиль (Q75) – 35 лет).

Критериями включения в исследование были: диагностированное привычное невынашивание беременности, характеризующееся 3 и более последовательными самопроизвольными прерываниями беременности; отсутствие тяжелых соматических и гинекологических заболеваний; наличие информированного согласия на участие в исследовании.

Контрольную группу составили 23 женщины с 3 и более физиологическими родами в анамнезе. У пациенток данной группы отмечался благоприятный акушерский анамнез, отсутствовали самопроизвольные выкидыши и другие акушерские осложнения. Возраст женщин контрольной группы варьировался от 22 до 39 лет (медиана 35 лет, Q25 – 31 год, Q75 – 39 лет).

Исследование проводилось на архивном материале (парафиновых блоках), содержащем плацентарные ткани и последы, полученные после спонтанных выкидышей или замерших беременностей. В качестве контроля использовали образцы хориальной ткани, взятые при искусственном аборте.

ДНК плаценты выделялась из архивных тканей, фиксированных в формалине и залитых в парафиновые блоки, с применением фирменного набора QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя.

Выявление полиморфных вариантов генов MMP-2 (735 T>C) и TIMP-2 (418 G>C) проводилось методом полимеразной цепной реакции с рестрикционным анализом фрагментов (PCR-RFLP) с использованием амплификатора-термоциклера (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, США) и последующей идентификацией с помощью гель-документирования (Gel Doc XR+ Imaging System) и гель-электрофореза (Sub-Cell GT Agarose Gel, Bio-Rad, США).

Генотипирование полиморфного локуса MMP-9 (Gln279Arg, 836 A>G) осуществлялось методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (real-time PCR) с применением амплификатора Rotor-Gene Q5 (QIAGEN, Германия). В ходе анализа использовали олигонуклеотидные праймеры и зонды, синтезированные ООО «Синтол» (Россия).

Статистический анализ выполнен с использованием программного пакета STATISTICA 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q). Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Колмогорова – Смирнова. При проведении попарного сравнения частот аллелей и генотипов между анализируемыми группами использовали критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса или точный критерий Фишера. В исследуемых группах для SNPs рассчитывали относительный риск (ОР) и отношение шансов (ОШ) с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Соответствие распределения частот аллелей и генотипов равновесию Харди – Вайнберга проверяли по критерию  $\chi^2$ . Различия между сравниваемыми величинами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов однонуклеотидных генных полиморфизмов MMP-2 (rs2285053, 735 C>T), MMP-9 (rs17576, Gln279Arg, 836 A>G) и TIMP-2 (rs12600817, 418 G>C) в плацентарных тканях женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) и женщин с физиологически протекающей беременностью (табл. 1–3).

Анализ частотного распределения генотипов по изучаемым SNP-локусам показал, что у женщин с ПНБ наблюдаются значительные отклонения от равновесия Харди – Вайнберга. В системе MMP-2 735 C>T выявлено значимое различие по генотипам СТ ( $\chi^2=3,68$ ;  $p<0,05$ ) и ТТ ( $\chi^2=16,9$ ;  $p<0,05$ ), что может свидетельствовать о дисбалансе процессов матриксной деградации и нарушении регуляции внеклеточного матрикса, играющих важную роль в процессах имплантации и плацентации.

В системе TIMP-2 418 G>C также обнаружены выраженные статистические отклонения: GG ( $\chi^2=10,39$ ;  $p=0,001$ ) и GC ( $\chi^2=15,62$ ;  $p<0,001$ ), а также на аллельном уровне для C ( $\chi^2=9,41$ ;  $p=0,002$ ). Эти результаты могут указывать на нарушение процессов клеточной адгезии и ангиогенеза, критичных для адекватного функционирования трофобласта и формирования плаценты.

Наибольшие различия выявлены в системе MMP-2 735 C>T, где генотипы СТ ( $\chi^2=3,68$ ;  $p<0,05$ ) и ТТ ( $\chi^2=16,9$ ;  $p<0,05$ ) демонстрируют статистически значимое отклонение. Также значимые различия выявлены в системе TIMP-2 418 G>C, где генотипы GG ( $\chi^2=10,39$ ;  $p=0,001$ ) и GC ( $\chi^2=15,62$ ;  $p<0,001$ ) показывают изменения в частотах.

В контрольной группе (женщины с физиологически протекающей беременностью) значимых отклонений от равновесия Харди – Вайнберга не выявлено ( $p>0,05$ ), что подтверждает стабильное генетическое распределение аллелей и генотипов



и отсутствие направленного влияния изучаемых полиморфизмов на нормальное течение беременности.

Полученные данные подтверждают возможную ассоциацию полиморфизмов MMP-2 735 C>T и TIMP-2 418 G>C с патогенезом привычного невынашивания беременности. Вероятно, их влияние реализуется через механизмы дисбаланса внеклеточного матрикса, нарушения матриксной ремоделиции эндометрия и изменения васкуляризации, что может негативно отражаться на ранних этапах беременности.

Данные о частотах генотипов и аллелей полиморфизма 735 C>T гена MMP-2 представлены в табл. 1.

Распределение минорного аллельного варианта ТТ (гомозигота по мутантному аллелю) 735 C>T гена MMP-2 среди пациенток с ПНБ составило 11,5%, тогда как в контрольной группе данный гомозиготный вариант не был выявлен ( $p=0,09$ ). Генотип ТТ является редким и встречается с невысокой частотой в общей популяции. Частота гетерозиготного варианта СТ у женщин с ПНБ составила 3,8%, тогда как у женщин контрольной группы она достигала 13,0%. Доминирующим генотипом в обеих группах являлся СС, частота которого среди женщин с ПНБ составила 84,6%, а в контрольной группе – 87,0%.

Показано, что замена цитозина (С) на тимидин (Т) в позиции 735 прерывает Sp1-связывающий сайт, что приводит к снижению транскрипционной активности [9]. Вследствие этого экспрессия белка MMP-2 выше у индивидов с генотипом СС по сравнению с теми, у кого выявляется ТТ или СТ.

Сравнительный анализ распределения аллелей полиморфного локуса MMP-2 показал, что защитный аллель С несколько чаще встречался в группе женщин с физиологически протекающей беременностью. В основной группе частота минорного аллеля Т составила 14%, тогда как в контрольной – 6,8%. Полиморфизм 735 C>T гена MMP-2, снижающий его экспрессию, может быть ассоциирован с повышенным риском невынашивания беременности ( $\chi^2=0,09$ ;  $p=0,78$ ; OR=1,18; 95% ДИ 0,29–4,73).

Согласно данным литературы, встречаемость минорного аллеля Т ниже у азиатских популяций (13,6%) по сравнению с европейскими (23,3%) [10].

**Таблица 1**

**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма 735 C>T гена MMP-2 в тканях плаценты у женщин с привычным невынашиванием беременности и у женщин с физиологически протекающей беременностью**

**Table 1**

**Distribution of genotype and allele frequencies of the 735 C>T polymorphism of the MMP-2 gene in placental tissues in women with RPL and in women with physiological pregnancy**

| Генотипы/<br>Аллели | Опыт,<br>абс. (%) | Контроль,<br>абс. (%) | ОР<br>(95% ДИ)    | ОШ<br>(95% ДИ)   | $\chi^2$ | p     |
|---------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|------------------|----------|-------|
| СС                  | 21 (84,6)         | 20 (87,0)             | 0,99 (0,8–1,2)    | 0,25 (0,03–2,42) | 0,032    | >0,05 |
| СТ                  | 1 (3,8)           | 3 (13,0)              | 0,29 (0,07–1,226) | 0,27 (0,05–1,34) | 3,68     | <0,05 |
| ТТ                  | 3 (11,5)          | 0                     | –                 | –                | 16,9     | <0,05 |
| Аллель С            | 23 (86)           | 22 (93,2)             | 0,93 (0,79–1,09)  | 0,35 (0,03–3,61) | 0,0005   | >0,05 |
| Аллель Т            | 4 (14)            | 3 (6,8)               | 1,18 (0,42–3,32)  | 1,12 (0,36–3,46) | 0,1      | >0,05 |

Примечание: ОР – относительный риск, ОШ – отношение шансов, в скобках – ДИ (доверительный интервал);  $\chi^2$  – критерий  $\chi$ -квадрат; статистически значимые различия приняты при  $p<0,05$  (для табл. 1–3). То же – в последующих таблицах.

Данные о частотах генотипов и аллелей полиморфизма Gln279Arg гена MMP-9 представлены в табл. 2.

Генетическое исследование показало, что частота гомозигот по мутантному аллелю (генотип GG) полиморфизма 836 A>G гена MMP-9 была статистически незначимо выше у женщин с физиологически протекающей беременностью, чем у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ). Гетерозиготный генотип AG данного полиморфного локуса встречался с частотой 50,0% у женщин с ПНБ и 56,52% в контрольной группе, таким образом, несколько чаще у женщин с физиологическим течением беременности.

Гомозиготный по «дикому» аллелю генотип AA чаще встречался у женщин с ПНБ (42,3%) по сравнению с контрольной группой (34,8%), однако различия не были статистически значимыми ( $\chi^2=0,291$ ;  $p=0,87$ ; OR=1,21; 95% ДИ 0,59–2,49).

Носительство гомозиготного аллеля G (мутантный аллель) полиморфизма Gln279Arg гена MMP-9 было выше в контрольной группе (37,0%) по сравнению с женщинами с ПНБ (32,7%), однако различия не достигли уровня статистической значимости. Это может свидетельствовать о нормальной функции матриксной металлопротеиназы 9-го типа у носителей аллеля G, что позволяет предположить его возможное участие в поддержании структурной стабильности внеклеточного матрикса.

**Таблица 2**  
**Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма Gln279Arg гена MMP-9 в тканях плаценты у женщин с ПНБ и у женщин с физиологически протекающей беременностью**  
**Table 2**  
**Distribution of genotype and allele frequencies of the Gln279Arg polymorphism of the MMP-9 gene in placental tissues in women with RPL and in women with physiological pregnancy**

| Генотипы/<br>Аллели | Опыт,<br>абс. (%) | Контроль,<br>абс. (%) | ОР<br>(95% ДИ)   | ОШ<br>(95% ДИ)   | $\chi^2$ | p    |
|---------------------|-------------------|-----------------------|------------------|------------------|----------|------|
| AA                  | 11 (42,3)         | 8 (34,78)             | 1,21 (0,59–2,49) | 1,38 (0,44–4,45) | 0,291    | 0,87 |
| AG                  | 13 (50,0)         | 13 (56,52)            | 0,89 (0,53–1,52) | 0,78 (0,26–2,38) | 0,102    | 0,77 |
| GG                  | 2 (7,69)          | 2 (8,7)               | 0,88 (0,13–5,85) | 0,87 (0,11–6,77) | 0,005    | 0,96 |
| Аллель А            | 24 (67,3)         | 21 (63)               | 1,02 (0,87–1,21) | 1,14 (0,15–8,84) | 0,018    | 0,89 |
| Аллель G            | 15 (32,7)         | 14 (37)               | 0,94 (0,58–1,52) | 0,89 (0,28–2,75) | 0,056    | 0,76 |

**Таблица 3**  
**Распределение частот встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма 418 G>C гена TIMP-2 в тканях плаценты у женщин с ПНБ и у женщин с физиологически протекающей беременностью**  
**Table 3**  
**Distribution of genotype and allele frequencies of the 418 G>C polymorphism of the TIMP-2 gene in placental tissues in women with RPL and in women with physiological pregnancy**

| Генотипы/<br>Аллели | Опыт,<br>абс. (%) | Контроль,<br>абс. (%) | ОР<br>(ДИ 95%)    | ОШ<br>(ДИ 95%)     | $\chi^2$ | p      |
|---------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|----------|--------|
| GG                  | 6 (23,1)          | 17 (73,9)             | 0,31 (0,15–0,66)  | 0,11 (0,03–0,39)   | 0,866    | 0,001  |
| GC                  | 18 (69,2)         | 4 (17,4)              | 3,98 (1,58–10,06) | 10,69 (2,74–41,74) | 2,24     | <0,001 |
| CC                  | 2 (7,7)           | 2 (8,7)               | 0,89 (0,14–5,8)   | 0,88 (0,11–6,77)   | 1,45     | 0,89   |
| Аллель G            | 24 (57,7)         | 20 (82,6)             | 1,06 (0,88–1,29)  | 1,8 (0,27–11,88)   | 3,84     | 0,05   |
| Аллель C            | 20 (43,3)         | 6 (17,4)              | 2,95 (1,44–6,05)  | 9,44 (2,57–34,77)  | 9,41     | 0,002  |



Аллель А встречался несколько чаще (67,3%) у женщин с ПНБ по сравнению с частотой его выявления в контрольной группе (63,0%) ( $\chi^2=0,018$ ;  $p=0,89$ ;  $OR=1,01$ ; 95% ДИ 0,86–1,2). Это позволяет предположить, что аллель А может быть связан с низкой экспрессией гена MMP-9, который играет важную роль в деградации внеклеточного матрикса. Подавление активности MMP-9 может препятствовать нормальному процессу ремоделирования внеклеточного матрикса, что потенциально влияет на инвазию цитотрофобласта, кровообращение в системе мать – плацента – эмбрион и развитие эмбриона [11].

Данные о частотах генотипов и аллелей полиморфизма 418 G>C гена тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ (TIMP-2) приведены в табл. 3.

Распределение частот генотипов полиморфизма 418 G>C гена TIMP-2 у женщин с ПНБ и представительниц контрольной группы показало, что генотип CC (мутантный гомозиготный вариант) выявлен с частотой 7,7 и 8,7% соответственно, однако различия не достигли статистической значимости.

Генотип GG (гомозиготный вариант по «дикому» аллелю) статистически значимо чаще встречался у женщин с физиологически протекающей беременностью (73,9%) по сравнению с группой женщин с ПНБ (23,1%) ( $\chi^2=10,39$ ;  $p=0,001$ ). Гетерозиготный вариант GC достоверно чаще выявлялся у женщин с ПНБ (69,2%), что в 3,98 раза выше, чем среди женщин контрольной группы ( $\chi^2=15,62$ ;  $p<0,001$ ). Расчет отношения шансов показал, что носительство генотипа GC гена TIMP-2 ассоциировано с повышенным риском невынашивания беременности на ранних сроках (ОШ=10,69; 95% ДИ 2,74–41,74).

Минорный аллель C гена TIMP-2 значимо чаще встречался в группе женщин с ПНБ (43,3 против 17,4% в контрольной группе), при этом носительство этого аллеля увеличивает риск развития ПНБ в 2,95 раза ( $\chi^2=9,41$ ;  $p=0,002$ ). Тогда как аллель G, являющийся более частым вариантом, преимущественно встречался у женщин с физиологически протекающей беременностью (82,6 против 57,7%,  $p=0,05$ ).

Можно предположить, что мутантный вариант гена TIMP-2 кодирует белок со сниженной антиферментной активностью, что приводит к дисбалансу между металлопротеиназами и их ингибитором в плаценте женщин с ПНБ. Нарушение этого регулирующего механизма может привести к дестабилизации структуры коллагенов и внеклеточного матрикса, что, в свою очередь, может способствовать возникновению осложнений в ходе беременности.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Носительство аллеля Т полиморфизма 735 C>T гена MMP-2, а также присутствие аллеля С и генотипа GC полиморфизма 418 G>C гена TIMP-2 могут рассматриваться как потенциальные генетические индикаторы, ассоциированные с повышенным риском привычного невынашивания беременности. Выявленные генетические особенности могут влиять на регуляцию состояния внеклеточного матрикса, снижая экспрессию металлопротеиназ и нарушая баланс между MMP-2, MMP-9 и их тканевыми ингибиторами (TIMP-2). Эти процессы критически важны для адекватной инвазии трофобласта, формирования плацентарного кровотока и сохранения целостности плацентарных структур, а их дисфункция может приводить к патологическим процессам на ранних стадиях беременности.

Наличие аллеля А полиморфизма Gln279Arg гена MMP-9 может быть связано с пониженной экспрессией данного гена, что потенциально влияет на процессы расщепления внеклеточного матрикса и ремоделирования плаценты. Однако для подтверждения этой ассоциации и определения практической значимости выявленных связей требуются дополнительные исследования с более широкой выборкой и углубленным анализом функциональных последствий этих генетических вариантов.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Shah B.H., Catt K.J. Matrix metalloproteinases in reproductive endocrinology. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(2):47–9. PMID: 15080147. doi: 10.1016/j.tem.2004.01.004
2. Zhang J., Nie G., Jian W. Mast cell regulation of human endometrial matrix metalloproteinases: a mechanism underlying menstruation. *Biol Reprod.* 1998;59(3):693–703. doi: 10.1095/biolreprod59.3.693
3. Nagase H., Woessner J.F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;30;274(31):21491–4. PMID: 10419448. doi: 10.1074/jbc.274.31.21491
4. Cohen M., Meisser A., Bischof P. Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta.* 2006;27(8):783–93. Epub 2005 Oct 24. PMID: 16249026. doi: 10.1016/j.placenta.2005.08.006
5. Raffetto J.D., Khalil R.A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008;15;75(2):346–59. Epub 2007 Jul 7. PMID: 17678629; PMCID: PMC2254136. doi: 10.1016/j.bcp.2007.07.004
6. Huang H.Y., Wen Y., Irwin J.C. Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1721–9. doi: 10.1210/jcem.83.5.4810. PMID: 9589682
7. Salamonsen L.A., Butt A.R., Hammond F.R. Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(5):1409–15. PMID: 9141525. doi: 10.1210/jcem.82.5.3920
8. Ke Y., Lu J.H., Yang B.L. Involvement of matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, 2 in occurrence of the accrete placenta. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2006;41(5):311–4. PMID: 16762185. (in Chinese)
9. Peng B., Cao L., Ma X. Meta-analysis of association between matrix metalloproteinases 2, 7 and 9 promoter polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis.* 2010;25(4):371–9. doi: 10.1093/mutage/geq015
10. Yu C., Zhou Y., Miao X. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res.* 2004;15;64(20):7622–8. PMID: 15492291. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1521
11. Dubois B., Arnold B., Opdenakker G. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J. Clin. Invest.* 2000;106(5):627–8. PMID: 10974013; PMCID: PMC381291. doi: 10.1172/JCI10910



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.3.022>  
УДК 616.72-089.844-77-06-022-074



Костюк С.А., Лямцева А.К.✉, Полуян О.С., Бенько А.Н.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

## Лабораторные критерии диагностики перипротезной инфекции суставов

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Костюк С.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование текста; Лямцева А.К. – обработка материала, интерпретация данных, анализ литературных источников; Полуян О.С. – анализ полученных данных, интерпретация данных, обзор литературы; Бенько А.Н. – дизайн исследования, сбор материала.

Подана: 17.05.2025

Принята: 22.08.2025

Контакты: annaliamsava@gmail.com

### Резюме

**Введение.** Диагностика перипротезной инфекции суставов (ППИ) основана на сочетании лабораторных исследований крови (сыворотки крови) и синовиальной жидкости, а также образцов тканей. Использование в силу отсутствия единого диагностического алгоритма и критериев диагностики ППИ комбинации данных исследований позволяет дифференцировать инфекцию от других причин, связанных с нарушением имплантации эндопротеза.

**Цель.** Выделить диагностически значимые лабораторные критерии перипротезной инфекции суставов на основе комплексного анализа показателей крови, иммунологических показателей, микробиологических молекулярно-генетических маркеров у пациентов с инфекцией после эндопротезирования коленного/тазобедренного сустава.

**Материалы и методы.** Проведен анализ показателей крови (количество лейкоцитов, доля незрелых форм нейтрофилов, СОЭ и СРБ), результатов бактериологического исследования биологического материала и показателей иммунного статуса в синовиальной жидкости пациентов, входящих в исследование. Методом ПЦР в режиме реального времени исследован биологический материал 158 пациентов основной группы (с признаками ППИ) и 60 пациентов контрольной группы (условно здоровые пациенты) после эндопротезирования тазобедренного/коленного сустава. Была определена частота выявления ДНК условно-патогенных микроорганизмов с количественным форматом детекции микроорганизмов.

**Результаты.** Установлено, что после эндопротезирования крупных суставов у пациентов с наличием клинических признаков инфекции отмечены достоверно высокие уровни лейкоцитов – более  $12 \times 10^9$ , доля нейтрофилов (палочкоядерных) превышает 10%, СОЭ – более 30 мм/ч, СРБ – более 10 мг/л. Установлены статистически значимые изменения показателей иммунного статуса пациентов с признаками ППИ, характеризующиеся увеличением содержания в синовиальной жидкости IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IgM и IgG, а также снижением количества противовоспалительного цитокина IL-10. Результаты бактериологического и ПЦР-исследования показали, что ведущую роль в развитии ППИ играют условно-патогенные микроорганизмы рода *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и семейства Enterobacteriaceae.

**Заключение.** При выборе диагностического подхода к проведению диагностики ППИ целесообразно использовать клинично-инструментальные критерии в комбинации с представленными лабораторными критериями, включающими оценку количества лейкоцитов, доли незрелых форм нейтрофилов в крови, СОЭ и СРБ в сыворотке крови, содержания IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IgM и IgG в синовиальной жидкости, наличие условно-патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus* spp., рода *Streptococcus* spp. и семейства Enterobacteriaceae в синовиальной жидкости и (или) в образцах перипротезной ткани.

**Ключевые слова:** лабораторная диагностика, критерии, перипротезная инфекция, эндопротезирование суставов, условно-патогенные микроорганизмы

---

Kostiuk S., Lyamtseva A.✉, Poluyan O., Benko A.  
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

## Laboratory Criteria for Diagnosing Periprosthetic Joint Infection

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Kostiuk S. – study concept and design, text editing; Lyamtseva A. – material processing, editing, literature review; Poluyan O. – statistical data processing, editing, literature review; Benko A. – study design, material collection.

Submitted: 17.05.2025

Accepted: 22.08.2025

Contacts: annaliantsava@gmail.com

---

### Abstract

**Introduction.** The diagnosis of periprosthetic joint infection (PJI) is based on a combination of laboratory tests of blood (blood serum) and synovial fluid, as well as tissue samples. Due to the lack of a unified diagnostic algorithm and criteria for diagnosing PJI, the combination of these laboratory tests data allows differentiating from other causes associated with impaired endoprosthesis implantation.

**Purpose.** To identify diagnostically significant laboratory criteria for periprosthetic joint infection based on a comprehensive analysis of blood parameters, immunological parameters, and microbiological molecular genetic markers in patients with infection after knee/hip arthroplasty.

**Materials and methods.** An analysis of blood parameters (white blood cell count, proportion of immature neutrophils, ESR and CRP), bacteriological tests of biological material and immune status indicators in the synovial fluid of patients included in the study was performed. The biological material of 158 patients of the main group (with signs of PJI) and 60 patients of the control group (conditionally healthy patients) after hip/knee arthroplasty was studied using the real-time PCR method. The frequency of opportunistic pathogens' DNA detection was determined using a quantitative format for detecting microorganisms.

**Results.** It was found that after endoprosthesis replacement of large joints in patients with clinical signs of infection, reliably high levels of leukocytes were observed of more than  $12 \times 10^9$ , the proportion of neutrophils (band neutrophils) exceeded 10%, ESR was



more than 30 mm/h, and CRP was more than 10 mg/l. Statistically significant changes in the immune status of patients with signs of PJI were established, characterized by an increase in the content of IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IgM and IgG in the synovial fluid, as well as a decrease in anti-inflammatory cytokine IL-10 levels. The results of bacteriological tests and PCR showed that the leading role in PJI is played by opportunistic microorganisms of the genus *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and the Enterobacteriaceae family.

**Conclusion.** When choosing a diagnostic approach for PJI diagnosing, it is advisable to use clinical and instrumental criteria in combination with the presented laboratory criteria, including an assessment of white blood cell count, proportion of the immature forms of neutrophils in the blood, ESR and CRP in blood serum, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IgM, and IgG levels in synovial fluid, and presence of opportunistic pathogens of the genus *Staphylococcus* spp., genus *Streptococcus* spp., and Enterobacteriaceae family in synovial fluid and/or in periprosthetic tissue samples.

**Keywords:** laboratory diagnostics, criteria, periprosthetic joint infection, endoprosthesis replacement, opportunistic microorganisms

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Перипротезная инфекция (ППИ) является серьезным осложнением после эндопротезирования тазобедренного, коленного суставов и частой причиной ревизионного (повторного) эндопротезирования. Инфекция приводит к инвалидности пациентов и может потребовать инвазивного лечения с риском серьезных побочных эффектов. Своевременное выполнение точной диагностики перипротезной инфекции суставов является основным условием обеспечения надлежащей эффективности проводимого лечения вызываемых ею осложнений.

Было предпринято много попыток определить критерии, по которым диагностируется ППИ. Общество по инфекционным заболеваниям опорно-двигательного аппарата (Musculoskeletal Infection Society, MSIS) в 2011 году разработало первоначальные критерии для определения ППИ [1], которые были изменены на международной согласительной конференции по ППИ (International Consensus Meeting on Infection, ICM) в 2013 году [2]. Американское общество по инфекционным заболеваниям (Infectious Diseases Society of America, IDSA) в 2013 году опубликовало руководство по диагностике от международной группы экспертов [3]. Также было разработано новое определение с использованием набора критериев на основе баллов, проверенных на когорте пациентов [4], которое обсуждалось на ICM в 2018 году [5], но не было одобрено MSIS или Европейским обществом по инфекциям костей и суставов (European Bone and Joint Infection Society, EBJIS).

Данные критерии для определения ППИ позволили четко сфокусироваться на необходимости точной диагностики и предоставили эталонные стандарты для клинических и диагностических исследований. Однако ни одно определение не получило признания в качестве эталонного стандарта для клинической практики. Это может быть связано со многими факторами, включая технические сложности, географические различия в практике, использование дорогостоящих тестов и разногласия по поводу точности некоторых из включенных тестов [6].

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), количество лейкоцитов, процент полиморфнонуклеарных нейтрофилов (polymorphonuclear neutrophils, ПМН) и С-реактивный белок (СРБ) являются наиболее широкодоступными и изученными биомаркерами в крови [7]. Все они являются отражением общих патогенетических механизмов воспаления, в том числе неинфекционной природы, могут иметь диапазон значений в пределах нормы при инфекциях низкой степени тяжести, латентном течении инфекции [8–10].

СРБ особенно полезен для оценки системной тяжести любой инфекции и часто рекомендуется для диагностики сепсиса. При отсутствии других причин повышения показателей маркеров воспаления, которые часто легко исключить (например, кристаллическая артропатия, активное воспалительное заболевание суставов, перипротезный перелом или первые несколько недель после операции), уровень СРБ выше 10 мг/л имеет достаточную специфичность, чтобы быть связанным с ППИ в большинстве случаев. Однако его нельзя использовать отдельно для подтверждения или исключения ППИ.

Синовиальная жидкость и образцы ткани, собранные путем предоперационной или интраоперационной аспирации, могут быть использованы для оценки специфических биомаркеров или для микробиологических исследований (микроскопия, посев на питательные среды, ПЦР-анализ) [11]. Тесты определения количества лейкоцитов в синовиальной жидкости и процента ПМН обладают высокой диагностической чувствительностью и диагностической специфичностью. Тем не менее были предложены различные пороговые значения [1, 2, 4, 12]. Оценка биомаркеров, таких как лейкоцитарная эстераза, СРБ, ИЛ-6,  $\alpha$ -дефензин и D-лактат в синовиальной жидкости, может быть достаточно чувствительной или специфичной, чтобы помочь в диагностике ППИ [11–13].

Синовиальные биомаркеры можно разделить на 2 категории: цитокины и биомаркеры с антимикробными функциями. Известно, что IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , фактор роста эндотелия сосудов локально продуцируются и повышаются в синовиальной жидкости пациентов с установленным диагнозом ППИ [14, 15]. Исследование динамики локальных иммунологических факторов после эндопротезирования крупных суставов позволит оценить влияние имплантатов и местных инфекционных процессов на иммунный ответ.

Микробиологическая диагностика может идентифицировать микроорганизмы, участвующие в этиологии инфекции. Согласно критериям диагностики ППИ инфекция может быть подтверждена, если по крайней мере два образца бактериологического посева дадут положительный результат на один и тот же патоген. Распространенность ППИ с отрицательным результатом посева составляет от 5% до 42% [16]. Это в значительной степени связано с предыдущей антибиотикотерапией. Дополнительные факторы, способствующие получению ложноотрицательных результатов, включают недостаточное количество образцов, длительный период времени инкубации или труднокультивируемые микроорганизмы, которые требуют особых условий для роста в бактериологических посевах [12].

Молекулярная диагностика, основанная на полимеразной цепной реакции (ПЦР), представляет собой эффективный метод выявления инфекционных поражений костей и суставов, включая ППИ, который может применяться к различным типам клинических образцов (перипротезная ткань, синовиальная жидкость).



ПЦР-диагностика является ценным дополнительным инструментом в комплексе диагностических мероприятий при подозрении на ППИ, которая способствует как идентификации возбудителя, так и определению полимикробной инфекции [17, 18].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделить диагностически значимые лабораторные критерии перипротезной инфекции суставов на основе комплексного анализа показателей крови, иммунологических показателей, микробиологических молекулярно-генетических маркеров у пациентов с инфекцией после эндопротезирования коленного/тазобедренного сустава.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основную группу исследования были включены 158 пациентов с признаками ППИ после первичного эндопротезирования коленного или тазобедренного сустава. Наибольшую группу составили пациенты с ППИ тазобедренного сустава – 95 (60,1%, ДИ: 52,0–67,8%) наблюдений; пациенты с ППИ коленного сустава – 63 (39,9%, ДИ: 32,2–48,0%) наблюдения. Контрольную группу составили 60 пациентов после эндопротезирования коленного/тазобедренного сустава без признаков ППИ.

На базе УЗ «Минская ордена Трудового Красного Знамени областная клиническая больница» были проведены бактериологическое исследование биологического материала (посев на жидкую и плотную питательные среды), общий и биохимический анализ крови у пациентов основной и контрольной группы. ПЦР-исследования осуществлены на базе лаборатории молекулярно-генетической диагностики Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

В качестве биологического материала для исследования бактериологическим методом и методом ПЦР в режиме реального времени использовались синовиальная жидкость и фрагменты синовиальной оболочки и хряща. Для получения образцов из полости суставов была применена разработанная методика артроскопической синовиальной биопсии, трепан-биопсии коленного/тазобедренного сустава из минимально инвазивных доступов под контролем электронно-оптического преобразователя (ЭОП) навигации. Синовиальную жидкость помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, фрагменты синовиальной оболочки и хряща – в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», Республика Беларусь). Пробы биологического материала замораживали и оставляли для хранения при температуре –20 °С.

Выделение ДНК из синовиальной жидкости проводили с использованием набора «АртДНК Легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Для выделения ДНК из фрагментов синовиальной оболочки и хряща применяли предварительную гомогенизацию в течение 3 минут (частота 10/с) с участием гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen) с последующей экстракцией набором «АртСпин» («АртБиоТех», Республика Беларусь).

ПЦР-РВ исследования по выявлению и количественному определению ДНК условно-патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus* spp., рода *Streptococcus* spp. и семейства *Enterobacteriaceae* проводили с применением набора реагента «АмплиПрайм Флороскрин» («АмплиПрайм», РФ). Набор реагентов «АмплиСенс

MRSA-скрин-титр-FL» («АмплиСенс», РФ) использовался для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* и метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. Качественное выявление и дифференциальную диагностику семейства Enterobacteriaceae (выявление ДНК *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Enterococcus faecalis/faecium*), а также *Pseudomonas aeruginosa* проводили с использованием набора реагентов «Септо-скрин» («Литех», РФ).

Для изучения спектра облигатно-патогенных микроорганизмов были выбраны *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* как одни из наиболее часто выявляемых артритогенных возбудителей при воспалительной артропатии суставов. Полученную ДНК использовали для постановки ПЦР-РВ с применением наборов реагентов «АртТест Хламидия», «АртТест Микоплазма Н», «АртТест Микоплазма G» («АртБиоТех», Республика Беларусь) и «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydophila pneumoniae*» («АмплиСенс», РФ). Амплификацию проводили на термоциклере Rotor-Gene-3000 (Corbett research, Австралия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft, США). Количественные данные имели непараметрическое распределение (проверку на нормальность проводили с использованием показателей асимметрии и эксцесса, W-критерий Шапиро – Уилка, критерий Колмогорова – Смирнова) и представлены в виде значений медианы (Me) и процентилей ( $Q_{25}/Q_{75}$ ). Для сравнения количественных показателей в исследуемых группах применялся U-критерий Манна – Уитни. Анализ категориальных признаков проводили с помощью точного критерия Фишера в таблице сопряженности 2x2. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости (p) менее 0,05.

Для качественных переменных определяли абсолютную частоту (n), относительную частоту – долю (%) от общего числа случаев и 95% доверительный интервал (95% ДИ) методом Клоппера – Пирсона.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Возраст пациентов основной группы на момент обследования составил 60 (51/68) лет. В обследуемой группе пациентов удельный вес мужчин составил 53,2% (ДИ: 45,1–61,1%) (n=84), женщин – 46,8% (ДИ: 38,9–54,9%) (n=74). Возраст обследованных пациентов контрольной группы составил 47 (44,3/60) лет, удельный вес мужчин составил 61,7% (ДИ: 48,2–73,9%) (n=37), женщин – 38,3% (ДИ: 26,1–51,8%) (n=23).

Клиническими проявлениями ППИ после эндопротезирования коленного/тазобедренного сустава были следующие: острое появление боли или любая хроническая боль в области эндопротеза, локальный отек тканей, болезненность при пальпации, местное повышение температуры, гиперемия кожных покровов, расшатывание эндопротеза, проблемы с заживлением послеоперационной раны, отделяемое из раны, наличие свищевого хода.

В ходе исследования были проанализированы результаты общего и биохимического анализа крови пациентов основной и контрольной группы и выделены статистически значимые гематологические критерии ППИ, полученные данные представлены в табл. 1.



Анализируемые показатели были значительно выше референсных значений у пациентов основной группы. При сравнительном анализе было установлено статистически значимое увеличение данных показателей у пациентов основной группы ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой. Пороговые уровни лейкоцитов – выше  $12 \times 10^9$ , количество незрелых форм нейтрофилов – превышает 10% в крови, СОЭ более 30 мм/ч, СРБ более 10 мг/л в сыворотке крови могут быть использованы как диагностически значимые критерии наличия воспалительного процесса у пациентов с признаками ППИ в сочетании с клиническими проявлениями инфекции после эндопротезирования крупных суставов.

В ходе предыдущих исследований была проведена количественная оценка содержания цитокинов (IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) и иммуноглобулинов (IgM, IgG) в синовиальной жидкости пациентов методом иммуноферментного анализа (ИФА). Были установлены статистически значимые изменения показателей иммунного статуса в синовиальной жидкости пациентов основной группы, характеризующиеся увеличением содержания IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IgM и IgG, а также характеризующиеся снижением количества противовоспалительного цитокина IL-10 по сравнению со значениями аналогичных показателей пациентов контрольной группы [19, 20].

В ходе бактериологического исследования биологического материала у основной группы пациентов были выявлены: *Staphylococcus aureus* в 40,4% (95% ДИ: 27,6–54,2) случаев ( $n=23$ ), *Staphylococcus epidermidis* – 14,0% (95% ДИ: 6,3–25,8) ( $n=8$ ), *Streptococcus* spp. – 1,8% (95% ДИ: 0,0–9,4) ( $n=1$ ), *Propionibacterium acnes* – 1,8% (95% ДИ: 0,0–9,4) ( $n=1$ ), *Enterococcus faecalis* – 7,0% (95% ДИ: 1,9–17,0) ( $n=4$ ), *Finagoldia magna* – 5,3% (95% ДИ: 1,1–14,6) ( $n=3$ ), *Escherichia coli* – 15,8% (95% ДИ: 7,5–27,9) ( $n=9$ ), *Enterobacter* spp. – 8,8% (95% ДИ: 2,9–19,3) ( $n=5$ ), *Serratia marcescens* – 1,8% (95% ДИ: 0,0–9,4) ( $n=1$ ), *Pseudomonas aeruginosa* – 1,8% (95% ДИ: 0,0–9,4) ( $n=1$ ), *Cutibacterium acnes* – 1,8% (95% ДИ: 0,0–9,4) ( $n=1$ ). Микробные ассоциации детектировались в 12,3% (95% ДИ: 5,1–23,7) случаев ( $n=7$ ). При изучении биологического материала пациентов контрольной группы были получены отрицательные результаты во всех исследуемых образцах.

Методом ПЦР-РВ был изучен видовой состав условно-патогенных микроорганизмов с установлением частоты их выявления в синовиальной жидкости и фрагментах синовиальной оболочки / хряща пациентов (табл. 2).

**Таблица 1**  
**Гематологические показатели крови у пациентов групп исследования**  
**Table 1**  
**Hematological blood parameters in patients of the study groups**

| Показатель                     | Референсные значения | Основная группа ( $n=158$ ), Me ( $Q_{25}/Q_{75}$ ) | Контрольная группа ( $n=60$ ), Me ( $Q_{25}/Q_{75}$ ) |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Лейкоциты, $\times 10^9$ /л    | 4,00–10,00           | 12,65 (10,39/15,47)*                                | 6,71 (5,26/7,83)                                      |
| Нейтрофилы (палочкоядерные), % | 1,0–6,0              | 11,2 (9,4/13,5)*                                    | 3,1 (1,9/4,7)                                         |
| СОЭ, мм/ч                      | 2–20                 | 83 (57/96)*                                         | 19 (11/30)                                            |
| СРБ, мг/л                      | 0–5                  | 31 (15/69)*                                         | 6 (5/9)                                               |

Примечание: \* различия статистически значимы.

**Таблица 2**  
**Результаты выявления ДНК условно-патогенных возбудителей ППИ после эндопротезирования тазобедренного/коленного сустава**  
**Table 2**  
**Results of detection of DNA of opportunistic pathogens causing PJI after hip/knee endoprosthesis replacement**

| Возбудитель                                                              | Основная группа (n=158), n (95% ДИ) | Контрольная группа (n=60), n (95% ДИ) |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Staphylococcus spp.                                                      | 65 (41,1; 33,8–48,9)*               | 2 (3,3; 0,4–11,5)                     |
| Метициллин-чувствительный Staphylococcus aureus (MSSA)                   | 8 (12,3; 5,5–22,8)                  | 0 (0,0)                               |
| Метициллин-резистентный Staphylococcus aureus (MRSA)                     | 13 (20,0; 11,1–31,8)                | 0 (0,0)                               |
| Метициллин-резистентный коагулазонегативный Staphylococcus spp. (MRCoNS) | 20 (30,8; 19,9–43,4)                | 1 (50,0; 1,3–98,7)                    |
| Streptococcus spp.                                                       | 25 (15,8; 10,5–22,5)*               | 0 (0,0)                               |
| Enterococcus faecalis/faecium                                            | 8 (5,1; 2,2–9,7)                    | 0 (0,0)                               |
| Enterobacteriaceae                                                       | 14 (8,9; 4,9–14,4)*                 | 0 (0,0)                               |
| – Escherichia coli                                                       | 6 (42,9; 17,7–71,1)                 | 0 (0,0)                               |
| – Enterobacter spp., Klebsiella spp.                                     | 4 (28,6; 8,4–58,1)                  | 0 (0,0)                               |
| – Proteus spp.                                                           | 0 (0,0)                             | 0 (0,0)                               |
| – Serratia spp.                                                          | 0 (0,0)                             | 0 (0,0)                               |
| Pseudomonas aeruginosa                                                   | 0 (0,0)                             | 0 (0,0)                               |
| Полимикробные*                                                           | 21 (13,3; 8,4–19,6)*                | 0 (0,0)                               |

Примечания: \* различия статистически значимы; \* относится к числу случаев полимикробной ППИ (конкретные вовлеченные микроорганизмы отражены в соответствующих категориях).

Анализ результатов, полученных в ходе выявления ДНК микроорганизмов в образцах исследуемых суставов, показал, что грамположительные бактерии доминируют в качестве этиологического фактора ППИ тазобедренного и коленного суставов, это подтверждается преимущественным выявлением ДНК Staphylococcus spp., в том числе ДНК Staphylococcus aureus и ДНК коагулазонегативных Staphylococcus spp. встречались с одинаковой частотой 32,3%, ДИ: 21,2–45,1% (n=21) и 30,8%, 95% ДИ: 19,9–43,4% (n=20) случаев соответственно.

В 21 образце биологического материала основной группы пациентов выявленные возбудители присутствовали в составе полимикробной инфекции: ДНК Staphylococcus spp. + Streptococcus spp. – в 15 образцах (71,4%, 95% ДИ: 47,8–88,7%), ДНК Staphylococcus spp. + Enterobacteriaceae были выявлены в 6 образцах (28,6%, 95% ДИ: 11,3–52,2%), что дает основание предполагать, что они формируют биологические сообщества в виде биопленок. Бактериальные биопленки обеспечивают превосходную и стабильную среду гомеостаза, которая предотвращает попадание иммунных клеток и противобактериальных лекарственных препаратов в сообщество бактериальной биопленки.

С применением статистического анализа (точный критерий Фишера) было установлено, что выявление ДНК условно-патогенных микроорганизмов рода Staphylococcus (p<0,05), Streptococcus (p=0,0002) и семейства Enterobacteriaceae (p=0,0126) в биологическом материале пациентов достоверно ассоциировано



с наличием ППИ после эндопротезирования крупных суставов. Установлено наличие достоверных отличий по частоте выявления полимикробной инфекции между основной и контрольной группой ( $p=0,0013$ ).

При изучении частоты выявления ДНК облигатно-патогенной флоры (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) в синовиальной жидкости и фрагментах синовиальной оболочки / хряща основной и контрольной группы были получены отрицательные результаты во всех исследуемых образцах.

На следующем этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по определению количественных уровней (концентраций) ДНК рода *Streptococcus* spp., рода *Staphylococcus* spp. и семейства *Enterobacteriaceae* во всех образцах биологического материала, в которых при проведении качественных исследований детектировалась ДНК указанных возбудителей. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3.

**Таблица 3**  
**Количественные данные определения концентраций ДНК *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. и *Enterobacteriaceae* в биологическом материале основной группы исследования**  
**Table 3**  
**Quantitative data while determining *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., and *Enterobacteriaceae* DNA levels in biological material from the main study group**

| Биологический материал          | Концентрация ДНК <i>Staphylococcus</i> spp.,<br>Me ( $Q_{25}/Q_{75}$ ) копий/мл |                                |                                 | Концентрация ДНК <i>Streptococcus</i> spp.,<br>Me ( $Q_{25}/Q_{75}$ ) копий/мл | Концентрация ДНК <i>Enterobacteriaceae</i> ,<br>Me ( $Q_{25}/Q_{75}$ ) копий/мл |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
|                                 | MSSA                                                                            | MRSA                           | MRCoNS                          |                                                                                |                                                                                 |
| Фрагменты синовиальной оболочки | 6,12 (5,40/8,71) $\times 10^4$                                                  |                                |                                 | 6,20 (5,19/7,62) $\times 10^3$                                                 | 7,16 (6,01/8,34) $\times 10^3$                                                  |
|                                 | 8,37 (6,98/9,72) $\times 10^3$                                                  | 7,12 (6,26/8,23) $\times 10^3$ | 9,43 (8,13/10,59) $\times 10^3$ |                                                                                |                                                                                 |
| Синовиальная жидкость           | 4,80 (3,27/5,91) $\times 10^3$                                                  |                                |                                 | 5,49 (4,43/7,09) $\times 10^2$                                                 | 6,82 (5,08/7,35) $\times 10^3$                                                  |
|                                 | 7,20 (6,24/8,09) $\times 10^2$                                                  | 7,51 (6,34/8,32) $\times 10^2$ | 8,18 (7,64/9,28) $\times 10^3$  |                                                                                |                                                                                 |

**Таблица 4**  
**Диагностически значимые лабораторные критерии ППИ после эндопротезирования тазобедренного/коленного сустава**  
**Table 4**  
**Diagnostically significant laboratory criteria for PJI after hip/knee endoprosthesis replacement**

| Метод лабораторного исследования                          | Диагностический критерий                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Анализ крови                                              | <ul style="list-style-type: none"><li>Количество лейкоцитов выше <math>12 \times 10^9</math> и доля палочко-ядерных нейтрофилов превышает 10% в крови.</li><li>Сочетанное превышение пороговых уровней СОЭ – 30 мм/ч и СРБ – 10 мг/л в сыворотке крови у пациентов с клиническими признаками ППИ</li></ul> |
| Иммунологическое исследование синовиальной жидкости (ИФА) | <ul style="list-style-type: none"><li>Увеличение содержания IL-4, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\gamma</math>, IgM и IgG.</li><li>Снижение количества IL-10</li></ul>                                                                                                                           |
| Микробиология                                             | Рост микроорганизмов в синовиальной жидкости или $\geq 2$ биоптатах                                                                                                                                                                                                                                        |
| ПЦР-анализ                                                | Выявление ДНК условно-патогенных микроорганизмов рода <i>Staphylococcus</i> spp., рода <i>Streptococcus</i> spp. и семейства <i>Enterobacteriaceae</i> в синовиальной жидкости и (или) фрагментах синовиальной оболочки / хряща                                                                            |

В ходе проведения комплексного анализа показателей общего/биохимического анализа крови, иммунологических показателей, микробиологических молекулярно-генетических маркеров у пациентов с ППИ после эндопротезирования коленного и тазобедренного сустава были выделены диагностически значимые критерии данной патологии (табл. 4).

В данном исследовании были выделены диагностически значимые лабораторные критерии, которые входят в состав комплексной диагностики ППИ после эндопротезирования крупных суставов.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлены диагностически значимые лабораторные критерии ППИ после эндопротезирования крупных суставов: количество лейкоцитов выше  $12 \times 10^9$  и доля палочкоядерных нейтрофилов, превышающая 10%, сочетанное превышение пороговых уровней СРБ сыворотки крови – 10 мг/л и СОЭ – 30 мм/ч, увеличение содержания воспалительных интерлейкинов (IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) и иммуноглобулинов (IgM и IgG) и снижение количества противовоспалительного цитокина IL-10 в синовиальной жидкости, наличие условно-патогенных микроорганизмов рода *Staphylococcus* spp., рода *Streptococcus* spp. и семейства *Enterobacteriaceae* в синовиальной жидкости и (или) фрагментах синовиальной оболочки / хряща.

Сочетанное использование лабораторных и клинико-инструментальных показателей развития ППИ позволит повысить эффективность своевременной диагностики перипротезной инфекции, способствуя выбору оптимального варианта лечения.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Parvizi J, Zmistowski B, Berbari E.F., Bauer T.W., Springer B.D., Della Valle C.J., Garvin K.L., Mont M.A., Wongworawat M.D., Zalavras C.G. New definition for periprosthetic joint infection: From the Workgroup of the Musculoskeletal Infection Society. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2011;469:2992–2994. doi: 10.1007/s11999-011-2102-9
2. Parvizi J, Gehrke T; International Consensus Group on Periprosthetic Joint Infection. Definition of periprosthetic joint infection. *J. Arthroplast.* 2014;29:1331. doi: 10.1016/j.arth.2014.03.009
3. Osmon D.R., Berbari E.F., Berendt A.R., Lew D., Zimmerli W., Steckelberg J.M., Rao N., Hanssen A., Wilson W.R.; Infectious Diseases Society of America. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the infectious diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2013;56(1):e1–e25. doi: 10.1093/cid/cis803
4. Parvizi J, Tan T.L., Goswami K., Higuera C., Della Valle C., Chen A.F., Shohat N. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J. Arthroplast.* 2018;33:1309–1314.e2. doi: 10.1016/j.arth.2018.02.078
5. Shohat N., Bauer T., Buttaro M., Budhiparama N., Cashman J., Della Valle C.J., Drago L., Gehrke T., Marcelino Gomes L.S., Goswami K., Hailer N.P., Han S.B., Higuera C.A., Inaba Y., Jenny J.Y., Kjaersgaard-Andersen P., Lee M., Llinás A., Malizos K., Mont M.A., Jones R.M., Parvizi J., Peel T., Rivero-Boschert S., Segreti J., Soriano A., Sousa R., Spanghel M., Tan T.L., Tikhilov R., Tuncay I., Winkler H., Witso E., Wouthuyzen-Bakker M., Young S., Zhang X., Zhou Y., Zimmerli W. Hip and knee section, what is the definition of a periprosthetic joint infection (PJI) of the knee and the hip? can the same criteria be used for both joints?: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *J Arthroplasty.* 2019;34(25):S325–S327. doi: 10.1016/j.arth.2018.09.045
6. Villa J.M., Pannu T.S., Piuze N., Riesgo A.M., Higuera C.A. Evolution of diagnostic definitions for periprosthetic joint infection in total hip and knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2020;35(35):9–13. doi: 10.1016/j.arth.2019.10.032
7. Carli A.V., Abdelbary H., Ahmadzai N., Cheng W., Shea B., Hutton B., Sniderman J., Philip Sanders B.S., Esmaeilisaraji L., Skidmore B., Gauthier-Kwan O.Y., Bunting A.C., Gauthier P., Crnic A., Logishetty K., Moher D., Fergusson D., Beaulé P.E. Diagnostic accuracy of serum, synovial, and tissue testing for chronic periprosthetic joint infection after hip and knee replacements: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am.* 2019;101(7):635–649. doi: 10.2106/JBJS.18.00632
8. Kheir M.M., Tan T.L., Shohat N., Foltz C., Parvizi J. Routine diagnostic tests for periprosthetic joint infection demonstrate a high false-negative rate and are influenced by the infecting organism. *J Bone Joint Surg Am.* 2018;100(23):2057–2065. doi: 10.2106/JBJS.17.01429
9. Akgün D., Müller M., Perka C., Winkler T. The serum level of C-reactive protein alone cannot be used for the diagnosis of prosthetic joint infections, especially in those caused by organisms of low virulence. *Bone Joint J.* 2018;100-B(11):1482–1486. doi: 10.1302/0301-620X.100B11.BJJ-2018-0514.R1
10. McArthur B.A., Abdel M.P., Taunton M.J., Osmon D.R., Hanssen A.D. Seronegative infections in hip and knee arthroplasty: periprosthetic infections with normal erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level. *Bone Joint J.* 2015;97-B(7):939–944. doi: 10.1302/0301-620X.97B7.35500
11. Tande A.J., Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):302–345. doi: 10.1128/CMR.00111-13



12. Luppi V., Regis D., Sandri A., Magnan B. Diagnosis of periprosthetic hip infection: A clinical update. *Acta Biomed.* 2023;94:e2023095. doi: 10.23750/abm.v94iS2.13792
13. Chisari E., Parvizi J. Accuracy of blood-tests and synovial fluid-tests in the diagnosis of periprosthetic joint infections. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2020;18:1135–1142. doi: 10.1080/14787210.2020.1792771
14. Deirmengian C., Hallab N., Tarabishy A., Della Valle C., Jacobs J.J., Lonner J., Booth R.E.Jr. Synovial fluid biomarkers for periprosthetic infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(8):2017–2023. doi: 10.1007/s11999-010-1298-4
15. Gollwitzer H., Dombrowski Y., Prodinger P.M., Peric M., Summer B., Hapfelmeier A., Saldamli B., Pankow F., von Eisenhart-Rothe R., Imhoff A.B., Schaubert J., Thomas P., Burgkart R., Banke I.J. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(7):644–651. doi: 10.2106/JBJS.L.00205
16. Kalbian I., Park J.W., Goswami K., Lee Y.K., Parvizi J., Koo K.H. Culture-negative periprosthetic joint infection: prevalence, aetiology, evaluation, recommendations, and treatment. *Int Orthop.* 2020;44(7):1255–1261. doi: 10.1007/s00264-020-04627-5
17. Vandercam B., Jeumont S., Cornu O., Yombi J.C., Lecouvet F., Lefèvre P., Irenge L.M., Gala J.L. Amplification-based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. *J Mol Diagn.* 2008;10(6):537–543. doi: 10.2353/jmoldx.2008.070137
18. Esteban J., Gómez-Barrena E. An update about molecular biology techniques to detect orthopaedic implant-related infections. *EFORT Open Rev.* 2021;6(2):93–100. doi: 10.1302/2058-5241.6.200118
19. Kostjuk S., Polujan O., Ben'ko A., Ljamceva A., Solovej A. Basic immunologic tests for synovial fluid local immunity assessment and criteria for its alterations in periprosthetic infection after knee replacement. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe.* 2024;13(1):78–88. doi: 10.34883/PI.2024.13.1.007 (in Russian)
20. Kostjuk S., Polujan O., Ljamceva A., Ben'ko A. The main immunological indicators reflecting local immunity in the synovial fluid in periprosthetic infection after joints endoprosthesis replacement. *Biochemistry and Molecular Biology.* 2024;3,2(5):28–32. (in Russian)



Маджарова О.А.<sup>1</sup>✉, Эйдельштейн И.А.<sup>2</sup>, Абельская И.С.<sup>1</sup>, Карпов И.А.<sup>3</sup>, Романов А.В.<sup>2</sup>, Козлов Р.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Республиканский клинический медицинский центр Управления делами Президента Республики Беларусь, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск, Россия

<sup>3</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

## Разработка и оценка эффективности использования в лабораторной практике молекулярно-генетических методов одновременного выявления в биологическом материале *Mycoplasma genitalium* и маркеров ее резистентности к макролидам

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** концепция и дизайн исследования, редактирование, сбор материала, обработка, написание текста – Маджарова О.А.; концепция и дизайн исследования, редактирование, обработка данных – Эйдельштейн И.А.; анализ материала – Романов А.В.; концепция и организация проекта – Козлов Р.С., Абельская И.С., Карпов И.А.

Подана: 10.03.2025

Принята: 19.06.2025

Контакты: o.madzharova@mail.ru

### Резюме

**Цель.** Оценить эффективность использования в лабораторной практике усовершенствованных технологий мультиплексного ПЦР-анализа для одновременного выявления в биологическом материале ДНК *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК, определяющих устойчивость микоплазмы к макролидам.

**Материалы и методы.** 33 образца ДНК *Mycoplasma genitalium* из города Минска Республики Беларусь исследовались на наличие в генетическом материале маркеров резистентности к макролидам. Тестирование проводилось при помощи двух технологий мультиплексного ПЦР-анализа в режиме реального времени, предназначенных для обнаружения в биологическом материале *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК, связанных с устойчивостью к макролидам. На базе центральной лаборатории (НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск) применялся метод ПЦР в варианте FRET (с резонансным переносом энергии флуоресценции) с последующим исследованием выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру. На базе ПЦР-лаборатории ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь применялся метод ПЦР в варианте DPO (с двойным праймингом олигонуклеотида) для выявления ДНК *M. genitalium* с использованием тест-системы Allplex MG & AziR Assay (Seegene, Южная Корея).

**Результаты.** Тестирование образцов ДНК *Mycoplasma genitalium* при помощи технологии ПЦР-DPO подтвердило наличие ДНК *M. genitalium* в 97% образцов. Распространенность мутаций к макролидам составила 21,87%. Мутационный профиль



представлен двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рРНК *M. genitalium*: в позициях A2059G 9,38% и A2058G 12,5%. Тестирование образцов ДНК *Mycoplasma genitalium* с использованием технологии ПЦР-FRET подтвердило наличие ДНК *M. genitalium* в 78,7% образцов. Распространенность мутаций к макролидам составила 31%. Мутационный профиль представлен двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рРНК *M. genitalium*: в позиции A2059G (15,5%) и A2058G (15,5%). Нуклеотидные замены в позиции 2611 не были выявлены. В 87,5% образцов с констатированными мутациями результаты исследования с использованием ПЦР-FRET и ПЦР-DPO совпадают. Отмечено расхождение по одному варианту нуклеотидной замены в гене 23S рРНК в позиции A2059G.

**Заключение.** Внедрение в алгоритм диагностики микоплазменной инфекции, обусловленной *M. genitalium*, методов молекулярной диагностики для одновременного выявления в биологическом материале *Mycoplasma genitalium* и генетических маркеров резистентности к макролидам позволит урегулировать вопросы рационального назначения антибиотикотерапии и элиминации возбудителя.

**Ключевые слова:** *Mycoplasma genitalium*, макролиды, резистентность, антибактериальные препараты, мутации, 23S рРНК

Majorova O.<sup>1</sup>✉, Eidelstein I.<sup>2</sup>, Abelskaya I.<sup>1</sup>, Karpov I.<sup>3</sup>, Romanov A.<sup>2</sup>, Kozlov R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Republican Clinical Medical Center of the Administration of the President of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Institute of Antimicrobial Chemotherapy of the Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

<sup>3</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

## Elaborating Molecular Genetic Methods for Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Markers of Its Resistance to Macrolides in Biological Material and Evaluating Their Effectiveness in Laboratory Practice

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** study concept and design, editing, material collection, processing, text writing – Majorova O.; study concept and design, editing, processing – Eidelstein I.; material analyzing – Romanov A.; project concept and management – Kozlov R., Abelskaya I., Karpov I.

Submitted: 10.03.2025

Accepted: 19.06.2025

Contacts: o.madzharova@mail.ru

### Abstract

**Purpose.** To evaluate the effectiveness of using improved multiplex PCR analysis technologies in laboratory practice for simultaneous detection of *M. genitalium* DNA and mutations in the 23S rRNA gene that determine mycoplasma resistance to macrolides in biological material.

**Materials and methods.** 33 *Mycoplasma genitalium* DNA samples from Minsk, Republic of Belarus, were tested for the presence of macrolide resistance markers in their genetic material. The testing was performed using two real-time multiplex PCR assays designed to detect *M. genitalium* and mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide resistance in biological material. The central laboratory (Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Smolensk) used the FRET (fluorescence resonance energy transfer) PCR method, followed by testing the identified mutations using Sanger sequencing. The PCR laboratory of the Republican Clinical Medical Center within the Office of the President of the Republic of Belarus applied the DPO (double oligonucleotide priming) PCR method to detect *M. genitalium* DNA using the Allplex MG&AziR Assay test system (Seegene, South Korea).

**Results.** Testing of *Mycoplasma genitalium* DNA samples using PCR-DPO technology confirmed the presence of *M. genitalium* DNA in 97% of samples. The prevalence of macrolide mutations was 21.87%. The mutational profile was represented by two variants of nucleotide substitutions in the 23S rRNA gene of *M. genitalium*: at positions A2059G and A2058G with 19.38% and 2.5%, respectively. Testing of *Mycoplasma genitalium* DNA samples using PCR-FRET technology confirmed the presence of *M. genitalium* DNA in 78.7% of samples. The prevalence of macrolide mutations was 31%. The mutational profile was represented by two variants of nucleotide substitutions in the 23S rRNA gene of *M. genitalium*: at positions A2059G (15.5%) and A2058G (15.5%). Nucleotide substitutions at position 2611 were not detected. In 87.5% of samples with detected mutations, the results of the study using PCR-FRET and PCR-DPO were consistent. A discrepancy was noted for one variant of nucleotide substitution in the 23S rRNA gene at position A2059G.

**Conclusion.** Implementing molecular diagnostic methods into the algorithm of diagnosing mycoplasma infection caused by *M. genitalium* for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and genetic markers of macrolide resistance in biological material will resolve the issues of rational administration of antibiotic therapy and elimination of the pathogen.

**Keywords:** *Mycoplasma genitalium*, macrolides, resistance, antibacterial drugs, mutations, 23S rRNA

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

*Mycoplasma genitalium* вызывает инфекции, передающиеся половым путем (ИППП) [1]. Принадлежность возбудителя к группе облигатных патогенов, приводящих к развитию патологических процессов в органах мочеполовой системы, предусматривает определенный алгоритм диагностики: идентификация и назначение терапии в соответствии с чувствительностью к антибактериальным препаратам. Важно учитывать, что особенности биологии развития *M. genitalium* обуславливают алгоритм этиологической диагностики и терапии данного возбудителя.

В настоящее время процесс обнаружения *M. genitalium* в биологическом материале пациента не вызывает затруднений. Внедрение в практику лабораторий методов молекулярной диагностики ускорило процесс выявления этиологического фактора. В Европейском руководстве по ведению инфекций, вызванных *M. genitalium* (2021 г.),



метод амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) рекомендован как единственно эффективный, позволяющий идентифицировать специфическую нуклеиновую кислоту (НК) *M. genitalium* в образцах биологического материала [2]. В Республике Беларусь рутинная этиологическая диагностика *M. genitalium* также основывается на применении метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), который включен в алгоритмы диагностики, представленные в клинических протоколах Министерства здравоохранения Республики Беларусь [3–5].

Эффективное лечение *M. genitalium*-инфекции является приоритетной задачей вследствие активно формирующейся устойчивости к антибиотикам, применяемым для элиминации возбудителя. К препаратам первой линии терапии относятся макролиды [2, 6, 7]. В последнее время особую актуальность приобретает проблема растущего уровня резистентности к макролидам у *M. genitalium*, о чем свидетельствуют данные Глобального систематического обзора с метаанализом (Machalek D.A. et al., 2020) [8]. Установлена генетическая природа механизмов антибиотикорезистентности (Parnham et al., 2014). Тестирование *M. genitalium* на наличие генетических маркеров резистентности позволяет выявлять штаммы, устойчивые к данной группе препаратов, и корректировать терапию в соответствии со статусом возбудителя. К настоящему времени ряд зарубежных документов, регламентирующих алгоритм диагностики и лечения микоплазменной инфекции, обусловленной *M. genitalium*, пересмотрен в пользу применения технологий тестирования на наличие генетических маркеров резистентности к антибактериальным препаратам [6, 7].

В Республике Беларусь для лечения неосложненных форм урогенитальных заболеваний, обусловленных *M. genitalium*, предлагаются к использованию, наряду с доксициклином, схемы терапии азитромицином [3]. В клиническом протоколе оказания медицинской помощи пациентам с ИППП рекомендации по тестированию возбудителя на маркеры антибиотикорезистентности отсутствуют. Следует отметить, что в учебно-методическом пособии по диагностике и терапии *M. genitalium*-инфекции предлагается проводить тестирование *M. genitalium* на маркеры резистентности к макролидам только лишь в случае неэффективности проводимой антибактериальной терапии [9]. Примечательно, что для диагностики генетических маркеров резистентности предлагается применение методов молекулярно-биологического анализа (секвенирующая ПЦР) [9], что до известного времени в условиях повседневной лабораторной практики осуществить было невозможно в силу отсутствия зарегистрированных министерствами здравоохранения Республики Беларусь и Российской Федерации коммерческих тест-систем.

Специалисты Всемирной организации здравоохранения в рамках Глобальной стратегии сектора здравоохранения по инфекциям, передаваемым половым путем, на период 2022–2030 гг. в отношении *M. genitalium* рекомендуют проводить мониторинг антибиотикорезистентности и неудач в терапии. Результаты эпидемиологического надзора должны использоваться для регулярного обновления национальных клинических рекомендаций и политики в области лечения [10]. К настоящему времени клинический протокол оказания медицинской помощи пациентам с ИППП не учитывает эпидемиологическую ситуацию по антибиотикорезистентности *M. genitalium*; это вызвано тем, что мониторинг резистентности *M. genitalium* в Республике Беларусь не проводился.

Последние данные по уровню резистентности *M. genitalium* в стране были опубликованы в 2013 году. Частота распространения маркеров антибиотикорезистентности к макролидам в клинических изолятах *M. genitalium* от беременных женщин (n=34) составляла 26,47% (9/34). Как видно, уже на тот период проблема антибиотикорезистентности была актуальна для Республики Беларусь [11].

К настоящему времени ранее предложенные к использованию в Республике Беларусь алгоритмы диагностики и терапии *M. genitalium*-инфекции требуют совершенствования. Современный алгоритм ведения пациентов с *M. genitalium*-инфекцией должен учитывать результаты частоты встречаемости и характер мутаций, определяющих резистентность возбудителя к антибиотикам.

С 2022 года Республика Беларусь принимает участие в многоцентровом проекте России DeMaRes (Detection of Macrolide Resistance – *Mycoplasma genitalium* – Анализ распространенности мутаций резистентности к макролидам у *Mycoplasma genitalium*). Исследование по изучению спектра и распространенности маркеров резистентности к макролидам у *M. genitalium* осуществляется в рамках совместного научно-исследовательского сотрудничества в сфере медицинской науки между учреждением образования «Смоленский государственный медицинский университет» (СГМУ) Министерства здравоохранения Российской Федерации и государственным учреждением «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь (ГУ РКМЦ).

Участие Республики Беларусь в проекте DeMaRes с марта 2022 года по март 2024 года позволило определить частоту распространения мутаций резистентности к макролидам у *M. genitalium*, составившую 15,22% (49/322), и профиль генетических детерминант резистентности – A2059G 10,25% (33/322) и A2058G 4,97% (16/322). Все результаты, полученные в рамках проекта DeMaRes, депонированы и импортированы на онлайн-платформу для анализа и обмена данными по антибиотикорезистентности AMRcloud (<https://amrcloud.net/ru/project/demares/>).

Результаты мониторинга антибиотикорезистентности у *M. genitalium* демонстрируют необходимость повышения эффективности лечения. Это, в свою очередь, включает стратегии, ориентированные на исследование устойчивости, а также на создание новых противомикробных препаратов и подходов к комбинированию противомикробных препаратов, что может быть осуществлено путем внедрения ПЦР-системы по выявлению генетических маркеров антибиотикорезистентности.

В настоящем исследовании продемонстрирован опыт применения двух разработок мультиплексного ПЦР-анализа: в варианте FRET (с резонансным переносом энергии флуоресценции) и DPO (с двойным праймингом олигонуклеотида), предназначенных для обнаружения в биологическом материале *M. genitalium* и мутаций в гене 23S rPHK, связанных с устойчивостью к макролидам.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить эффективность использования в лабораторной практике усовершенствованных технологий мультиплексного ПЦР-анализа для одновременного выявления в биологическом материале ДНК *M. genitalium* и мутаций в гене 23S rPHK, определяющих устойчивость микоплазмы к макролидам.



## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование по изучению одновременного выявления *M. genitalium* и генетических маркеров резистентности к макролидам было выполнено на 33 изолятах *M. genitalium*. Коллекция из 33 положительных образцов ДНК *M. genitalium* представлена из двух лабораторий г. Минска Республики Беларусь: УЗ «Минский городской клинический центр дерматовенерологии» и ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь. Биологический материал, представленный соскобами со слизистых оболочек уретры ( $n=11$ ) и цервикального канала ( $n=22$ ), был получен от пациентов, обратившихся за медико-консультативной помощью к специалистам дерматовенерологам, гинекологам и урологам специализированных и многопрофильных медицинских учреждений Минска.

В лабораториях указанных учреждений здравоохранения клинический образец был классифицирован как положительный на основании первичного рутинного ПЦР-тестирования с использованием наборов реагентов, зарегистрированных на территории Республики Беларусь.

Выделение ДНК *M. genitalium* осуществлялось с использованием наборов «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ, Россия), «Проба-НК-Плюс и Проба-Рапид» («ДНК-технология», Россия). Выявление ДНК *M. genitalium* проводилось на основе технологии ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, для чего применялись наборы реагентов: «ПЛАЗМОГЕН-*M. Mycoplasma genitalium*» («ДНК-технология», Россия), «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis* / *Mycoplasma genitalium*» («Вектор-Бест», Россия) и «АМПЛИСЕНС® *C. trachomatis* / *Ureplasma spp.* / *M. genitalium* / *M. hominis* – Мультипрайм – FL» (ФБУН ЦНИИ, Россия) – в моноплексном и мультиплексном формате, предназначенные для исследования пациентов на предмет выявления *M. genitalium*, а также для исследования микрофлоры урогенитального тракта у женщин и мужчин (Фемофлор® 16, Фемофлор® 8, Фемофлор® Скрин, Андрофлор®, Андрофлор® Скрин («ДНК-технология», Россия). Использовались регистрирующие амплификаторы ДТ-96 и ДТ-lite («ДНК-технология», Россия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

При обнаружении ДНК *M. genitalium* образцы аликвотировались и хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ : одна часть аликвоты образца оставалась на базе ГУ РКМЦ, а другая передавалась в центральную лабораторию (НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск) для дальнейшего тестирования на наличие генетических маркеров резистентности к макролидам.

### **Выявление специфических мутаций макролидорезистентности**

На базе НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Министерства здравоохранения России осуществлялся анализ с использованием модифицированного метода ПЦР в режиме реального времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером (далее ПЦР-FRET) [12]. Разработанный метод обеспечивает возможность выявлять нуклеотидные замены в гене 23S рРНК *M. genitalium* в позициях 2058, 2059 и 2611 (согласно нумерации по *E. coli*). Постаmplификационный анализ температур плавления ( $T_m$ ) (полученных пиков) опытных и контрольных образцов позволял сделать вывод о наличии мутации в исследуемом образце либо идентифицировать как «дикий» фенотип – без мутаций (рис. 1).

Во всех образцах ДНК *M. genitalium*, несущих мутации, в целях подтверждения характера нуклеотидных замен использовался метод секвенирования соответствующих фрагментов гена по Сэнгеру с применением наборов реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Life Technologies, США).

На базе ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь осуществлялось тестирование образцов (n=33) на предмет выявления специфических мутаций макролидорезистентности с использованием технологии ПЦР-DPO (Allplex MG & AziR Assay (Seegene, Южная Корея). Набор реагентов предназначен для выявления в биологическом материале ДНК *M. genitalium* и 6 мутаций в гене 23S рПНК (A2058G, A2058C, A2058T, A2059G,

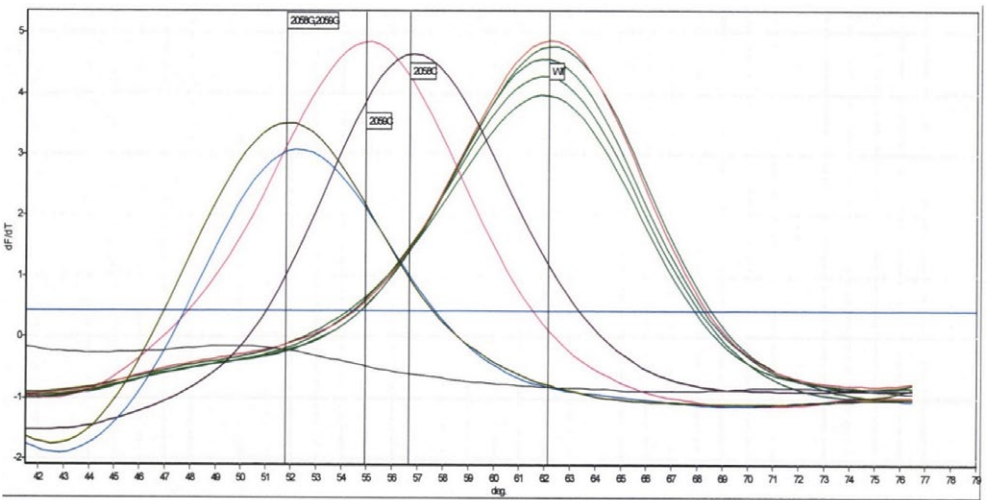


Рис. 1. Пример анализа 23S рПНК *M. genitalium* посредством оценки характера кривых плавления зондов после проведения ПЦР в режиме реального времени  
Fig. 1. Example of the analysis of 23S rRNA *M. genitalium* by evaluating the melting curves of probes after real-time PCR

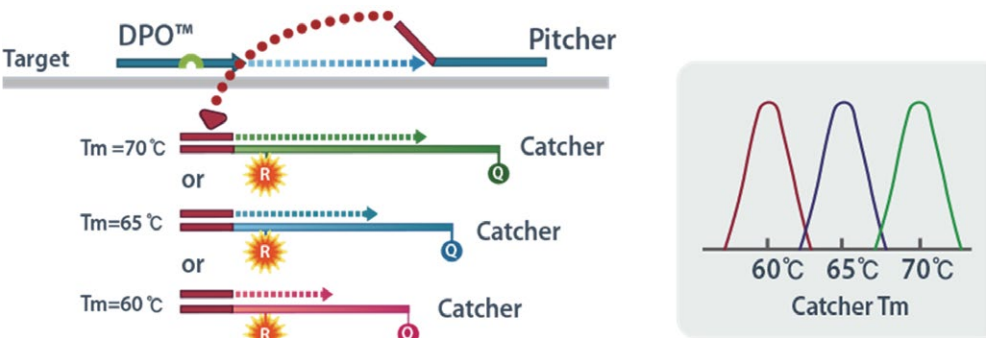


Рис. 2. Схема технологии TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension)  
Fig. 2. Technology diagram TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension)



**Рис. 3. Пример анализа 23S рННК *M. genitalium* с помощью программного обеспечения Seegene Viewer, версия 1.6**

**Fig. 3. Example of the analysis of 23S ribosomal ribonucleic acid *M. genitalium* using the Seegene Viewer software version 1.6**

A2059C, A2059T), определяющих устойчивость к азитромицину. Выявление возбудителя и нуклеотидных замен основывалось на аналитической методике MuDT (Multiple Detection Temperatures), позволяющей получить значение мульти-Ct (порогового цикла) в одном канале флуоресценции при различных температурах обнаружения (72 °C и 60 °C) без анализа кривой плавления на приборе для ПЦР в режиме реального времени.

В основу принципов исследования MuDT положена методика TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension) [13], в которой используется непрягая генерация сигнала за счет применения двух ключевых компонентов, пары праймеров DPO™ (ПЦР-DPO) – Pitcher и Catcher, обеспечивая таким образом высокоспецифичную амплификацию целевой области [13]. Pitcher как олигонуклеотид двойного назначения специфически связывается с ДНК-мишенью, а затем при помощи 5'-нуклеазы расщепляется с высвобождением немеченого компонента, который служит праймером для искусственной матрицы с двумя метками, – Catcher (рис. 2).

Высвобожденная часть гибридизируется с захватывающей частью устройства Catcher, в результате чего формируется дуплексный Catcher. Это, в свою очередь, приводит к удлинению Catcher и генерации сигнала флуоресценции, который напрямую коррелирует с количеством ДНК-мишени и может быть проанализирован в реальном времени (рис. 3) [13].

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение двух технологий ПЦР-анализа для выявления специфических мутаций макролидорезистентности у *M. genitalium* было проведено на коллекции из 33 образцов ДНК *M. genitalium*, собранных по городу Минску. Биологический материал представлен мазками и соскобами из урогенитального тракта мужчин и женщин. Данный вид биологического материала рекомендован алгоритмом выявления

**Таблица 1**  
**Сравнительные характеристики показателей тест-систем для выявления специфических мутаций макролидорезистентности у *M. genitalium***  
**Table 1**  
**Comparative characteristics of the indicators of test systems for the detection of specific mutations of macrolidoresistance in *M. genitalium***

| Показатели                                                                                                  | ПЦР-DPO<br>Allplex MG & AziR Assay<br>(Seegene, Южная Корея)                          | ПЦР-FRET<br>Разработка НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ<br>Минздрава России, Смоленск |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Предел обнаружения:<br>■ <i>M. genitalium</i><br>■ нуклеотидные замены в гене 23S рРНК <i>M. genitalium</i> | 10 ЦИЕ/мл<br>50 копий/реакция,<br>100 копий/реакция (A2059T)                          | Не менее 500 ГЭ/реакция<br>Не менее 500 ГЭ/реакция                                                |
| Спектр нуклеотидных замен гена 23S рРНК <i>M. genitalium</i> (согласно нумерации <i>E. coli</i> )           | A2058G, A2058C, A2058T, A2059G, A2059C, A2059T                                        | A2058G, A2058C, A2059G, A2059C, A2611G, C2611T, A2062T                                            |
| Клиническая чувствительность                                                                                | 95%                                                                                   | 97%                                                                                               |
| Метод выявления                                                                                             | ПЦР в режиме реального времени (технология MuDT с двойным праймингом олигонуклеотида) | ПЦР в режиме реального времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером (технология FRET) |
| Биологический материал                                                                                      | Моча, урогенитальные мазки, образцы, предназначенные для жидкостной цитологии         | Моча, урогенитальные мазки                                                                        |

Примечание: ГЭ – количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов; ЦИЕ – цветоизменяющие единицы в единице объема биологического образца.

*M. genitalium* согласно клиническим протоколам Республики Беларусь [3–5]. В структуре образцов превалировала доля соскобов цервикального канала женщин – 67% (22/33), на образцы соскобов урогенитального тракта мужчин пришлось 33% (11/33). Представленные ранее методы молекулярно-генетического анализа валидированы разработчиками для исследования урогенитальных соскобов/мазков и мочи. В случае применения ПЦР-DPO возможен также вариант тестирования образцов, предназначенных для жидкостной цитологии.

Технические характеристики запатентованных методов представлены в табл. 1. Оба метода представляют собой мультиплексный анализ ПЦР в режиме реального времени, который позволяет одновременно амплифицировать и обнаруживать не только мутации, но и саму целевую нуклеиновую кислоту *M. genitalium*.

**Обнаружение *M. genitalium***

По итогам тестирования не все образцы, идентифицированные в локальных лабораториях как положительные, подтвердили свой статус. Согласно алгоритмам интерпретации результатов исследования, таковые признаются недействительными и исключаются из дальнейшего анализа на выявление мутаций. Частота выявления образцов без обнаружения в них ДНК *M. genitalium* была значительно ниже для ПЦР-DPO и составила 3% (1/33) по сравнению с таковой с использованием ПЦР-FRET – 21% (7/33) (табл. 2).



**Таблица 2**

**Результаты обнаружения ДНК *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК**

**Table 2**

**Results of detection of *M. genitalium* DNA and mutations in the 23S rRNA gene**

| Тест-системы | Результат обнаружения | <i>M. genitalium</i> | Результат обнаружения мутации 23S рРНК <i>M. genitalium</i> |
|--------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------|
| ПЦР-DPO      | Обнаружено            | 32                   | 7                                                           |
|              | Не обнаружено         | 1                    | 1                                                           |
|              | Всего                 | 33                   | 8                                                           |
| ПЦР-FRET     | Обнаружено            | 26                   | 8                                                           |
|              | Не обнаружено         | 7                    | 0                                                           |
|              | Всего                 | 33                   | 8                                                           |

Соотношение между положительными результатами ДНК *M. genitalium* и истинно положительными результатами позволило определить диагностическую чувствительность теста, реализуемого с использованием методов ПЦР-анализа относительно целевой мишени – *M. genitalium*: диагностическая чувствительность тестов, достигаемая применением ПЦР-DPO и ПЦР-FRET в реальном времени, составила 96,9% и 78,7% соответственно (табл. 2).

Поскольку в сравнении с другими возбудителями ИППП бактериальная нагрузка *M. genitalium* на организм пациента низкая, особенно важна достаточная чувствительность используемых тестов [14].

Анализ влияния видов биологического образца на обнаружение *M. genitalium* различий не выявил: в 57% (4/7) микоплазма была обнаружена в соскобах цервикального канала женщин и в 43% (3/7) – в мазках урогенитального тракта мужчин. Дополнительный анализ исключенных из исследования образцов с применением тест-системы «ПЛАЗМОГЕН-Mr. *Mycoplasma genitalium*» («ДНК-технология», Россия) с пределом обнаружения в 5 копий ДНК *M. genitalium* на амплификационную пробирку (в эквиваленте 50–300 копий/образец) подтвердил наличие нуклеиновой кислоты возбудителя. Следует подчеркнуть, что предел обнаружения целевой мишени может варьировать в зависимости от используемого набора реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения). Таким образом, при сопоставлении аналитических показателей предела обнаружения для ДНК *M. genitalium*, устанавливаемых применением двух методов выявления резистентности (см. табл. 1), становится очевидным преимущество ПЦР-DPO.

Следует также отметить важность учета ряда преаналитических факторов. Первоначальная низкая бактериальная обсемененность *M. genitalium* в биологическом образце, а также риск деградации ДНК возбудителя при повторном замораживании и оттаивании могут повлиять на качество выявления целевой мишени возбудителя.

Резюмируя изложенное, хотелось бы подчеркнуть, что для успешного тестирования образцов на предмет выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности немаловажными факторами являются качество выделенных биологических образцов и соблюдение правил преаналитики.

### **Обнаружение маркеров устойчивости к макролидам у *M. genitalium***

Результаты анализа положительных образцов ДНК *M. genitalium* после исключения невалидных результатов по каждому методу представлены в табл. 3.

**Таблица 3**  
**Результаты обнаружения маркеров устойчивости к макролидам у *M. genitalium* (нумерация по *E. coli*)**  
**Table 3**  
**Results of detection of macrolide resistance markers in *M. genitalium* (numbering by *E. coli*)**

| Показатели                                              |        | ПЦР-DPO | ПЦР-FRET |
|---------------------------------------------------------|--------|---------|----------|
| Спектр выявленных мутаций 23S рПНК <i>M. genitalium</i> | A2058G | 4       | 4        |
|                                                         | A2058C | 0       | 0        |
|                                                         | A2058T | 0       | 0        |
|                                                         | A2059G | 3       | 4        |
|                                                         | A2059C | 0       | 0        |
|                                                         | A2059T | 0       | 0        |
|                                                         | A2611G | –       | 0        |
|                                                         | A2611C | –       | 0        |
|                                                         | A2611T | –       | 0        |
| Всего                                                   |        | 7       | 8        |

**ПЦР-FRET-разработка НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России (Смоленск) для выявления маркеров резистентности к макролидам**

В ходе анализа результатов (n=26) на наличие маркеров резистентности к макролидам были выявлены мутации в 31% (8/26) образцов, в 69% (18/26) образцов мутации не были обнаружены – wild type. Анализ характера нуклеотидных замен в образцах с выявленными мутациями (n=8) определил мутационный профиль, который представлен в равной степени двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рПНК *M. genitalium*: в позициях A2059G 15,5% (4/26) и A2058G 15,5% (4/26). Нуклеотидные замены в позиции 2611 не были выявлены (см. табл. 3).

Все установленные в ходе ПЦР-анализа варианты нуклеотидных замен в образцах ДНК *M. genitalium* были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру соответствующих фрагментов гена по технологии, описанной ранее [12].

**Тестирование (n=32) образцов с использованием технологии ПЦР-DPO (Allplex MG & AziR Assay (Seegene))**

Данное тестирование позволило получить следующие результаты: в 21,87% (7/32) образцов выявлены мутации, у оставшихся 78,13% (26/32) образцов мутации не были обнаружены – wild type.

Изучение характера нуклеотидных замен в семи образцах определило мутационный профиль, который также представлен двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рПНК *M. genitalium*: в позициях A2059G – 9,38% (3/32) и A2058G – 12,5% (4/32) (см. табл. 3).

Важно отметить, что в семи из восьми исследованных образцов с выявленными мутациями результаты, полученные двумя примененными методами, совпадают (см. табл. 3). Наблюдается расхождение по одному варианту нуклеотидной замены в гене 23S рПНК в позиции A2059G. На базе НИИ антимикробной химиотерапии данный образец был идентифицирован как положительный и подтвержден методом секвенирования по Сэнгеру. В свою очередь, по итогам тестирования с использованием



технологии ПЦР-DPO результат исследования был интерпретирован как дикий фенотип – без мутаций. Согласно критериям производителя Seegene, данный образец был признан отрицательным: обнаружение ДНК *M. genitalium* при отсутствии детекции сигнала по каналам, определяющим мутации в гене 23S рРНК.

Учитывая тот факт, что все выявленные на базе НИИ антимикробной химиотерапии мутации были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру (который является «золотым стандартом» для подтверждения последовательностей ДНК), можно предположить, что в результате тестирования при помощи технологии ПЦР-DPO было пропущено 12,5% (1/8) образцов, содержащих маркеры резистентности к макролидам. Такой результат (12,5% (1/8)) демонстрирует риск неэффективности лечения при назначении азитромицина, что вызывает беспокойство.

Следует иметь в виду, что образцы с низкой бактериальной нагрузкой могут быть ошибочно классифицированы как чувствительные к макролидам (дикий тип), поскольку выявление генетических маркеров резистентности к данной группе антибактериальных препаратов менее чувствительно, чем обнаружение *M. genitalium* [15, 16].

Общие характеристики обоих методов мультиплексного ПЦР-анализа принципиальных различий не имеют и демонстрируют доступность применения в рутинной практике лаборатории.

Входной объем образца биологического материала для выделения ДНК *M. genitalium* варьирует от 100 мкл. В данном случае такой объем не будет являться ограничивающим фактором для соскобов и мазков урогенитального тракта, что позволит проводить повторное выделение в случае получения невалидных результатов либо использовать для других молекулярных диагностических тестов. Алгоритмы приготовления смесей и постановка ПЦР-реакции не сложны. Объем полученного препарата ДНК для анализа составляет 5 мкл, что также позволяет использовать оставшийся объем для постановки иных диагностических тестов, например для обнаружения мутаций, связанных с резистентностью к фторхинолонам.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое внедрение в лабораторную практику технологий выявления генетических маркеров резистентности к макролидам в положительных образцах ДНК *M. genitalium* на базе крупных централизованных лабораторий с последующим анализом полученных данных является весьма актуальным, составляя основную базу изучения эпидемиологии резистентности.

Осуществленный анализ эффективности проводимой антибактериальной терапии у пациентов в соответствии с выявленным статусом антибиотикорезистентности возбудителя может служить основанием для внесения изменений в алгоритм терапии и диагностики данной нозологической формы заболевания.

Предложенный алгоритм лабораторного исследования позволит повысить эффективность лечения благодаря достигаемому с его использованием рациональному назначению антибиотикотерапии и проведению элиминации возбудителя.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Khatib N., Bradbury C., Chalker V., et al. Prevalence of *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in men with urethritis attending an urban sexual health clinic. *Int J STD AIDS*. 2015;26(6):388–392. DOI: 10.1177/0956462414539464
2. Jensen J.S., et al. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022 May;36(5):641–650. DOI: 10.1111/jdv.17972
3. Clinical protocol for diagnosis and treatment of patients with sexually transmitted infections (approved by the order of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated 10.29.2009 No. 1020). Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/dlya-spetsialistov/standarty-obsledovaniya-i-lecheniya/dermatovenerologiya.php> (accessed November 14, 2024) (In Russ.)
4. Clinical protocol "Medical observation and provision of medical care to women in obstetrics and gynecology" (approved by the Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated 19.02.2018 No. 17). Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/dlya-spetsialistov/standarty-obsledovaniya-i-lecheniya/akusherstvo-ginekologiya.php> (accessed November 14, 2024) (In Russ.)
5. Clinical protocol for diagnostics and treatment of patients (adult population) with urological diseases when providing medical care in outpatient and inpatient settings of district, regional and republican healthcare organizations of the Republic of Belarus (approved by order of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated 22.09.2011 No. 920). Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/dlya-spetsialistov/standarty-obsledovaniya-i-lecheniya/urologiya.php> (accessed November 14, 2024) (In Russ.)
6. Unemo M., Shipitsyna E., Savicheva A., et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections in east European countries. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(5):461467. DOI: 10.2340/00015555-0929
7. Workowski K.A., Bachmann L.H., Chan P.A., et al. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm Reports*. 2021;70(4):1–187. DOI: 10.15585/mmwr.rr7004a1
8. Machalek D.A., Tao Y., Shilling H., et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and metaanalysis. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(11):1302–1314. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30154-7
9. Shimanskaya I.G., Kostyuk S.A., et al. (2013) *Diagnosis and treatment of infections of the urogenital tract caused by Mycoplasma genitalium, taking into account the molecular and biological characteristics of the pathogen: an educational and methodical manual*. Minsk: BelMAPO. (In Russ.)
10. Global Health Sector Strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022–2030 (GHSS) July, 2022. Available at: <https://www.who.int/ru/publications/i/item/9789240053779>
11. Kostyuk S.A., Rudenkova T.V., Badigina N.A., et al. Detecting of genetic markers of resistance to antibacterial medicines in *Mycoplasma genitalium* clinical isolates. *Medical Journal*. 2013;(4):76–79. (In Russ.)
12. Eidelshstein I.A., Romanov A.V., Kozlov R.S. Development of a real-time PCR assay for detection of macrolide resistance mutation in *Mycoplasma genitalium* and its application for epidemiological surveillance in Russia. *Microbial Drug Resistance*. 2023;29(3):69–77. DOI: 10.1089/mdr.2022.0131
13. Young-Jo Lee, Daeyoung Kim, Kihoon Lee, et al. Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. *Scientific Reports*. 2014;4:7439. DOI: 10.1038/srep07439
14. Salado-Rasmussen K., Tolstrup J., Sedeh F.B., et al. Clinical importance of superior sensitivity of the Aptima TMA-based assays for *Mycoplasma genitalium* detection. *J Clin Microbiol*. 2022;60(4):e0236921.
15. Durukan D., Doyle M., Murray G., et al. Doxycycline and sitafloxacin combination therapy for treating highly resistant *Mycoplasma genitalium*. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8):1870–4.
16. Read T.R.H., Fairley C.K., Murray G.L., et al. Outcomes of resistance-guided sequential treatment of *Mycoplasma genitalium* infections: a prospective evaluation. *Clin Infect Dis*. 2019;68(4):554–60.



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.3.024>



Задора И.С.<sup>1,2</sup>✉, Жаворонок С.В.<sup>1</sup>, Алаторцева Г.И.<sup>3</sup>, Щербань А.И.<sup>2</sup>, Давыдов В.В.<sup>1</sup>,  
Лухверчик Л.Н.<sup>3</sup>, Нестеренко Л.Н.<sup>3</sup>, Анисько Л.А.<sup>1,4</sup>, Рогачева Т.А.<sup>1,4</sup>, Баюр Н.Г.<sup>1,4</sup>,  
Щука Н.В.<sup>2</sup>, Сими́рский В.В.<sup>2</sup>, Зверев В.В.<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова,  
Москва, Россия

<sup>4</sup> Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

<sup>5</sup> Первый Московский государственный медицинский университет  
имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

## Разработка иммуноферментной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG» для определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E в сыворотке крови людей

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Жаворонок С.В., Давыдов В.В., Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Зверев В.В., Сими́рский В.В. – существенный вклад в замысел и дизайн исследования; Анисько Л.А., Рогачева Т.А., Баюр Н.Г., Задора И.С. – подготовка, сбор материала, дизайн исследования, текущее и окончательное редактирование статьи; Задора И.С. – замысел, сбор данных, обобщение результатов, текущее редактирование; Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Щербань А.И., Щука Н.В., Жаворонок С.В., Давыдов В.В. – окончательное одобрение варианта статьи для опубликования.

**Финансирование:** данная научно-исследовательская работа была выполнена в рамках финансируемого мероприятия 13 «Разработать технологию промышленного изготовления тест-систем для выявления антител IgG- и IgM-классов к вирусу гепатита E у человека и животных с использованием иммуноферментного метода анализа и организовать их производство» подпрограммы 5 «Химические продукты и молекулярные технологии» ГП «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 годы, № государственной регистрации 20213143.

**Благодарности:** авторы благодарят главного врача Юровского Н.Н. и коллектив клинико-диагностической лаборатории Городской клинической инфекционной больницы за помощь в организации и проведении исследований (Долбуз О.Н., Метлицкая Е.А., Малиновская Н.В.).

Подана: 13.03.2025

Принята: 16.07.2025

Контакты: zadora-ilona@mail.ru

### Резюме

**Цель.** Разработать иммуноферментную тест-систему для полуколичественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E (ВГЕ) в сыворотке крови людей «ИФА-анти-ВГЕ IgG» с высокой чувствительностью и специфичностью.

**Материалы и методы.** База для данной научной работы – УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. Качественное определение анти-ВГЕ IgG в пробах сывороток крови людей осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа с применением референсных наборов: «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ), «Вектоген E IgG» («Вектор-Бест», Новосибирск). При конструировании тест-системы для качественного выявления анти-ВГЕ IgG использовались разборные 96-луночные полистироловые планшеты («Хема», РФ); рекомбинантные антигены – аналоги белка ORF2 145,1 кДа, участок с 404 по 660 а. о. и ORF3

128,4 кДа ВГЕ 3-го генотипа (НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РФ); конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG человека («Биосервис», «Хема», РФ); постпокрывающий раствор (ХОП ИБОХ НАН Беларуси); раствор для разведения сывороток и раствор для разведения конъюгата (ХОП ИБОХ НАН Беларуси).

**Результаты.** Определены оптимальные концентрации для сорбции белков ORF2 и ORF3, составляющие 2,5 мг/л и 0,25 мг/л, время инкубации с ТМБ – 15 минут. Установлены высокие показатели аналитической надежности разработанной тест-системы. Диагностическая чувствительность реализуемого с использованием тест-системы теста определения антител к вирусу гепатита E составила 100%, а диагностическая специфичность – 87,5% (при пороговом значении 0,2 мг/л). Показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 94,9%, межсерийной – 91,2%.

**Заключение.** Доказано доминирующее значение рекомбинантного полипептида ORF2 по сравнению с полипептидом ORF3 при создании тест-системы для детекции антител класса G, что объясняется расположением основных иммуногенных эпитопов в структурном ORF2, к которым вырабатываются антитела. Впервые в Республике Беларусь зарегистрирована и выпускается тест-система «ИФА-анти-ВГЕ IgG человека» для определения анамнестических антител класса G к вирусу гепатита E в сыворотке крови людей методом иммуноферментного анализа, ТУ BY 100185093.094-2023.

**Ключевые слова:** вирус гепатита E, иммуноферментный анализ, иммуноглобулины класса G, анти-ВГЕ IgG

---



Zadora I.<sup>1,2</sup>✉, Zhavoronok S.<sup>1</sup>, Alatorseva G.<sup>3</sup>, Shcherban A.<sup>2</sup>, Davydov V.<sup>1</sup>, Lukhverchik L.<sup>3</sup>, Nesterenko L.<sup>3</sup>, Anisko L.<sup>1,4</sup>, Rogacheva T.<sup>1,4</sup>, Baur N.<sup>1,4</sup>, Shchuka N.<sup>2</sup>, Simirsky V.<sup>2</sup>, Zverev V.<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>3</sup> I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

<sup>4</sup> City Clinical Infectious Diseases Hospital, Minsk, Belarus

<sup>5</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

## Developing an Immunoenzymatic Test System "ELISA-anti- HEV IgG" to Determine Class G Immunoglobulins against Hepatitis E Virus in Human Blood Serum

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Zhavoronok S., Davydov V., Alatorseva G., Lukhverchik L., Nesterenko L., Zverev V., Simirsky V. – significant contribution in the study concept and design; Anisko L., Rogacheva T., Baur N., Zadora I. – preparation, collection of material, study design, recent and final editing; Zadora I. – design, data collection, results summarizing, editing; Alatorseva G., Lukhverchik L., Nesterenko L., Shcherban A., Shchuka N., Zhavoronok S., Davydov V. – final approval of the version for publication.

**Funding:** this research work was carried out as a part of funded activity No. 13, "To develop a technology for industrial manufacturing of test systems for detecting IgG and IgM antibodies against hepatitis E virus in humans and animals using the enzyme-linked immunosorbent assay method, and to launch their production", in the frame of the subprogram No. 5 "Chemical products and molecular technologies" of the State Program "High-end technologies and machinery" for 2021–2025, State Registration No. 20213143.

**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory of Minsk City Clinical Infectious Diseases Hospital, N. Yurovsky and the staff of the laboratory (O. Dolbuz, E. Metlitskaya, and N. Malinovskaya) for their assistance in research setup and conducting.

Submitted: 13.03.2025

Accepted: 16.07.2025

Contacts: zadora-ilona@mail.ru

### Abstract

**Purpose.** To develop an immunoenzymatic test system for semi-quantitative assay of class G immunoglobulins against hepatitis E virus (HEV) in human blood serum, "ELISA-anti-HEV IgG", with high sensitivity and specificity.

**Materials and methods.** The research work was conducted in the facilities of Minsk City Clinical Infectious Diseases Hospital. The qualitative determination of anti-HEV IgG in human blood serum samples was carried out by indirect enzyme immunoassay using the reference kits ELISA-anti-HEV IgG (NPO Diagnostic Systems, Russian Federation), and Vectohep E-IgG (Vector-Best, Novosibirsk). To design a national test system for anti-HCG IgG qualitative detection, collapsible 96-well polystyrene plates were used (Hema, Russian Federation; recombinant antigens – analogues of the protein ORF2 145.1 kDa, site 404 to 660 a. o. and ORF3 128.4 kDa HCG of the 3rd genotype (Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Russian Federation); human IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Bioservice, Khema, Russian Federation); post-closing solution (Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus); and serum dilution solution and conjugate dilution solution (Pilot Production

of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus).

**Results.** The optimal concentrations for ORF2 and ORF3 proteins sorption were determined as 2.5 mg/l and 0.25 mg/l, respectively, with TMB incubation time of 15 minutes. High analytical reliability indicators of the test system designed were obtained. The diagnostic sensitivity of the test system used to detect antibodies against hepatitis E virus was 100%, and the diagnostic specificity was 87.5% (with threshold value of 0.2 mg/l). The intra-assay reproducibility index was 94.9%, and the inter-assay reproducibility index was 91.2%.

**Conclusion.** The prevailing significance of the recombinant ORF2 protein compared to the ORF3 protein was proved when creating a test system for detecting class G antibodies, which could be explained by the physiology of the virus, since ORF2 is a capsid protein containing the main immunogenic epitopes against which the antibodies are produced. For the first time in the Republic of Belarus, an ELISA-anti-HEV IgG test system is registered and produced to determine class G anamnestic antibodies against hepatitis E virus in human blood serum by enzyme immunoassay, technical specifications No TU BY 100185093.094–2023.

**Keywords:** hepatitis E virus, enzyme immunoassay, immunoglobulins class G

■ ВВЕДЕНИЕ

Впервые вирус гепатита E (ВГЕ) был описан в 1983 г. группой ученых во главе с М.С. Балаяном как частица без оболочки размером от 27 до 30 нм с икосаэдрическим типом симметрии, визуализированная в образцах кала человека с помощью электронной микроскопии. Вирус гепатита E человека является представителем рода *Paslahepevirus*, вид *Paslahepevirus balayani* [2]. Современная классификация ВГЕ представлена в табл. 1.

Геном вируса представлен одноцепочечной положительной РНК и тремя ORF (open reading frames), при этом неструктурные белки кодируются ближе к 5'-концу генома, а структурные – к 3'-концу. Виреоны ВГЕ существуют в инфицированном хозяине в 2 формах: без оболочки, секретируемые с фекалиями, и квазиоболочечные частицы, секретируемые в кровь и устойчивые к нейтрализации антителами [3–5]. Всего выделяют 1 серотип и 8 генотипов вируса [6, 7].

Таблица 1  
Современная классификация ВГЕ  
Table 1  
Modern classification of HEV

|           |              |                         |
|-----------|--------------|-------------------------|
| Realm     | Надцарство   | Riboviria               |
| Kingdom   | Царство      | Orthornavirae           |
| Phylum    | Тип          | Kitrinoviricota         |
| Class     | Класс        | Alsuviricetes           |
| Order     | Порядок      | Hepelivirales           |
| Family    | Семейство    | Hepeviridae             |
| Subfamily | Подсемейство | Orthohepevirinae        |
| Genus     | Род          | Paslahepevirus          |
| Species   | Вид          | Paslahepevirus balayani |



ORF1 является самым крупным в геноме ВГЕ, кодирует неструктурный белок [8, 9]. Внутри ORF1 находится гипервариабельная область, которая демонстрирует высокую степень разнообразия между всеми зарегистрированными последовательностями ВГЕ [9, 10].

Наиболее иммуногенный эпитоп находится в ORF2, кодирующем капсидный белок вириона [11, 12]. Он играет ведущую роль в выживании инфицированных клеток-хозяев, регулирует репликацию и амплификацию вируса [13].

ORF3-последовательность также кодирует полипротеин, имеет несколько реактивных эпитопов, способствующих иммунному ответу организма. Обладает возможностью потенциально продлевать внутриклеточный сигнал [14], способствует выживанию клеток-хозяев и пролиферации ВГЕ. ORF3 участвует в регуляции углеводного обмена и функции митохондрий [15, 16]. Особенно важно участие этого белка в процессах коагуляции и гемостаза [17–20], так как у пациенток с ВГЕ-инфекцией отмечаются клинические симптомы нарушения свертывания крови и геморрагического аборта в конце триместра беременности [21].

При фекально-оральном механизме передачи вирус *Paslahepevirus balayani* попадает в желудочно-кишечный тракт и реплицируется в эпителии кишечника. Затем вирус переходит в кровоток и достигает печени [22], адсорбция происходит за счет связывания с рецепторами гепарансульфатпротеогликанами [23]. После депротеинизации вирусная репликаза RdRp синтезирует комплементарную РНК-матрицу для репликации ВГЕ и транскрипции субгеномной РНК, которая отвечает за трансляцию белков ORF2 и ORF3. Секретируемая форма ORF2 подвергается посттрансляционным модификациям и действует как иммунная ловушка, тогда как ассоциированная с капсидом форма ORF2 самособирается в вирусоподобные частицы и упаковывает геномную РНК в потомство вирионов гепатита Е [24]. Мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной, вирионы высвобождаются из клеток печени либо в кровоток, обернутые липидной мембраной, либо в желчные протоки, где квазиоболочка разрушается солями желчных кислот [25].

В большинстве случаев в странах Европы возбудитель гепатита Е – 3-й генотип вируса: установлена циркуляция 3с, 3i, 3f, 3g и 3ra субгенотипов возбудителя заболевания. Главным отличием эпидемического процесса, обусловленного данным возбудителем, является его зоонозный характер. Основным резервуар возбудителя и источник заражения человека в данном случае – домашние и дикие свиньи, а главный путь заражения – пищевой. Для Республики Беларусь присущ спорадический характер заболеваемости гепатитом Е, обусловленный употреблением в пищу продуктов питания, содержащих печень, мясо домашних или диких свиней, не прошедших достаточную термическую обработку. В общей популяции жителей Беларуси установлена серопревалентность по анти-ВГЕ IgG-антителам 7,3% (95% ДИ 5,8–9,0), установлен факт нарастания иммунологической прослойки среди жителей Республики Беларусь с возрастом: в группе старше 64 лет серопозитивность достигает 11,4%, что достоверно выше показателя в группах менее 25 лет и 25–34 года ( $p < 0,05$ ) [26, 27].

Разработка и внедрение надежной системы лабораторной диагностики инфекции, вызванной возбудителем гепатита Е, является важной задачей, поскольку расширяет современные представления о распространенности ВГЕ-инфекции, позволяет обнаружить группы риска и потенциальные источники инфицирования.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать иммуноферментную тест-систему для полуколичественного определения иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в сыворотке крови людей «ИФА-анти-ВГЕ IgG» с высокой чувствительностью и специфичностью.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

База выполнения данной научной работы – УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. Качественное определение анти-ВГЕ IgG в пробах сывороток крови людей осуществляли методом иммуноферментного анализа с применением референсных наборов: коммерческого диагностического набора «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ), «Вектоген E IgG» («Вектор-Бест», Новосибирск, РФ) – согласно инструкции по применению к наборам реагентов.

Материалами для конструирования тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG, Беларусь, УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» для полуколичественного выявления анти-ВГЕ IgG служили плоскодонные разборные 96-луночные полистироловые планшеты Microplate breakable, кат. № N001, Lot.: D8-58-05 производства фирмы «Хема» (РФ) с высокой сорбционной активностью; рекомбинантные антигены – аналоги белка ORF2 145,1 кДа, участок с 404 по 660 а. о. [29] и ORF3 128,4 кДа – полноразмерный белковый продукт ORF3, С-концевой фрагмент [30] ВГЕ 3-го генотипа (НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РФ); конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG человека («Биосервис», «Хема», РФ); фосфатно-солевой буферный раствор (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»); соли для карбонатно-бикарбонатного буферного раствора ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ); постпокрывающий раствор, включающий инертный белок, дисахарид, ингибитор протеиназ и бактериостатик (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»); раствор для разведения сывороток и раствор для разведения конъюгата (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»); субстратный раствор с тетраметилбензидином (ТМБ); 5% раствор серной кислоты ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); термостат; универсальный фотометр «Витязь» Ф300, спектрофотометр Microplate Photometer MPP-96 BioSan.

Иммуноферментный анализ проводился по непрямому твердофазному варианту, при котором сорбированная смесь рекомбинантных антигенов к ВГЕ взаимодействует с антителами класса G в сыворотке крови людей, формируя комплекс антиген – антитело. Исследуемые сыворотки разводились в отношении 1:10. Субстратная смесь, содержащая 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), готовилась непосредственно перед использованием в необходимом объеме. Для остановки реакции применялся раствор серной кислоты. Учет результатов осуществлялся спектрофотометрически при длине волны 450 нм и референс-светофильтре 620 нм на универсальном спектрофотометре «Витязь» Ф300 в течение 5 минут после внесения стоп-реагента.

Обработка полученных данных проводилась на персональной ЭВМ с использованием статистических пакетов Excel for Windows 10.0 и пакета статистического анализа данных Statistica for Windows 10.0 (StatSoft Inc., США). Количественные переменные представляли в виде медианы (Me), средних значений, верхнего и нижнего квартилей (p25% – p75%). Количественные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения (критерий Колмогорова – Смирнова). При нормальном распределении признака использовали методы параметрической статистики. Если гипотезу о нормальности распределения признака в совокупности отвергали при малом объеме выборки ( $n < 30$ ), для обработки данных применяли методы



непараметрической статистики – U-критерий Манна – Уитни для 2 независимых групп, а при большем количестве анализируемых групп – критерий Краскела – Уоллиса. Данные в этом случае представлялись через медианный показатель с расчетом верхнего и нижнего квартилей (25%–75%). Результаты исследования считали достоверными, если различия между показателями, значимыми при вероятности безошибочного прогноза, составляли не менее 95% ( $p < 0,05$ ). Для определения эффективности лабораторной диагностики ВГЕ методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-анти-ВГЕ IgG» в сравнении с таковой, реализуемой коммерческим зарубежным «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ), был проведен ROC-анализ.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основными этапами конструирования национальной иммуноферментной тест-системы для полуколичественного определения анти-ВГЕ IgG у людей являлись: подбор оптимальных концентраций сорбции рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 и получение сенсibilизированного планшета; подбор рабочего разведения конъюгата; подбор оптимального времени инкубации с ТМБ; определение основных валидационных характеристик прототипа разработанной тест-системы; проведение лабораторных испытаний на положительных и отрицательных контрольных выборках сывороток.

Для создания иммуносорбента использовали рекомбинантные полипептиды ORF2 (145,1 кДа, участок с 404 по 660 а. о.) и ORF3 (128,4 кДа) вируса гепатита Е 3-го генотипа, разработанные и предоставленные НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (РФ). Рекомбинантный белок ORF2 имел следующую последовательность аминокислот: NGEPTVKLYTSVGNAQQDKGIAIPHDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQTTYGSSTNPMYVSDTVTFVNVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLTTIQYQSKTFYVPLRGLKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILINAAGHRVAISTYTTVGS LGAGPVSVSAVLAPHSA LAVELTIDYPARAHTFDDFCPECRN LGLQGCAFQSTVAELQRLKMKVGKTRES, а рекомбинантный белок ORF3 – MGSPCALGLFCCCCSCFCLCCPRHRPASRLAAVVGGA AAVPAVVSGVTGLILSPSPSPIFIQPTPLPPTSFHNPGLELALDSRPAPSAPLGLTSPSAPPLPPVV [28, 29].

Схема приготовления иммуносорбента для «ИФА-анти-ВГЕ IgG» включает следующие этапы: адсорбция рекомбинантных белков ORF2 и ORF3 в подобранных концентрациях в карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ) в объеме 110 мкл/лунка на полистирольных планшетах производства фирмы «Хема» (РФ), инкубация в течение 16–18 ч при температуре +2 ... +8 °C, промывки и стабилизация обработкой постпокрывающим раствором в объеме 160 мкл/лунка в течение 16–18 ч при температуре +2 ... +8 °C.

Планшеты сенсibilизировали в разные дни, непрямой вариант ИФА проводили несколько раз. Рекомбинантные полипептиды ORF2 и ORF3 наносились по отдельности и вместе, образцы сывороток крови людей в процессе постановки анализа разводили 1:10, из них положительные контрольные образцы содержали необходимые анти-ВГЕ IgG-антитела в высоком, среднем и низком титре. Обращали на себя внимание более низкие показатели оптической плотности образцов при использовании только антигена ORF3 3-го генотипа. Группы рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 также были проанализированы между собой в зависимости от наносимых концентраций при исследовании на одинаковых пробах сыворотки крови людей (рис. 1).

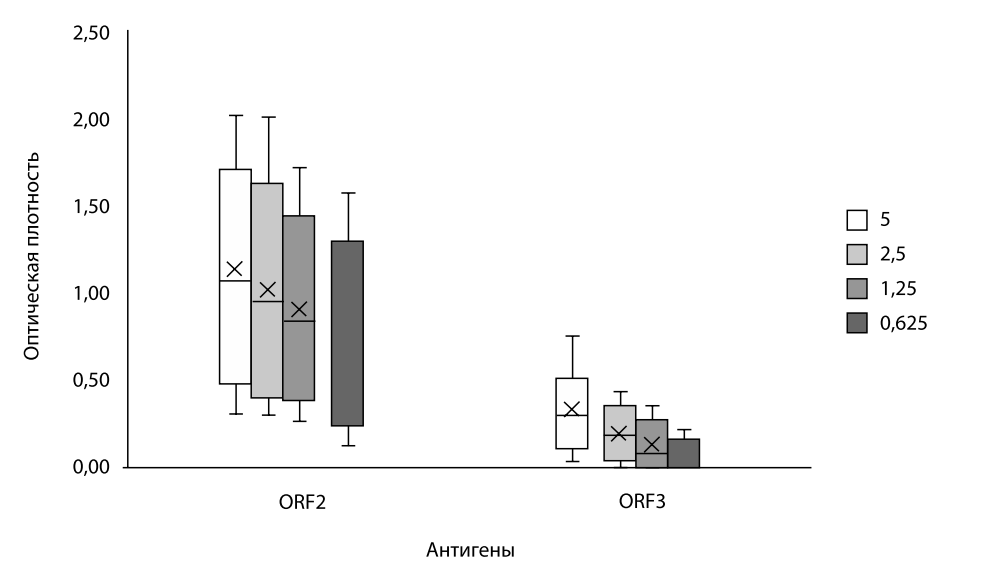


Рис. 1. Значения показателей оптической плотности контрольных положительных образцов при сепарированном использовании ORF2 и ORF3

Fig. 1. Optical densities of control positive samples using separated ORF2 and ORF3

Для подтверждения различного диагностического вклада при использовании рекомбинантных белков ORF2 и ORF3 был произведен статистический анализ по U-критерию Манна – Уитни. Определены достоверные различия показателей оптических плотностей положительных сывороток при всех сорбируемых концентрациях рекомбинантных полипептидов: 5 мг/л ( $U=28,0$ ,  $p=0,000177$ ), 2,5 мг/л ( $U=9,0$ ,  $p=0,000008$ ), 1,25 мг/л ( $U=6,0$ ,  $p=0,000005$ ), 0,625 мг/л ( $U=12,0$ ,  $p=0,000015$ ).

Для установления точного значения концентрации наносимых антигенов на планшеты (для создания иммуносорбента) белки наносились также вместе для оценки возможного потенцирующего эффекта (табл. 2).

Таблица 2  
Медианные значения оптических плотностей сывороток крови людей в зависимости от концентрации сорбируемых антигенов ORF2 и ORF3 при совместном нанесении  
Table 2  
Median OD values of human blood serum depending on the concentration of together sorbed antigens ORF2 and ORF3

| Образцы сывороток крови людей | Исследуемые совместные концентрации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3, мг/л |         |           |             |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|-----------|-------------|
|                               | 5+5                                                                               | 2,5+2,5 | 1,25+1,25 | 0,625+0,625 |
| 1 КО+                         | 1,905                                                                             | 1,828   | 1,490     | 1,121       |
| 2 КО+                         | 0,928                                                                             | 0,889   | 0,864     | 0,588       |
| 3 КО+                         | 0,320                                                                             | 0,301   | 0,333     | 0,278       |
| 4 КО+                         | 1,063                                                                             | 1,152   | 1,095     | 0,845       |
| 5 КО–                         | 0,015                                                                             | 0,018   | 0,012     | 0,017       |
| 6 КО–                         | 0,018                                                                             | 0,017   | 0,012     | 0,009       |

Установлены достоверные различия значений оптических плотностей положительных и отрицательных образцов ( $p < 0,001$ ) при совместном использовании рекомбинантных полипептидов. Однако при сравнении данных с показателями оптических плотностей сывороток при использовании только антигена ORF2 статистически значимых различий выявлено не было ( $U=1993,0$ ,  $p=0,795077$ ), что подтверждает гипотезу о доминирующем влиянии структурного белка ORF2. Далее изучались комбинации иммуносорбента, в которых антиген ORF2 наносился в существенно большей концентрации (табл. 3).

Значения оптической плотности положительных и отрицательных образцов достоверно различались при всех исследуемых концентрациях ( $p < 0,001$ ) при совместном использовании рекомбинантных полипептидов. Для оценки статистически значимых различий между исследуемыми концентрациями смеси антигенов ORF2 и ORF3 (2,5 и 1; 2,5 и 0,5; 2,5 и 0,25 мг/л), а также 1,5 мг/л белка ORF2 использовался критерий Краскела – Уоллиса ( $H=13,41490$ ,  $p=0,0038$ ). Установлены статистически значимые различия в парах концентраций 2,5+1 и 1,5 мг/л ( $z=3,2470956$ ,  $p=0,006995$ ), 2,5+0,5 и 1,5 мг/л ( $z=2,867318$ ,  $p=0,024838$ ), а также в паре 2,5+0,25 и 1,5 мг/л ( $z=2,772374$ ,  $p=0,033389$ ). Таким образом, впервые установлено, что минимальное разведение 2,5 мг/л ORF2 и 0,25 мг/л ORF3 является оптимальным для создания иммуносорбента для определения антител класса G к вирусу гепатита E.

Для определения ориентировочного диапазона разведения иммунопероксидазного конъюгата MKAT-IgG человека – ПХ («Хема», РФ) использовался раствор для разведения конъюгата, приготовленный на основании аналитического буферного раствора и стабилизирующего раствора с применением NaCl, Tween-20 и БСА. MKAT-IgG человека – ПХ разводили в значениях от 1:5 000 до 1:640 000 и ставили в нескольких повторах с использованием положительных и отрицательной сывороток (рис. 2). Критерием выбора диапазона конъюгата является способность связывать максимальное количество иммуноглобулинов класса G при минимальном неспецифическом связывании.

В результате анализа оптических плотностей сывороток крови людей установлен оптимальный диапазон разведения 1:40 000 – 1:80 000. Поскольку приоритетом для создания тест-систем является максимальный показатель оптической плотности

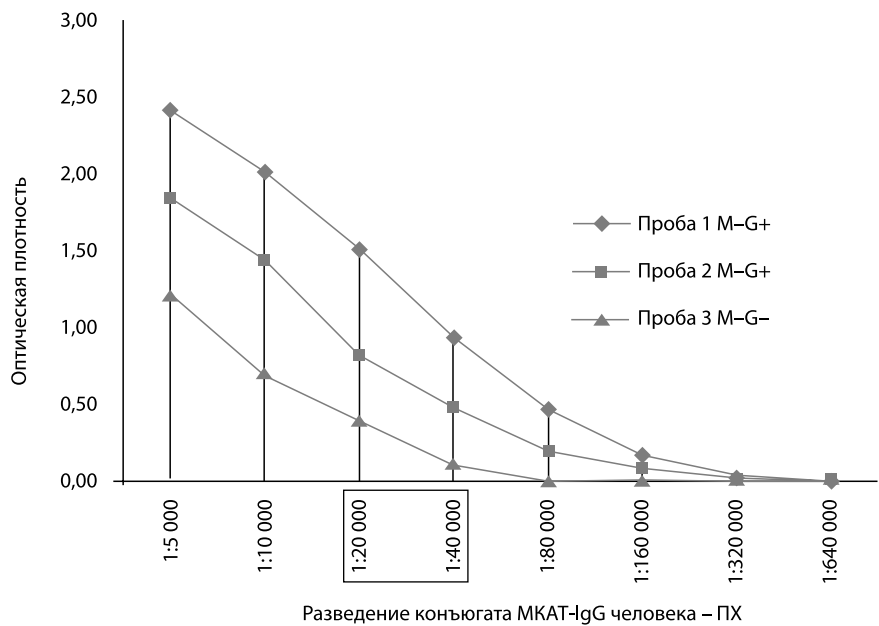
**Таблица 3**

**Медианные значения оптических плотностей сывороток крови людей в зависимости от концентрации сорбируемых антигенов ORF2 и ORF3 при совместном нанесении**

**Table 3**

**Median OD values of human blood serum depending on the concentration of together sorbed antigens ORF2 and ORF3**

| Образцы сывороток крови людей | Исследуемые совместные концентрации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3, мг/л |         |          |          |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|----------|----------|
|                               | 2,5+1                                                                             | 2,5+0,5 | 2,5+0,25 | 1,5 ORF2 |
| 1 КО+                         | 1,798                                                                             | 1,802   | 1,784    | 1,128    |
| 2 КО+                         | 0,881                                                                             | 0,856   | 0,833    | 0,341    |
| 3 КО+                         | 0,499                                                                             | 0,450   | 0,445    | 0,162    |
| 4 КО+                         | 1,262                                                                             | 1,217   | 1,228    | 0,711    |
| 5 КО–                         | 0,004                                                                             | 0,007   | 0,001    | 0,004    |
| 6 КО–                         | 0,007                                                                             | 0,010   | 0,002    | 0,005    |



**Рис. 2. Результаты титрования конъюгата к IgG человека на положительных и отрицательном образцах сывороток крови людей**  
**Fig. 2. Results of anti-human IgG conjugate titration on positive and negative human blood serum samples**

положительных образцов при минимальном значении оптической плотности отрицательных проб конечный титр был установлен 1:60 000.

Для определения оптимального времени инкубации с ТМБ использовались позитивная и негативная по анти-ВГЕ IgG сыворотки крови людей при разном времени инкубации с раствором (табл. 4). Другие параметры тест-системы не изменялись.

Время инкубации исследуемых образцов с тетраметилбензидином составляло 5, 10, 15, 20 и 25 минут соответственно. При анализе результатов исследования выявлено, что коэффициент позитивности достигал максимального значения при инкубации в течение 15 минут. Таким образом, установлено рекомендуемое время инкубации с ТМБ – 15 минут.

**Таблица 4**  
**Значения коэффициента позитивности в зависимости от времени инкубации с ТМБ**  
**Table 4**  
**CP values depending on the time of incubation with TMB**

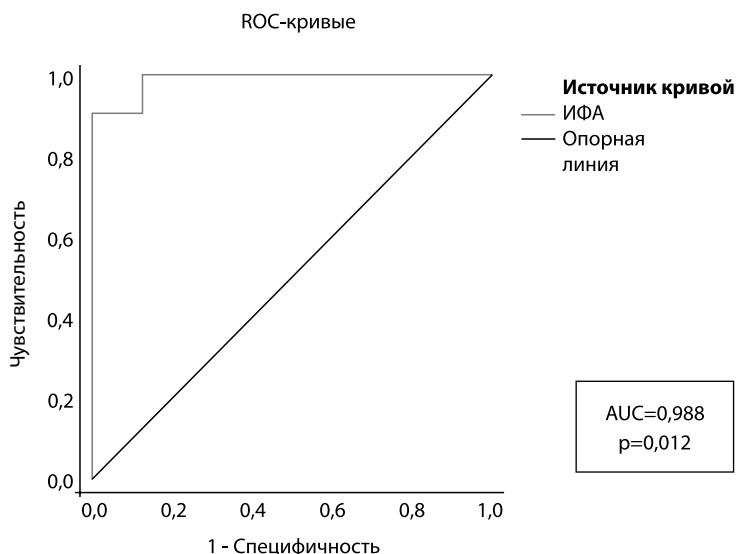
| Время инкуба-ции (мин.) | Медианное значение оптической плотности КО+ (25%-75%) | Медианное значение оптической плотности КО- (25%-75%) | Коэффициент позитивности |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|
| 5                       | 0,129 (0,120–0,136)                                   | 0,005 (0,003–0,007)                                   | 28,556                   |
| 10                      | 0,397 (0,380–0,411)                                   | 0,007 (0,005–0,009)                                   | 61,000                   |
| 15                      | 0,692 (0,680–0,707)                                   | 0,006 (0,004–0,008)                                   | 125,727                  |
| 20                      | 0,919 (0,904–0,937)                                   | 0,044 (0,040–0,047)                                   | 21,126                   |
| 25                      | 1,080 (1,044–1,109)                                   | 0,052 (0,050–0,055)                                   | 20,769                   |



Воспроизводимость метода определяли посредством тестирования 5 образцов сывороток крови людей в 8 параллельных повторях для каждого образца в пределах одного планшета (внутрисерийная воспроизводимость) с повторением анализа в 4 независимых экспериментах (межсерийная воспроизводимость). Среднее значение показателя коэффициента вариации составило 5,1%, а сам показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 94,9%. Для оценки межсерийной воспроизводимости учитывались показатели оптической плотности всех образцов. Показатель коэффициента вариации при оценке всех 4 планшетов составил 8,8%, а межсерийная воспроизводимость была на уровне 91,2%.

Для определения эффективности лабораторной диагностики ВГЕ методом прямого иммуноферментного анализа с использованием разработанного набора реагентов «ИФА-анти-ВГЕ IgG» в сравнении с коммерческим российским «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ) был проведен ROC-анализ (рис. 3). Референсная тест-система, относительно которой определялась чувствительность и специфичность разработанной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG», применялась для детекции иммуноглобулинов класса G на 37 позитивных и негативных сыворотках крови людей, входящих в контрольную панель. Ложноположительных и ложноотрицательных результатов не зафиксировано, соответственно, чувствительность и специфичность для российской тест-системы (системы сравнения) составляют 100%.

В соответствии с ROC-анализом данной модели площадь под кривой (AUC) составила 0,988 (95% ДИ 0,964–1,012,  $p=0,012$ ), что соответствует отличному качеству прогностической модели. Поскольку большинство современных иммуноферментных тест-систем предлагают устанавливать точку cut-off на уровне 0,2, для этого порога были рассчитаны аналитические показатели качества: точность теста – 94,6%, диагностическая специфичность – 87,5%, диагностическая чувствительность – 100%.



**Рис. 3. ROC-кривая для оценки разработанной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG»**  
**Fig. 3. ROC curve for evaluation of the created test system "ELISA-anti-HEV IgG"**

что обеспечивает оптимальное соотношение аналитических характеристик надежности разработанной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG» при более высоком показателе точности исследования.

Для регистрации разработанной тест-системы были созданы технические условия ТУ ВУ 100185093.094-2023, Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена Инструкция по применению набора реагентов для определения антител класса IgG к вирусу гепатита E в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-анти-ВГЕ IgG человека».

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказано доминирующее влияние рекомбинантного полипептида ORF2 по сравнению с таковым полипептида ORF3 в ходе создания тест-системы для детекции антител класса G, объясняемое тем, что ORF2 – это капсидный белок, в котором располагаются основные иммуногенные эпитопы. Определены показатели оптимальной концентрации для сорбции белков ORF2 и ORF3, составляющие 2,5 мг/л и 0,25 мг/л, рекомендуемое время инкубации с ТМБ – 15 минут. Установлены высокие показатели аналитической надежности разработанной тест-системы. Диагностическая чувствительность реализуемого с использованием тест-системы теста определения антител к вирусу гепатита E составила 100%, диагностическая специфичность – 87,5% (при точке отсечки 0,2 мг/л). Показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 94,9%, межсерийной воспроизводимости – 91,2%. Впервые в Республике Беларусь зарегистрированы технические условия ТУ ВУ 100185093.094-2023, утверждена Инструкция по применению набора реагентов для определения антител класса IgG к вирусу гепатита E в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-анти-ВГЕ IgG человека».

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23–31. DOI: 10.1159/000149370
2. ICTV Report Chapters. Family: Hepeviridae. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/hepeviridae/hepeviridae> (accessed 06 July 2023).
3. Takahashi M., Yamada K., Hoshino Y., et al. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol*. 2008;153(9):1703–1713. DOI: 10.1007/s00705-008-0179-6
4. Nagashima S., et al. Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. *Journal of virology*. 2017;91(22):10. DOI: 10.1128/JVI.00822-17
5. Chapuy-Regaud S., Dubois M., Plisson-Chastang C., et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie*. 2017;141:70–797. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.05.003
6. Sun P., Lin S., He S., et al. Avian Hepatitis E Virus: With the Trend of Genotypes and Host Expansion. *Front Microbiol*. 2019 Jul 24;10:1696. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01696
7. Smith D.B., Izopet J., Nicot F., et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J Gen Virol*. 2020 Jul;101(7):692–698. DOI: 10.1099/jgv.0.001435
8. Koonin E.V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*. 1991;72(Pt 9):2197–2206. DOI: 10.1099/0022-1317-72-9-2197
9. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(17):8259–8263. DOI: 10.1073/pnas.89.17.8259
10. Kenney S.P., Xiang-Jin M. The lysine residues within the human ribosomal protein S17 sequence naturally inserted into the viral nonstructural protein of a unique strain of hepatitis E virus are important for enhanced virus replication. *J Virol*. 2015;89:3793. DOI: 10.1128/JVI.03582-14
11. Ankavay M., Montpellier C., Sayed I.M., et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep*. 2019;9(1):6243. DOI: 10.1038/s41598-019-42737-2
12. Montpellier C., Wychowski C., Sayed I.M., et al. Hepatitis E virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. *Gastroenterology*. 2018;154(1):211–223. e218. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.09.020
13. Surjit M., Varshney B., Lal S.K. The ORF2 glycoprotein of hepatitis E virus inhibits cellular NF-kappaB activity by blocking ubiquitination mediated proteasomal degradation of IkappaBalpha in human hepatoma cells. *BMC Biochem*. 2012;13:7. DOI: 10.1186/1471-2091-13-7



14. Chandra V., Kar-Roy A., Kumari S., et al. The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J Virol.* 2008;82(14):7100–7110. DOI: 10.1128/JVI.00403-08
15. Moin S.M., Panteva M., Jameel S. The hepatitis E virus ORF3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death. *J Biol Chem.* 2007;282(29):21124–21133. DOI: 10.1074/jbc.M701696200
16. Moin S.M., Chandra V., Arya R., et al. The hepatitis E virus ORF3 protein stabilizes HIF-1 $\alpha$  and enhances HIF-1-mediated transcriptional activity through p300/CBP. *Cell Microbiol.* 2009;11(9):1409–1421. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01340.x
17. Tyagi S., Surjit M., Lal S.K. The 41-amino-acid C-terminal region of the hepatitis E virus ORF3 protein interacts with bikunin, a kunitz-type serine protease inhibitor. *J Virol.* 2005;79(18):12081–12087. DOI: 10.1128/JVI.79.18.12081-12087.2005
18. Tyagi S., Surjit M., Roy A.K., et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific  $\alpha$ 1-microglobulin and its precursor  $\alpha$ 1-microglobulin/bikunin precursor (AMB) and expedites their export from the hepatocyte. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29308–29319. DOI: 10.1074/jbc.M402017200
19. Ratna R., Kar-Roy A., Lal S.K. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with hemopexin by means of its 26 amino acid N-terminal hydrophobic domain II. *Biochemistry.* 2008;47(7):1957–1969. DOI: 10.1021/bi7016552
20. Ratna R., Kar-Roy A., Lal S.K. ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with the B $\beta$  chain of fibrinogen resulting in decreased fibrinogen secretion from HuH-7 cells. *J Gen Virol.* 2009;90(pt 6):1359–1370. DOI: 10.1099/vir.0.009274-0
21. Geng Y., Yang J., Huang W., et al. Virus Host Protein Interaction Network Analysis Reveals That the HEV ORF3 Protein May Interrupt the Blood Coagulation Process. *PLoS.* 2013;ONE 8(2):e56320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056320>
22. Williams T.P., Kasornrondkubua C., Halbur P.G., et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3040–3046. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3040-3046.2001
23. Kalia M., Chandra V., Rahman S.A., et al. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol.* 2009;83:12714–12724. DOI: 10.1128/JVI.00717-09
24. Yin X., Ying D., Lhomme S., et al. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:4773–4778. DOI: 10.1073/pnas.1721345115
25. Nagashima S., et al. Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. *Journal of virology.* 2017;91(22). DOI: 10.1128/JVI.00822-17
26. Zhavoronok S., Davydau V., Arabey A., et al. Transmission mechanisms and ways of infecting human hepatitis E in the endemic region. *Clinical infectology and parasitology.* 2019;8(3):322–336. (in Russian)
27. Davydau V.V., Zhavoronok S.V., Babenko A.S., et al. Epidemiological characteristics of hepatitis E in the Republic of Belarus. *Hepatology and Gastroenterology.* 2022;6(1):11–19. (in Russian) DOI: 10.25298/2616-5546-2022-6-1-11-19
28. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2019;96(1):10–17. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17> (in Russian)
29. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Obtaining the recombinant ORF3 protein of hepatitis E genotype 3 and evaluation of its antigenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2018;95(5):46–53. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53> (in Russian)



Thuraya J. Mezaal✉, Amir A. Goban, Tabarek R.S. Al-Mosawi, Anaam Z.S. Mohammed, Eman N.A. Mutar, Dlal R.J. Salmin, Halah M. Abd  
Basrah University College of Sciences and Technology, Basrah, Iraq

## Bacterial Contamination of the Circulating Iraqi Paper Currency Note in Basrah

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Thuraya J. Mezaal – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, visualization, writing – original draft and editing; Amir A. Goban – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, software, visualization, writing – original draft and editing; Tabarek R.S. Al-Mosawi – conceptualization, methodology, project administration, resources, validation, visualization, writing – original draft and editing; Anaam Z.S. Mohammed – conceptualization, data curation, resources, software, validation, visualization, writing – original draft and editing; Eman N.A. Mutar – conceptualization, data curation, methodology, project administration, resources, visualization, writing – original draft and editing; Dlal R.J. Salmin – conceptualization, investigation, methodology, project administration, resources, software, writing – original draft and editing; Halah M. Abd – conceptualization, data curation, project administration, resources, visualization, writing – original draft and editing.

The article is published in author's edition.

Submitted: 12.08.2024

Accepted: 07.04.2025

Contacts: dr.thuraya84@gmail.com

### Abstract

**Introduction.** Paper currency, is widely used for transactions globally, can become contaminated with bacteria due to various factors. As a result, contaminated currency notes serve as a vehicle for transferring bacteria. Because money is frequently handled by numerous individuals in diverse personal and environmental settings, it becomes a potential environmental vehicle for transmitting pathogenic microorganisms.

**Purpose.** To isolate bacterial contamination present in Iraqi currency and assess their antibiotic resistance within Basrah city.

**Materials and methods.** Case control study, one hundred and nine samples of paper currency were collected from four local sources from the population of the community and Ninety-five bank papers were obtained prior to being used by individuals as a control. All examined using bacterial cultivation. The developing colonies on the enriched and selective culture media were identified using the gram stain and the biochemical tests. The bacterial susceptibility for nine standard antibiotics were tested according to clinical and laboratory institute guidelines.

**Results.** The currency notes examined in this research included various denominations: 250, 500, and 1000 Iraqi dinars. The contamination rate among the study group was 100%, whereas the control group remained completely sterile. Gram-negative bacteria constituted the majority, comprising 86% of the total, with Gram-positive bacteria making up only 14%. Among Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* (*E. coli*) was the most prevalent, accounting for 56.9% of the identified microorganisms. Regarding Gram-positive bacteria, coagulase-positive *Staphylococci* (CoPS), coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS), and *Bacillus subtilis* were detected at varying frequencies.

**Conclusion.** Currency notes in circulation serve as a medium for the exchange of various microbes as they pass from hand to hand. This contamination could play a significant role

in the transmission of different diseases. Moreover, the majority of bacterial species found on currency notes are resistant to commonly used antibiotics, thereby posing risks to both the community and individuals who handle these notes.

**Keywords:** gram-negative bacteria, gram-positive bacteria, Iraqi dinars, Escherichia coli, Staphylococci

Турайя Дж. Меааль✉, Амир А. Гобан, Табарек Р.С. Аль-Мосави,  
Анаам З.Ш. Мохаммед, Эман Н.А. Мутар, Длал Р.Дж. Салмин, Халах М. Абд  
Научно-технологический колледж Университета Басры, Басра, Ирак

## Бактериальное загрязнение иракских бумажных денежных банкнот, находящихся в обращении в Басре

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Турайя Дж. Меааль – концепция, научное руководство, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Амир А. Гобан – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Табарек Р.С. Аль-Мосави – концепция, методология, ведение проекта, ресурсы, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Анаам З.Ш. Мохаммед – концепция, обработка данных, ресурсы, программное обеспечение, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Эман Н.А. Мутар – концепция, обработка данных, методология, ведение проекта, ресурсы, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Длал Р.Дж. Салмин – концепция, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, написание чернового варианта статьи, редактирование; Халах М. Абд – концепция, ведение проекта, ресурсы, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 12.08.2024

Принята: 07.04.2025

Контакты: dr.thuraya84@gmail.com

### Резюме

**Введение.** Бумажные деньги, используемые для расчетов во всем мире, под воздействием различных факторов могут подвергаться бактериальному загрязнению. Как следствие, загрязненные банкноты становятся источником бактериальной инфекции. Поскольку деньгами постоянно пользуется множество людей в различных индивидуальных и общественных условиях, они превращаются в потенциальное средство передачи патогенных микроорганизмов.

**Цель.** Выявить бактериальные микроорганизмы, присутствующие в иракских бумажных денежных купюрах, находящихся в обращении в городе Басра, и определить их устойчивость к антибиотикам.

**Материалы и методы.** В рамках исследования методом «случай – контроль» было отобрано сто девять образцов бумажной денежной наличности из четырех местных источников от населения общины и девяносто пять новых банкнот, полученных из банка, не бывших в обращении, – в качестве контрольных. Все банкноты были исследованы культуральным методом анализа. Растущие колонии на обогащенных и селективных культуральных средах были идентифицированы с помощью окрашивания по Граму и с применением биохимических тестов. Бактериальную чувствительность

к девяти стандартным антибиотикам проверяли в соответствии с рекомендациями Института клинических лабораторных стандартов.

**Результаты.** В исследовании анализировали банкноты различных номиналов: 250, 500 и 1000 иракских динаров. Уровень контаминации в исследуемой группе составил 100%, в то время как контрольная группа оставалась стерильной. Грамотрицательные бактерии составили большинство – 86% от общего числа, тогда как грамположительные бактерии – только 14%. Среди грамотрицательных бактерий наиболее распространенной была кишечная палочка (*E. coli*), на долю которой пришлось 56,9% выявленных штаммов микроорганизмов. Что касается грамположительных бактерий, то с различной частотой были выявлены коагулазоположительные стафилококки (CoPS), коагулазоотрицательные стафилококки (CoNS) и *Bacillus subtilis*.

**Заключение.** Наличные деньги, находящиеся в обращении, являются своего рода средой для обмена различными микроорганизмами при переходе из рук в руки. Такое загрязнение может играть существенную роль в передаче различных заболеваний. Кроме того, большинство видов бактерий, обнаруженных на исследованных банкнотах, устойчиво к наиболее распространенным антибиотикам, что создает опасность как для общества в целом, так и для отдельных лиц, пользующихся этими банкнотами.

**Ключевые слова:** грамотрицательные бактерии, грамположительные бактерии, иракские динары, *Escherichia coli*, *Staphylococci*

---

## ■ INTRODUCTION

Globally, money sees frequent circulation, often changing hands. During this process, it can become contaminated, potentially serving as a vector for transmitting microorganisms to others [1]. Contamination can originate from respiratory [2] and gastrointestinal sources during the handling and counting of money [3]. Furthermore, the overall hygiene standards within a community or society can influence the microbial presence on coins and notes, thereby increasing the risk of microbial transmission during monetary transactions [4]. Various factors contribute to microbial presence on currency, including unsanitary practices such as handling money with unwashed hands after using the restroom, counting money with saliva-coated hands, coughing, sneezing, and placing paper currency on unclean surfaces. Consequently, these currencies can facilitate the spread of infections to subsequent users [5]. Additionally, the materials used in manufacturing paper currency, particularly those composed of a mixture of cotton and linen, can harbor a significant microbial load, providing ample surface area for microorganisms to colonize on both sides [6].

Contamination by pathogenic microorganisms on objects is a significant public health concern, as contaminated currency notes can serve as vehicles for transmitting pathogens [1]. Despite this, studies on microbial contamination of money are lacking in many developing countries, leading to a shortage of information that may contribute to the absence of public health policies regarding currency handling and circulation [7]. Understanding the microbial diversity present on circulating currency notes can help raise awareness about health risks associated with currency handling and facilitate effective measures for controlling the transmission of infections.



Inanimate surfaces have frequently been implicated as sources of infection outbreaks. Common pathogens can live on surfaces for extended periods, potentially serving as persistent sources of transmission in the absence of regular preventive surface disinfection [8]. Modern scientific methodologies have substantiated hypotheses demonstrating that viable pathogenic organisms – including viruses, bacteria, and fungi – can be recovered from the surfaces of both paper and coin currencies. The possibility that currency notes could serve as carriers for potential disease-causing microorganisms was first proposed in the 1970s [9]). Particularly, paper currency handled by numerous individuals increases the likelihood of serving as a medium for the transmission of pathogenic microorganisms [10].

Several factors contribute to paper currency's role as an optimal environment for microbial growth. Firstly, the surface area of paper bills provides enough space for organisms and organic matter to accumulate [11]. Additionally, features such as folds and engineered depressions or projections, designed for anti-counterfeiting purposes, serve as ideal settling sites for both microorganisms and debris, prolonging their survival [11]. Lastly, banknotes circulate among the population for extended periods before being retired from circulation. Studies have revealed a direct relationship between the age of the denomination of currency notes and the level of contamination observed, with older notes exhibiting higher levels of contamination compared to newer ones [12]

Certain studies indicate that the denomination and age of currency notes directly influence their level of contamination. Lower denomination notes tend to be the most contaminated, likely due to their increased circulation through numerous hands compared to higher denomination notes [13]. It is presumed that prolonged contact time escalates the level of contamination [14].

High rates of microbial contamination on circulating currency notes have been reported worldwide, with numerous studies conducted across different regions during the 2010s. Some notable examples include investigations conducted on the Indian rupee [15], Bangladesh Teka [16] Iraqi currency [17], and Ghanaian currency [18]. These studies revealed that currency notes were contaminated with pathogenic or potentially pathogenic bacteria. at rates ranging from 88% to 100%.

Similar findings were reported for various other currencies for instance Palestine banknotes (96.25%) [19], Mexico polymer notes (96%) [14] Colombian bills (91.1%) [20], and Indian currency notes (98%) [21]. The presence of bacterial agents found on currency notes in various studies highlights the potential for currency to act as a vector in transmitting pathogenic microorganisms within communities. Numerous studies conducted globally have documented contamination of currency notes and coins with both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Cultures obtained from collected currency and coins have revealed a variety of bacterial species. For example, research conducted in India, Bangladesh, Iraq, Colombia, Saudi Arabia, Nigeria, and Tanzania has identified bacterial species including *Escherichia coli*, *Proteus* species, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* species, *Bacillus* species, and *Klebsiella* species [22].

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

To isolate bacterial contamination present in Iraqi currency and assess their antibiotic resistance within Basrah city.

## ■ MATERIALS AND METHODS

### **Design and Setting**

A case-control study was carried out in Basrah city from November 1st, 2023, to March 1st, 2024. Currency notes were collected from a range of sources, including supermarkets, cafeterias, meat sellers, and fruit and vegetable vendors. Samples were randomly and aseptically obtained.

Inclusion criteria comprised currency notes denominated in Iraqi dinars of 250, 500, and 1000 denominations, while notes that were severely damaged or torn were excluded from the study.

### **Laboratory Methods**

A preliminary investigation was carried out using the following procedures:

1. The isolation of microorganisms was done by swabbing all chosen currency notes on both sides with a sterile cotton-tipped swab, using one of three solutions: sterile normal saline (0.9% w/v sodium chloride solution), distilled water, or transport medium. Subsequently, the swab was streaked onto blood agar and MacConkey agar.
2. Currency notes were directly placed into a vial containing nutrient broth and allowed to incubate at 37 °C for 12 to 24 hours. After incubation, the money was removed using sterile forceps. Using a standard 10 µL loop, the broth was streaked onto blood and MacConkey agar, followed by incubation at 37 °C. The plates of the two methods were monitored for the growth of bacterial colonies.

Only the subculture of nutrient broth showed bacterial growth, leading to the adoption of this method for the research. The isolated bacteria underwent further tests for colony morphology, Gram reaction, coagulase tests, hemolysis, and citrate utilization to differentiate between *E. coli* and *Klebsiella* spp.

### **Antibiotic Susceptibility Testing (AST)**

Agar diffusion technique on Mueller–Hinton agar (Kirby–Bauer modified disc diffusion technique) according to CLSI guidelines [23] determined the antibiotic susceptibility. The inhibition zone standards for antimicrobial susceptibility were from tables of interpretative zone diameters of Clinical and Laboratory Standards Institute [24]. The study tested nine antibiotic discs of the most commonly used drugs to treat human and animal infections caused by bacteria. These included Doxycycline (DO<sup>30</sup>) 30 mcg, Erythromycin (E<sup>15</sup>) 15 mcg, Clindamycin (CD<sup>2</sup>) 2 mcg, Cefotaxime (CTX<sup>30</sup>) 30 mcg Ciprofloxacin (CIP<sup>5</sup>) 5mcg Trimethoprim (TR<sup>5</sup>) 5mcg Amoxicillin (AX<sup>10</sup>) 10 mcg Gentamicin (HLG<sup>120</sup>) 120 mcg and Amoxiclav (AMC<sup>30</sup>) 30 mcg.

This study included a total of 109 Iraqi currency notes, comprising various denominations (250, 500, and 1000 Iraqi dinar) gathered from Basrah city. The selection process was random and aseptic, drawing from diverse sources. Additionally, 95 samples of new currency notes were utilized as controls.

### **Data Analysis**

The data obtained from questionnaires underwent analysis using SPSS version 22 (IBM SPSS Statistics). Comparative analysis was conducted among different denominations of currency, and statistical data analysis encompassed descriptive. One-way analysis contrast to estimate the different Bacterial growth on the different currency notes

dominations. P value was calculated by SPSS (ANOVA) by One-way analysis contrast to estimate the different Bacterial growth on the different currency notes dominations and it was significant value 0.695 means all 3 dominations (250, 500, 1000) IQD are at same level of having bacterial contamination.

## ■ RESULT

### **Distribution of Different Currency**

The currency notes analyzed in this study comprised different denominations: 250, 500, and 1000 Iraqi dinars. The total number of notes collected was 109. Among these, the 250-dinar note was the most prevalent, accounting for 91 notes (83.4% of total), table 1.

**Table 1**  
**Frequency of different dominations**

| Study Group    |     |      |
|----------------|-----|------|
| Currency notes | No. | %    |
| 250            | 91  | 83.4 |
| 500            | 10  | 9.1  |
| 1000           | 8   | 7.3  |
| Total          | 109 | 100  |

### **Distribution of Bacteria Based on Gram Stain Classification, Their Mix Growth**

Gram-negative bacteria were the predominant bacteria, comprising 85.4% of the total, while Gram-positive bacteria accounted for only 14.6%, table 2 and 3.

### **Denominations Distribution Collected from Different Jobs**

Currency notes were gathered in a sterile manner from a variety of outlets, including restaurant and supermarkets, meat vendors, and other sources, table 4.

### **Distribution of Bacteria Isolated from Money in Circulation and Newly Bank Money**

Newly released banknotes were assembled and tested as part of a control group, all various denominations were devoid of contaminants when compared to those

**Table 2**  
**Types of bacteria isolated from currency**

| Type of bacteria | No. | %    |
|------------------|-----|------|
| Gram Negative    | 123 | 85.4 |
| Gram Positive    | 21  | 14.6 |
| Total            | 144 | 100  |

**Table 3**  
**Mixed bacterial growth isolated from currency**

| Mix growth     | No. | %    |
|----------------|-----|------|
| Mix Gram –     | 14  | 9.7  |
| Mix Gram +     | 1   | 0.7  |
| Mix Gram – & + | 20  | 13.9 |
| Total          | 144 | 100  |

**Table 4**  
**Frequency of Currency Notes According to the sources**

|               | 250 No.    | 500 No.   | 1000 No. | Total No. | %   |
|---------------|------------|-----------|----------|-----------|-----|
| Super Markets | 23         | 0         | 1        | 24        | 22  |
| Meat vendors  | 15         | 3         | 5        | 23        | 21  |
| Bakery        | 18         | 1         | 2        | 21        | 19  |
| Restaurants   | 19         | 2         | 0        | 20        | 18  |
| Drivers       | 16         | 4         | 0        | 22        | 20  |
| Total (%)     | 91 (83.5%) | 10 (9.2%) | 8 (7.3%) | 109       | 100 |

in circulation the study, highlighting that Gram-negative bacteria, particularly *E. coli* (56.9%) which was the most frequently identified microorganisms. *Klebsiella* spp. was also relatively common (28.5%), followed by staphylococci, *Bacillus subtilis* and *Streptococci* though in lower percentages compared to *E. coli* and *Klebsiella* spp. (Table 5).

**Table 5**  
**Frequency of bacteria isolated from money in circulation and newly bank money**

| Organism                 | Circulating C.N. |               | Newly Bank Money |              |
|--------------------------|------------------|---------------|------------------|--------------|
|                          | No. of isolates  | % of isolates | No of isolates   | % of isolate |
| <i>E. coli</i>           | 82               | 56.9          | 0                | 0            |
| <i>Klebsiella</i>        | 41               | 28.5          | 0                | 0            |
| CoPS                     | 6                | 4.2           | 0                | 0            |
| CoNS                     | 2                | 1.4           | 0                | 0            |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 9                | 6.3           | 0                | 0            |
| streptococci             | 4                | 2.8           | 0                | 0            |
| Total                    | 144              | 100.0         | 0                | 0            |

Note: C.N = Currency Notes.

**Antimicrobial Sensitivity**

Antimicrobial susceptibility was done to assess the susceptibility of various bacteria. Sensitivity testing was conducted separately for Gram-negative and Gram-positive bacteria using commercially available antibiotic discs (Table 6 and 7).

**Table 6**  
**Pattern of antimicrobial sensitivity among Gram negative bacteria**

| Gram Negative Organisms |   | No. | %    |
|-------------------------|---|-----|------|
| TR                      | S | 41  | 33.3 |
|                         | R | 71  | 57.7 |
| AMC                     | S | 4   | 3.3  |
|                         | R | 101 | 82.1 |
| CIP                     | S | 94  | 76.4 |
|                         | R | 18  | 14.6 |
| CTX                     | S | 26  | 21.1 |
|                         | R | 86  | 69.9 |
| HLG                     | S | 104 | 84.6 |
|                         | R | 11  | 8.9  |

Notes: Trimethoprim (TR<sup>5</sup>), Amoxiclav (AMC<sup>30</sup>), Ciprofloxacin (CIP<sup>5</sup>), Cefotaxime (CTX<sup>30</sup>), Gentamicin (HLG<sup>120</sup>).



**Table 7**  
**Antimicrobial susceptibility pattern of Gram-positive bacteria**

| Gram Negative Organism |   | No. | %    |
|------------------------|---|-----|------|
| AX                     | S | 2   | 9.5  |
|                        | R | 10  | 47.6 |
| DO                     | S | 7   | 33.3 |
|                        | R | 11  | 52.4 |
| HLG                    | S | 11  | 52.4 |
|                        | R | 1   | 4.8  |
| E                      | S | 7   | 33.3 |
|                        | R | 11  | 52.4 |
| CD                     | S | 7   | 33.3 |
|                        | R | 4   | 19.0 |

Notes: Amoxicillin (AX10) – 10 mcg, doxycycline (DO30) – 30 mcg, Gentamicin (HLG120) – 120 mcg, Erythromycin (E15) – 15 mcg, Clindamycin (CD2) – 2 mcg.

## ■ DISCUSSION

Bacterial contamination is almost ubiquitous on paper currency, mainly due to its frequent circulation among individuals. Daily casual handling of currency notes often facilitates the transfer of microorganisms between people [25]. Furthermore, currency notes that are regularly used undergo wear and tear during transactions, which increases contamination as dirt accumulates on their surfaces. Folding or crumpling these notes creates pockets that can trap dust particles and microorganisms, further exacerbating the issue [26]. Numerous investigations carried out in the United States have extensively documented the presence of microbial contamination on paper currency through laboratory analyses. These studies reveal that pathogenic microbes are prevalent, posing significant health risks. They are implicated in various diseases including food poisoning, skin infections, and respiratory and gastrointestinal illnesses. Notable pathogens identified include *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Staphylococcus aureus*, all of which are associated with infections acquired in community and hospital settings. These findings emphasize the potential health hazards linked to handling contaminated currency [27]. Research conducted across different regions of Iraq has yielded diverse findings regarding the bacteria commonly found on contaminated currency notes. In AL-Najaf city, samples gathered from local markets revealed that *Bacillus* species were the predominant bacteria, comprising 41.2% of the organisms isolated from the currency [28]. Our research findings present a different perspective, as we have identified *Escherichia coli* as the primary bacteria isolated from contaminated currency notes. This contrasts with earlier studies, including one conducted by Intidhaar N in 2017 in Al-Nasiriyah city, Thi-Qar province, where *Escherichia coli* constituted 27.7% of the isolated bacteria [29]. These discrepancies highlight the variability in bacterial contamination patterns across different regions, emphasizing the importance of localized research to understand microbial dynamics on currency. In our current study, we observed a bacterial contamination rate of 100% on currency notes, which is slightly higher than the 90% contamination rate reported by Al-Nuaimi et al. in 2022 in Mosul, based on an analysis of thirty Iraqi paper currencies [30]. The association between money contamination and unhygienic behaviors among individuals suggests a potential risk for nosocomial infections. This association indicates a significant

level of fecal contamination on currency, reflecting inadequate local environmental sanitation practices [31]. Most studies have found that gram-negative bacteria are the most common isolates from contaminated money, consistent with the findings of our study [15]. The higher contamination levels observed on smaller denomination currencies (250, 500) compared to larger units can be attributed to their more frequent handling and circulation among individuals from various occupations. Additionally, elevated levels of *Escherichia coli* and *Staphylococci* species were detected on 250 denomination notes obtained from restaurants. This finding is likely correlated with the types of food handled by restaurant workers, suggesting a potential link between currency contamination and occupational activities in food handling environments [28]. In our current study, we observed that most of the old currency notes were contaminated by Gram-negative bacteria. Notably, Gram-positive bacteria were also present, constituting 11% of the bacterial isolates in our investigation. This slightly contrasts with studies by Pawani et al. and Agarwal et al., which reported higher rates of coagulase-negative staphylococci (CONS) contamination at 20.68% and 21.2%, respectively [31]. Furthermore, susceptibility testing to antimicrobial agents was conducted for both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Escherichia coli* exhibited resistance to Trimethoprim (91.5%), Amoxiclav (67.3%), and Ciprofloxacin (66.7%), while showing good sensitivity to Ciprofloxacin (79.6%). Conversely, *Klebsiella* spp. demonstrated high resistance to Ciprofloxacin (95.7%). These findings highlight the concerning levels of antibiotic resistance among bacteria isolated from currency notes, suggesting a potential public health risk associated with the transmission of resistant pathogens through contaminated currency. Denis Dekugmen Ya's study also demonstrated similar results regarding resistance in both *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. [32]. Furthermore, the majority of coagulase-negative staphylococci (CONS) strains showed sensitivity or intermediate sensitivity to most of the antibiotics tested, with the highest resistance observed against Amoxicillin (13.3%). Differences in antibiotic resistance patterns between our study and others may be attributed to regional variations in prevalent organisms and differing antibiotic regimens used for treatment [30]. These regional variations underscore the importance of considering local epidemiological data and antibiotic usage patterns when interpreting antimicrobial resistance findings.

## ■ CONCLUSION

Currency notes in circulation serve as vehicles for the exchange of numerous microbes as they pass from one hand to another. This contamination has the potential to significantly contribute to the transmission of various diseases. The presence of antibiotic-resistant bacteria species on currency notes represents a notable risk to both the community and individuals who handle these notes.

---

## ■ REFERENCES

1. Górny RL, Golofit-Szymczak M, Wójcik-Fatla A, et al. Microbial contamination of money sorting facilities. *Ann Agric Environ Med*. 2021 Mar 18;28(1):61–71. doi: 10.26444/aaem/132321
2. Meister TL, Kirchhoff L, Brüggemann Y, et al. Stability of pathogens on banknotes and coins: A narrative review. *J Med Virol*. 2023 Dec;95(12):e29312. doi: 10.1002/jmv.29312
3. Demirci M, Celepler Y, Dincer S, et al. Should we leave the paper currency? A microbiological examination. *Rev Esp Quimioter*. 2020 Apr;33(2):94–102. doi: 10.37201/req/085.2019
4. Hajipour N, Moosavy MH, Rostamzadeh B, Hajibemani A. Contamination of coins and banknotes as sources of transmission of parasitic pathogens: a pilot study from Iran. *Public Health*. 2020 Sep;186:116–118. doi: 10.1016/j.puhe.2020.07.009



5. Angelakis E, Azhar EI, Bibi F, et al. Paper money and coins as potential vectors of transmissible disease. *Future Microbiol.* 2014;9(2):249–61. doi: 10.2217/fmb.13.161
6. Rohrig B. The Chemistry of Money. Royal Society of Chemistry; London, UK: 2020. [accessed on 14 October 2021]. <https://www.amazon.com/Chemistry-Money-Brian-Rohrig/dp/1782629831>
7. Al-Ghamdi A, Abdelmalek S, Bamaga M, et al. Bacterial Contamination of Saudi "One" Riyal Paper Notes. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 2011;42:711–6.
8. Salu S, Okyere J, Charles-Unadike VO, Ananga MK. Nurses' knowledge on nosocomial infections preventive measures and its associated factors in Ghana: a cross-sectional study. *BMC Health Serv Res.* 2023 Sep 1;23(1):941. doi: 10.1186/s12913-023-09942-2
9. Abrams BJ, Waterman NG. Dirty Money. *JAMA.* 1972;219:1202–3.
10. Abia ALK, Ubomba-Jaswa E. Dirty Money on Holy Ground: Isolation of Potentially Pathogenic Bacteria and Fungi on Money Collected from Church Offerings. *Iran J Public Health.* 2019 May;48(5):849–857.
11. Agersew Alemu. Microbial Contamination of Currency Notes and Coins in Circulation: A Potential Public Health Hazard. *Biomedicine and Biotechnology.* 2014;2(3):46–53. doi: 10.12691/bb-2-3-2
12. Cozorici D, Măciucă RA, Stancu C, et al. Microbial Contamination and Survival Rate on Different Types of Banknotes. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Apr 4;19(7):4310. doi: 10.3390/ijerph19074310
13. Górny RL, Gołofit-Szymczak M, Wójcik-Fatla A, et al. Microbial contamination of money sorting facilities. *Ann Agric Environ Med.* 2021 Mar 18;28(1):61–71. doi: 10.26444/aaem/132321
14. Ahmed S, Parveen S, Nasreen T, Feroza B. Evaluation of the Microbial Contamination of Bangladesh Paper Currency Notes (Taka) In Circulation. *Advances In Biological Research.* 2010;4(5):266–271.
15. Abid HS. Bacterial Contamination of Iraqi Paper Currency Notes in Circulation & Resistance of Pathogenic Bacteria to Antibiotics. *Iraqi Journal of Science Iraqi Journal of Science.* 2012;53(1):245–8.
16. Sunil S, Panchmal GS, Shenoy RP, et al. Assessment of microbial contamination of Indian currency notes in circulation – An in vitro study. *Journal of Indian Association of Public Health Dentistry.* 2020;18(2):179–82. doi: 10.4103/jiaphd.jiaphd\_77\_19
17. Tagoe DNA, Baidoo SE, Dadzie I, Athor D. A study of Bacterial Contamination of Ghanaian Currency Notes in Circulation. *The Internet Journal of Microbiology.* 2010;8(2):1–5.
18. Sawalha H, Mowais MA. Bacterial Contamination of Paper Banknotes in Circulation; a Case Study in the Jenin District, Palestine. *Journal of Science.* 2012;1(2):36–9.
19. Rocha-Gómez J, Tejeda-Villarreal PN, Macías-Cárdenas P, et al. Microbial contamination in 20-peso banknotes in Monterrey, Mexico. *J Environ Health.* 2012 Sep;75(2):20–3.
20. Barolia SK, Verma S, Verma BK. Coliform Contamination on different Paper Currency in Ajmer, Rajasthan, India. *Universal Journal of Environmental Research and Technology.* 2011;1(4):552–6.
21. Awe S, Eniola KIT, Ojo FT, Sani A. Bacteriological quality of some Nigerian currencies in circulation. *African Journal of Microbiology Research.* 2010;4(21):2231–4.
22. Pradeep NV, Marulasiddaiah BS, Chetana M. Microbial Contamination of Indian Currency notes in circulation. *Journal of Research in Biology.* 2012;2(4):377–382.
23. Nassar MSM, Hazzah WA, Bakr WMK. Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *J Egypt Public Health Assoc.* 2019;94(1):4. doi: 10.1186/s42506-018-0006-1
24. Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of Changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. M100, 31st Edition. *J Clin Microbiol.* 2021 Nov 18;59(12):e0021321. doi: 10.1128/JCM.00213-21
25. Awe S, Eniola KIT, Ojo FT, Sani A. Bacteriological quality of some Nigerian currencies incirculation. *African Journal of Microbiology Research.* 2010;4:2231–2234.
26. Sanjogita S, Geeta A. Contaminated Money in Circulation. *Int J Recent Scifc Res.* 2014;5:1533–1540.
27. Michaels B. Handling money and serving ready-to eat food. *Food Service Technology.* 2002;2:1–3.
28. Al-Abbasi U. Investigation of bacterial contamination in Iraqi paper currency. *Journal of Kerbala University.* 2010;8(3):134–149.
29. Abid IN. Bacterial contamination of Iraqi paper currency in circulation in Al-Nasiriyah city, Thi-Qar province. *University of Thi-Qar Journal of Science.* 2017;6(2):121–126. Available at: <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci/v6i2.8>
30. Al-Nuaimi RS, Garjes SG, Mahmood MB. Isolate Bacterial Contamination From Iraqi Currencies Notes and Determination of Their Resistance to Antibiotic. *Ann Coll Med Mosul.* 2022;44(2):171–180.
31. Agarwal G, Ingle NA, Kaur N, et al. Assessment of microbial contamination of Indian currency notes in Mathura city, India: A cross-sectional study. *J Adv Oral Res.* 2015;6(2):43–48.
32. Yar DD. Bacterial Contaminants and Antibigram of Ghana Paper Currency Notes in Circulation and Their Associated Health Risks in Asante-Mampong, Ghana. *Int J Microbiol.* 2020 Oct 8;2020:8833757. doi: 10.1155/2020/8833757



Tabarek Rabeea Lafta, Basim Abdalhussein Jarullah✉  
College of Veterinary Medicine, Shatrah University, Thi-Qar, Iraq

## Molecular Identification of SARS-CoV-2 in Patients with Heart Diseases in Thi-Qar Province, South of Iraq

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Tabarek Rabeea Lafta – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, software, validation, visualization, writing – original draft and editing; Basim Abdalhussein Jarullah – conceptualization, data curation, methodology, project administration, resources, software, supervision, validation, visualization, writing – original draft and editing.

**Informed consent:** the study was conducted with the informed consent of the patients.

**Ethics statement:** this work was approved by Ethics Committee of Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Shatrah University (32 in 11/19/2023).

**Funding:** nothing to declare.

The article is published in author's edition.

Submitted: 14.08.2024

Accepted: 30.04.2025

Contacts: dr.basimj@gmail.com

### Abstract

**Introduction.** Recent studies have convincingly demonstrated the ability of the SARS-CoV-2 coronavirus pathogen to exacerbate the severity of cardiovascular diseases through the formation of cardiorespiratory pathology, partly due to endothelial injury.

**Purpose.** To determine the impact of cardiovascular disease on the incidence of SARS-CoV-2 coronavirus infection in patients residing in southern Iraq.

**Materials and methods.** An analysis of 120 blood samples from patients residing was conducted to identify the presence of SARS-CoV-2 coronavirus infection in patients with cardiovascular disease manifestations and in patients with no confirmed cardiovascular pathology. A high-tech research method, the quantitative PCR (qPCR), was used to detect SARS-CoV-2.

**Results.** The study found 95 positive and 25 negative samples for SARS-CoV-2. The positive blood samples contained RdRp, E, and N genes, and the cycle threshold (CT) depended on their identification. The highest number of positive samples was detected in autumn and in the first month of winter, mainly in patients aged 19–27, 64–72, and 73–81. A higher prevalence of viral infection was observed among women and patients with ventricular septal defects.

**Conclusion.** The SARS-CoV-2 infection is influenced by patients' age and the presence of clinical manifestations of cardiovascular pathology. The data obtained serve as a basis for planning further studies aimed at analyzing the entire SARS-CoV-2 genome to identify the strains identified in this study.

**Keywords:** SARS-CoV-2, qPCR, heart diseases, E and N genes, ventricular septal defect



Табарек Раба Лафта, Басим Абдалхуссейн Джаруллах✉

Колледж ветеринарной медицины, Университет Шатрах, Ти-Кар, Ирак

## Молекулярная идентификация SARS-CoV-2 у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями из провинции Ти-Кар на юге Ирака

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Табарек Раба Лафта – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Басим Абдалхуссейн Джаруллах – концепция, научное руководство, обработка данных, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование.

**Информированное согласие:** исследование было проведено после получения информированного согласия пациентов.

**Этическое заявление:** данная работа была одобрена комитетом по этике отделения микробиологии Колледжа ветеринарной медицины Университета Шатрах (№ 32 от 19/11/2023).

**Финансирование:** исследование проведено без спонсорской поддержки.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 14.08.2024

Принята: 30.04.2025

Контакты: dr.basimj@gmail.com

### Резюме

**Введение.** Исследованиями последних лет показана способность возбудителя коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 усугублять тяжесть течения сердечно-сосудистых заболеваний вследствие формирования кардиореспираторной патологии, отчасти за счет поражения эндотелия.

**Цель.** Определить влияние сердечно-сосудистых заболеваний на частоту встречаемости коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 у пациентов, проживающих на юге Ирака, в зависимости от их возраста и пола.

**Материалы и методы.** Осуществлен анализ 120 образцов крови пациентов, проживающих в провинции Ти-Кар на юге Ирака, на предмет выявления наличия коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 у пациентов с проявлениями сердечно-сосудистых заболеваний и у пациентов с отсутствием констатированной сердечно-сосудистой патологии. Для выявления SARS-CoV-2 использован высокотехнологичный метод исследования – количественной ПЦР (qPCR).

**Результаты.** По результатам исследования выявлено 95 положительных (в отношении вируса SARS-CoV-2) образцов, 25 образцов были отрицательными. В положительных образцах крови обнаружены гены RdRp, E и N, а порог цикла (CT) зависел от их идентификации. Наибольшее количество положительных проб выявлено в осенний период и первый месяц зимнего периода времени, преимущественно у пациентов в возрасте 19–27, 64–72 и 73–81 года. Больше носительство вирусной инфекции наблюдалось среди женщин и пациентов с дефектами межжелудочковой перегородки.

**Заключение.** На инфицированность SARS-CoV-2 влияет возраст пациентов и наличие у них клинических проявлений сердечно-сосудистой патологии. Полученные данные служат основой для планирования выполнения дальнейших исследований, направленных на анализ всего генома SARS-CoV-2 для выявления его штаммов, идентифицированных в данном исследовании.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, qPCR, сердечно-сосудистые заболевания, гены E и N, дефект межжелудочковой перегородки

---

## ■ INTRODUCTION

SARS-CoV-2 is a new species of the Coronaviruses, which causes severe respiratory syndrome. This virus was detected in the Wuhan, a city of China, in December of 2019 that possessed temporary name was COVID-19 before Chinese scientists classified it belongs to the Coronaviruses [1, 2]. Indeed, the syndrome made peoples in the World to be afraid because SARS-CoV-2 causes pandemic according to the report of World Health Organization, WHO [3]. Therefore, the syndrome represented a global impact of the public health although most infected patients had simple cases while others possessed severe and critical ones that millions of the patients dead due to SARS-CoV-2 [4, 5]. All ages and genders are infected as well as healthy persons and persons associated with other diseases such as heart disease patients have infections [2, 6].

Genetically, this virus has close relationship with SARS-CoV-1 compared with MERS-CoV. In addition, it has high affinity to angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) than SARS-CoV-1 [1, 7]. Most cases are simple, however, patients with comorbidities have severity when they infected with SARS-CoV-2 [8]. This virus can cause all parts of the body including cardiovascular systems, therefore, heart disease patients are also dangerous cases of that syndrome, yet a number of the cases are considered simple reports of the heart disease patients [6]. Heart failure, myocardial infarction, and cardiogenic shock are examples of the cases related to the death particularly cardiogenic shock [9]. For these reasons, SARS-CoV-2 infection has been interested especially with heart disease patients because the they can be dangerous cases if they infected with that virus [5].

Furthermore, lungs are main organs that the virus infect them leading to cause severe symptoms related to cardiovascular systems. Thrombosis, angiogenesis, pulmonary vascular endothelialitis, interstitial pneumonitis, and severe acute respiratory distress syndrome are reported due to SARS-CoV-2 infection. In addition, other problems are also noticed such as hypertension, atrial fibrillation, cardiac damage, and ventricular fibrillation [6]. Based on mentioned reasons, complications and high morbidity with a syndrome of the SARS-CoV-2 are recorded in the groups of heart disease patients. For these reasons, this research focused on the molecular detection of SARS-CoV-2 from heart disease patients hospitalized in Thi-Qar Province, south of Iraq.

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

To determine the impact of cardiovascular disease on the incidence of SARS-CoV-2 coronavirus infection in patients residing in southern Iraq.

## ■ MATERIALS AND METHODS

### **Collection of Specimens**

Nasopharyngeal swabs of 120 specimens are randomly collected aseptically from patients hospitalized in Heart Diseases Hospital in Thi-Qar Province located in south of Iraq. Patients had various ages and genders as well as they possessed different forms of the heart diseases besides COVID-19. In addition, specimens were obtained from

patients infected with SARS-CoV-2 only and used positive control group while specimens used negative group were collected from patients associated with heart diseases and no COVID-19 of them. Patients of all specimens were in quarantine or recovery rooms and specialists doctors helped us to diagnosis of the diseases through symptoms and radiological reports. A number of the control specimens was 60 nasopharyngeal swabs. Period of the collection ranged from September of 2023 to January of 2024.

### Molecular Identification

Viral RNA was extracted according to instruction of EasyPure® Viral DNA/RNA kit. In addition, three types of primers and probes were used (Table 1). In addition, purity of all extracted RNA was evaluated using NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer. If the 260/280 ratio falls between 2.0 to 2.2 and the 260/230 ratio is between 0.1 to 0.8, it suggests relatively pure RNA with acceptable purity levels. However, a 260/230 ratio below 1.0 may indicate the presence of contaminants like phenol or other organic compounds, affecting RNA quality. A260/A280 and A260/A230 ratio for 120 specimens and the absorption ratio of 260 to 280 for all specimens were within the acceptable range. The molecular identification was performed using qRT-PCR and its protocol was shown in (Table 2) and according to TranScript® II Probe One-Step qRT-PCR Super Mix, TransGen Biotech, China.

**Table 1**  
**Primers Sequences with their references**

| Gene      | Oligonucleotide | Sequences<br>5'-3'                 | References |
|-----------|-----------------|------------------------------------|------------|
| RdRP gene | RdRp_SARsR-F    | GTGARATGGTCATGTGTGGCGG             | [10]       |
|           | RdRp_SARsR-P2   | FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ  |            |
|           | RdRp_SARsR-P1   | FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ |            |
|           | RdRp_SARsR-R    | CARATGTTAAASACACTATTAGCATA         |            |
| E gene    | E_Sarbeco_F     | ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT         |            |
|           | E_Sarbeco_P1    | FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ |            |
|           | E_Sarbeco_R     | ATATTGCAGCAGTACGCACACA             |            |
| N gene    | N_Sarbeco_F     | CACATTGGCACCCGCAATC                |            |
|           | N_Sarbeco_P     | FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ  |            |
|           | N_Sarbeco_R     | GAGGAACGAGAAGAGGCTTG               |            |

**Table 2**  
**Distribution of SARS-CoV-2 infections of patients according to the sex**

| Sex                                        | Results  |       |          |       | Total |      |
|--------------------------------------------|----------|-------|----------|-------|-------|------|
|                                            | Positive |       | Negative |       |       |      |
|                                            | No.      | %     | No.      | %     | No.   | %    |
| Male                                       | 58       | 77.33 | 17       | 22.67 | 75    | 62.5 |
| Female                                     | 37       | 82.22 | 8        | 17.78 | 45    | 37.5 |
| Total                                      | 95       | 79.17 | 25       | 20.83 | 120   | 100  |
| CalX²=0.767 TabX²=3.84 DF=1 p. value 0.381 |          |       |          |       |       |      |

CalX<sup>2</sup>=0.767 TabX<sup>2</sup>=3.84 DF=1 p. value 0.381

### Statistical Analysis

The data was analyzed using statistical program SPSS version 26 depending on Chi-square. Statistical significance was defined as a probability P value  $<0.05$ .

## RESULTS

### Molecular Identification

This study showed detected three SARS-CoV-2 indicator genes (RdRp, E and N genes) in the qRT-PCR process and cycle threshold (CT) value was calculated for each one of the 120 specimens by treating them with the parameters of virus (Table 1). The results showed the variation of the CT values between one specimen and another and some specimens recorded a CT value between (9–25) that the percentage of viral load is very high (Fig. 1–3) offset by this low value of CT. In addition, other specimens appeared values between (35–40) indicate a medium percentage of viral load in those specimens. Some of the tested specimens resulted in values were higher than 35 which refer to milled viral load in those specimens.

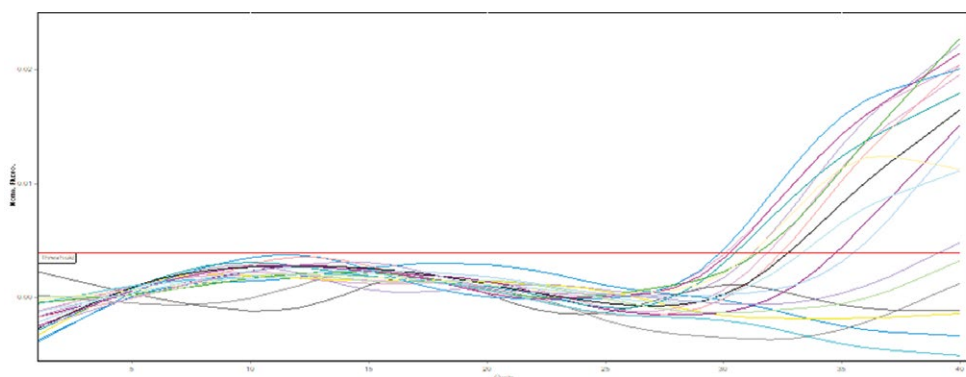


Fig. 1. RdRp gene amplification plots

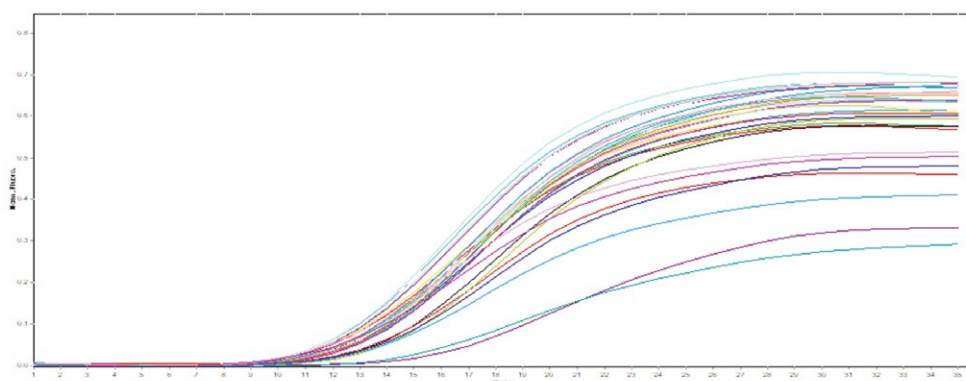
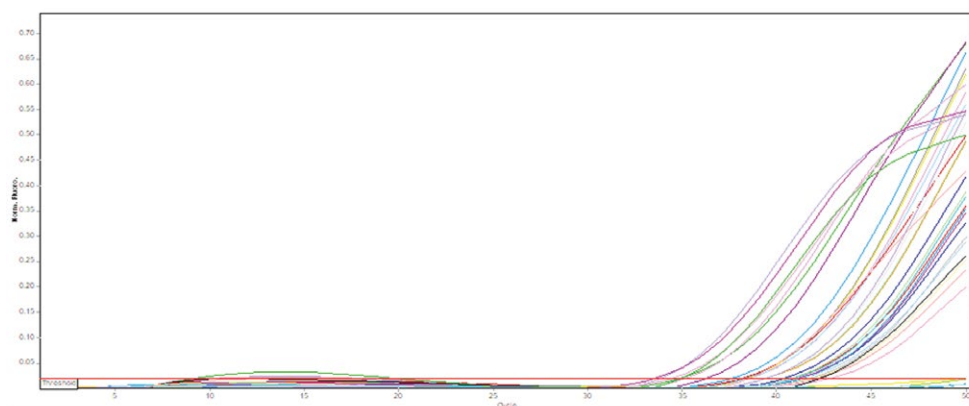


Fig. 2. E gene amplification plots



**Fig. 3. N gene amplification plots**

The current study appeared 95 of the tested specimens were positive for SARS-CoV-2 while 25 ones were negative. The amplification curve began at cycle 32 above the cycle threshold (CT) line for RdRp, E and N genes as shown in Fig. 1–3. The photograph was taken directly from qPCR machine. The amplification plot in qPCR depicts the fluorescence signal (y-axis) versus the cycle number (x-axis). Initially, there is minimal fluorescence due to background noise. As PCR cycle's progress, the target DNA or RNA is amplified exponentially during the logarithmic phase. This results in a sharp increase in fluorescence, indicating the accumulation of amplicons. The exponential phase shows a linear relationship between fluorescence and the log of template concentration. Eventually, amplification reaches a plateau phase where the reaction exhausts reagents, resulting in minimal fluorescence increase. The threshold line, set above background noise, intersects the exponential phase's linear portion, determining the CT value, which represents the cycle number at which fluorescence surpasses the threshold, indicating detectable amplification. CT of the RdRp, E and N genes [10] were calculated to be around 30, 32 and 15, respectively. A lower CT correlates with higher initial target concentration.

### **Distribution of SARS-CoV-2**

Statistical analysis showed no significant differences at P. value, which was  $<0.05$  according to the genders that the females had 82.22% of the SARS-CoV-2 infection in comparison with ratio of the male, which was 77.33%. Concerning, non=infected female group recorded 17.78% but 22.67% belonged to the male infection with that virus (Table 2). According to the complications of comorbidities, the results showed high significant difference at p. value  $<0.05$  of the patients. SARS-CoV-2 infection was noticed in a high ratio (100%) in patients suffer from ventricular septal defect (VSD) disease, followed by patients with arrhythmia disease (88.24%) while the lowest ratio (61.29%) in patients with heart failure, and in arteriosclerosis patients 77.78% (Table 3). In addition, the statistical analysis resulted in high significant differences at the same value of the probability among collection periods of the specimens. The analysis showed a high ratio (90.48%) of the infection occurred in September followed December and November but the lowest one (52.63%) was in January (Table 4). Contextually, SARS-CoV-2 infections were detected

according to the ages of patients that high significant differences at p. value <0.05 were recorded. High ratio of infection was noticed in patient age of 73–81 years, which was 91.67% while lowest ration was diagnosed in 91–98 years (Table 5).

**Table 3**  
**Distribution of SARS-CoV-2 infections according to the disease complications**

| Complications                                | Results  |       |          |       | Total |       |
|----------------------------------------------|----------|-------|----------|-------|-------|-------|
|                                              | Positive |       | Negative |       |       |       |
|                                              | No.      | %     | No.      | %     | No.   | %     |
| Angina                                       | 31       | 86.11 | 5        | 13.89 | 36    | 30.0  |
| Arrhythmia                                   | 15       | 88.24 | 2        | 11.76 | 17    | 14.17 |
| Arteriosclerosis                             | 14       | 77.78 | 4        | 22.22 | 18    | 15.0  |
| MI                                           | 14       | 87.50 | 2        | 12.50 | 16    | 13.33 |
| VSD                                          | 2        | 100   | 0        | 0.00  | 2     | 1.67  |
| Heart failure                                | 19       | 61.29 | 12       | 38.71 | 31    | 25.83 |
| Total                                        | 95       | 79.17 | 25       | 20.83 | 120   | 100   |
| CalX²=61.1 TabX²=11.07 DF=5 p. value<0.001** |          |       |          |       |       |       |

**Table 4**  
**Distribution of SARS-CoV-2 according to collection periods**

| Time collection                              | Results  |       |          |       | Total |       |
|----------------------------------------------|----------|-------|----------|-------|-------|-------|
|                                              | Positive |       | Negative |       |       |       |
|                                              | No.      | %     | No.      | %     | No.   | %     |
| September                                    | 19       | 90.48 | 2        | 9.52  | 21    | 17.50 |
| October                                      | 20       | 80.0  | 5        | 20.0  | 25    | 20.83 |
| November                                     | 20       | 76.92 | 6        | 23.08 | 26    | 21.67 |
| December                                     | 26       | 89.66 | 3        | 10.34 | 29    | 24.17 |
| January                                      | 10       | 52.63 | 9        | 47.37 | 19    | 15.83 |
| Total                                        | 95       | 79.17 | 25       | 20.83 | 120   | 100   |
| CalX²=53.4 TabX²=9.49 DF=4 p. value <0.001** |          |       |          |       |       |       |

**Table 5**  
**Distribution of SARS-CoV-2 infections according to patient ages**

| Patient ages                                                             | Results  |       |          |       | Total |       |
|--------------------------------------------------------------------------|----------|-------|----------|-------|-------|-------|
|                                                                          | Positive |       | Negative |       |       |       |
|                                                                          | No.      | %     | No.      | %     | No.   | %     |
| 19–27 years                                                              | 10       | 90.91 | 1        | 9.09  | 11    | 9.17  |
| 28–36 years                                                              | 5        | 71.43 | 2        | 28.57 | 7     | 5.83  |
| 37–45 years                                                              | 11       | 73.33 | 4        | 26.67 | 15    | 12.50 |
| 46–54 years                                                              | 17       | 85.0  | 3        | 15.0  | 20    | 16.67 |
| 55–63 years                                                              | 23       | 76.67 | 7        | 23.33 | 30    | 25.0  |
| 64–72 years                                                              | 15       | 83.33 | 3        | 16.67 | 18    | 15.0  |
| 73–81 years                                                              | 11       | 91.67 | 1        | 8.33  | 12    | 10.0  |
| 82–90 years                                                              | 2        | 50.0  | 2        | 50.0  | 4     | 3.33  |
| 91–98 years                                                              | 1        | 33.33 | 2        | 66.67 | 3     | 2.50  |
| Total                                                                    | 95       | 79.17 | 25       | 20.83 | 120   | 100   |
| CalX <sup>2</sup> =155.3 TabX <sup>2</sup> =15.51 DF=8 p. value <0.001** |          |       |          |       |       |       |



## ■ DISCUSSION

The SARS-CoV-2 has been identified molecularly that RT-PCR was applied to detect genes of this viral genome with probes and stains such as FAM. Examples of these genes E, N, and RdRp that scientists detected genes of E, and N [10, 11] and results of the current study were agreed with those researchers. These genes have used in the identification of SARS-CoV-2 that E gene is responsible for viral envelope and N is used to form nucleocapsid while RdRp for life cycle of the virus.

Results of scientists showed these genes are used for SARS-CoV-2 diagnosis [12]. Concerning, the RdRp gene control viral evolution as well as importance of E and N genes, which has roles in the viral assembly and replication. Additionally, the N-protein of the SARS-CoV-2 affects host cell responses and may serve regulatory roles during its viral life cycle [13]. These reasons led to make the current study used the mentioned genes for identification of SARS-CoV-2 in patients infected with COVID-19 and Ct values for RdRp E and N genes were recorded to be around 9, 25 and 35, 40 respectively. Results showed that among the 120 examined samples, 95 samples contained three marker genes and were considered as COVID positive. 25 samples also lacked the mentioned genes and were considered as COVID negative samples.

Most positive samples have been collected from Al-Nasiriyah and Al-Naser residence with 90.14 and 83.33% respectively. Age and gender are two important factors related to the risk and outcome of various diseases. In positive cases (contain three genes) approximately 77.33 and 82.22% of the study population were males and females respectively and no significant difference was observed between different genders. Most of samples, 91.67% were from 73 to 81 years old age group. However, it was shown that different countries around the world and different cities in Iraq had varying prevalence rates. Our results differed from prior research by [14], who investigated risk factors predisposing to COVID-19 outbreak in a group of Iraqi patients in Baghdad city. They recorded highest (41.4%) positive PCR test in the 26–40 age group in their study.

Prevalence of the COVID-19 infections from October 2021 to June 2022 was reported from Al Hussein Teaching hospital, Thi-Qar, Province, south of Iraq. Of 88 positive samples, male groups had the largest percentage of COVID-19 occurrences, with 47 (53.4%) compared with 41 (45.8%) of female groups [15], which were not significant like our results. The highest age group of patients were reported to be 45–54 years that is not like our research. This viral infection has been recorded to occur in all months of the year, however; environmental factors lead to increase morbidity. SARS-CoV-2 increases in the cold environment which has dryness that the immune responses can be affected and this virus can be survival in the cold and dried environment [7]. The current study resulted in various rations of the SARS-CoV-2 infection among September into January (Table 4). It may be attributed to the Iraqi climate is changed from day into day that makes immunity of the patients becomes weak. There is cold and dried environment on the Iraq. This study appeared higher ration was noticed in September followed by December and October but less infection was demonstrated in January.

A study included 389 COVID-19 patients admitted to Al-Hussein Teaching Hospital during the period from March to August 2021 reported that most of the cohort 255 (65.6%) were in the age group 19–40 years old, while only 18 (4.6%) were older than 65 years [16], that the present study had different results. In another study [17], showed prevalence of COVID-19 Pandemic at Al-Nasiriya city, south of Iraq. Result used 460 samples by which

50.9% and 49.1% were female and no significant difference was observed between different genders like our study. Most samples (47.2%) were detected between the age categories of 21–30 years, which differed from the current results. A gender difference favoring men has also been observed in some studies and suggests that the virus is more likely to infect men [3, 5, 18] which is not consistent with the results of our study. It has been noted that patients infected with COVID-19 had a greater prevalence of the cardiovascular disease, and studies found that >7% of the patients with the infection experienced myocardial injury [19].

In a particular study, a group of 191 patients from Wuhan, China, 48% of patients had co-morbidities, and 8% had cardiovascular disease [20]. Moreover, eight studies conducted had meta-analysis results that showed that amongst comorbidities, hypertension ( $17\pm7\%$ ), Diabetes mellitus ( $8\pm6\%$ ), and Cardiovascular disease ( $5\pm4\%$ ) were the most prevalent in COVID-19 (20). COVID-19 has been associated with various cardiovascular complications such as heart attacks [21, 22], arrhythmias, and cardiomyopathy, which are considered risk factors for cardiovascular disease. The virus is believed to potentially harm the heart directly, likely through a cytokine storm that leads to non-ischemic myocardial injury [23]. The progression of heart deterioration involves multiple factors and stages, often resulting in severe outcomes.

## ■ CONCLUSION

SARS-CoV-2 infection increases depending on the genders and ages of patients, comorbidities, and time of the specimen collection. In addition, the current study recommended further studied such as analysis of whole genome of the SARS-CoV-2 to reveal its strains.

## ■ REFERENCES

1. Alhasan DA, Al-Saidy HA. Mini-Review: SARS-CoV-2 and COVID-19. *University of Thi-Qar Journal of Science*. 2021;8(1):7–13.
2. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*. 2020;395(10223):497–506.
3. Zhang HW, Yu J, Xu HJ, et al. Corona virus international public health emergencies: implications for radiology management. *Academic radiology*. 2020;27(4):463–7.
4. Wan Y, Shang J, Graham R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of virology*. 2020;94(7):10–128.
5. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323(11):1061–9.
6. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military medical research*. 2020;7:1–0.
7. Sun Z, K Kumar TK, He SS, Liu SV. Potential Factors Influencing Repeated SARS Outbreaks in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(1633):1–11.
8. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The lancet*. 2020;395(10223):507–13.
9. Sahin AR, Erdogan A, Agaoglu PM, et al. 2019 novel coronavirus (COVID-19) outbreak: a review of the current literature. *EJMO*. 2020;4(1):1–7.
10. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):2000045.
11. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*. 2020;395(10224):565–74.
12. Fehr AR, SJC. Perlman and protocols. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses Methods and Protocols*. 2015;1282(160):1–23.
13. McBride R, Van Zyl M. Fielding the coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *MDPI Journals*. 2014;6(8):2991–3018.
14. Abbas Z, Manhal FJ. Comorbidities and risk factors for COVID-19 in a group of Iraqi patients confirmed by real-time PCR test. *Journal Port Science Researc*. 2021;4(1):1–5.
15. Mahdi AADS, Al Saimary IE. Fate of clinical observations on COVID-19 in Thi-Qar population. *Journal of Clinical Immunology Research*. 2023;1(1):1–6.



16. Musa JT. U. The Epidemiological Pattern of COVID-19 Epidemic, During the Initial Phase in Thi-Qar Governorate, Iraq: A Case Series Study. *The medical journal of Basrah University*. 2020;38(2):25–36.
17. ABD RK. Evaluation of the Execution of Precautionary Measures to Diminish the Prevalence of Covid-19 Pandemic at Al-Nasiriya City Southern Iraq. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 2020;12(4):2518–2522.
18. Baggett TP, Keyes H, Sporn N, Gaeta JM. Prevalence of SARS-CoV-2 infection in residents of a large homeless shelter in Boston. *JAMA*. 2020;323(21):2191–2192.
19. Naz A, Billah MJE. COVID-19 and coronary heart disease. *Encyclopedia*. 2021;1(2):340–349.
20. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–1062.
21. Yang J, Zheng Y, Gou X, et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV2: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;94(38):91–95.
22. Mishra AK, Sahu KK, George AA, et al. A review of cardiac manifestations and predictors of outcome in patients with COVID-19. *Heart & lung*. 2020;49(6):848–852.
23. Adu AJ, Mprah R Adekunle, Noah AO, Adzik GK. The cardiovascular aspect of COVID-19. *Annals of medicine*. 2021;53(1):227–236.



Соболева О.Е.✉, Пашкевич С.Г.

Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

## Референтные значения показателей морфологического состава крови лабораторных мышей (самок) линии ICR/CD-1: методология исследования

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** дизайн исследования, сбор материала, статистическая обработка материала, написание текста – Соболева О.Е.; обсуждение и интерпретация материала, концепция, редактирование – Пашкевич С.Г.

**Благодарность:** авторы выражают признательность ветеринарной клинике «Дай лапу» (Минск) за оказанную помощь при проведении данного исследования, а также особую благодарность ее директору Жойдь Э.В. за предоставление гематологического автоматического анализатора (URIT VET3000 Plus).

Подана: 23.01.2025

Принята: 05.05.2025

Контакты: soboleva\_volha@mail.ru

### Резюме

**Введение.** Лабораторные мыши линии ICR/CD-1 являются участниками множества научных экспериментов для решения различных вопросов моделирования типовых патологических процессов. По причине значительного количества циклических процессов у самок, связанных с отправлением физиологических функций, в биомоделировании, как правило, акцентируют внимание на изменениях показателей общего анализа крови самцов. Референтные интервалы гематологических показателей лабораторных мышей в состоянии физиологической нормы зависят от условий кормления, содержания, возраста, пола и многих других факторов. В связи с этим наличие достаточной выборки особей одного возраста и массы тела в одинаковом физиологическом статусе при стандартизации условий надлежащего ухода позволит сформировать базу и установить референтные интервалы общего анализа крови самок мышей линии ICR/CD-1.

**Цель.** Получение стандартизированного массива данных оценки морфологического состава крови самок мышей линии ICR (CD-1) и установление референтных интервалов гематологических показателей и лейкограмм.

**Материалы и методы.** У интактных мышей линии ICR (CD-1) – 157 самок в возрасте 2–2,5 месяца и с массой тела  $20 \pm 2$  г – осуществляли взятие крови из лицевой вены и анализировали показатели морфологического состава крови с применением автоматического гематологического анализатора и лейкоцитарной формулы (дифференцированный подсчет лейкоцитов) с обязательной «ручной» микроскопией мазка крови.

**Результаты.** Референтные интервалы показателей морфологического состава крови самок мышей линии ICR/CD-1 определены впервые. Их диапазон согласуется с данными литературы, полученными при исследовании самок мышей других линий. Однако отмечены отличия в уровне тромбоцитов, что может быть связано

с различными причинами (процедура отбора пробы крови, использование анестезии, метод исследования, используемый гематологический анализатор и прочее).

**Заключение.** Впервые установлены референтные интервалы для показателей морфологического состава крови лабораторных мышей (самок) линии ICR (CD-1). Полученные данные необходимы для интерпретации результатов доклинических лабораторных исследований и целей биомоделирования типовых патологических процессов.

**Ключевые слова:** общий анализ крови, мыши ICR/CD-1, референтный интервал, доверительный интервал, тромбоцитарные индексы, коэффициент больших тромбоцитов

Soboleva O.✉, Pashkevich S.

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

## Reference Values for Hematological Parameters in Female ICR/CD-1 Laboratory Mice: Study Methodology

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** study design, material collection, material statistical processing, text writing – Soboleva O.; discussion and material interpretation, concept, editing – Pashkevich S.

**Acknowledgement:** the authors express their gratitude to the veterinary clinic "Dai Lapu" (Minsk) for assistance in conducting the study, as well as special gratitude to E. Zhoid, Director of the clinic, for providing a hematological automatic analyzer (URIT VET3000 Plus).

Submitted: 23.01.2025

Accepted: 05.05.2025

Contacts: soboleva\_volha@mail.ru

### Abstract

**Introduction.** ICR/CD-1 laboratory mice are participants of many scientific experiments to address various issues related to modelling typical pathological processes. Due to a significant number of cyclic processes in females associated with physiological functions, biomodelling usually focuses on changes in complete blood count findings in males. Reference intervals of hematological indices of laboratory mice in the state of physiological norm depend on feeding conditions, housing, age, sex and many others. In this regard, having a sufficient sample of specimens of the same age and body weight in the same physiological status under standardized conditions of proper care will allow creating a base and establishing reference intervals for complete blood count in female ICR/CD-1 mice.

**Purpose.** To obtain a standardized data set of complete blood count from female ICR (CD-1) mice and to establish reference intervals of hematological parameters and leukograms.

**Materials and methods.** Blood was collected from intact mice of ICR (CD-1) line (a total of 157 females mice aged 2–2.5 months, weighing  $20 \pm 2$  g) from the facial vein, and blood morphology parameters using an automatic hemanalyser and white cell count (differential count) with mandatory "manual" microscopy of the blood smear were analyzed.

**Results.** Reference intervals for complete blood count of female mice of ICR/CD-1 line were established for the first time. Their range was consistent with literature data reported in studies of female mice of other lines. However, differences in platelet counts were observed, which may be due to various reasons (blood sampling procedure, anesthesia use, test method, hematological analyzer used, etc.).

**Conclusion.** The reference intervals for blood morphology parameters in laboratory mice (female) of the ICR (CD-1) line were established for the first time. The data obtained are necessary for preclinical studies and for the purposes of biomodelling of typical pathological processes.

**Keywords:** complete blood count, ICR/CD-1 mice, reference interval, confidence interval, platelet indices, platelet large cell coefficient

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Важным в доклинических исследованиях является мониторинг изменений гематологических показателей, результаты которого дают ценную информацию об особенностях реактивных (временных, перераспределительных, функциональных) или патологических отклонений от гомеостатических констант организма. Информация о количественном и качественном составе клеточных элементов системы крови частично характеризует состояние динамичной системы, включающей органы кроветворения и кроверазрушения [1]. Установленный срок жизни эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов позволяет оценить длительность изменений состояния организма, а отклонение количественных показателей от среднепопуляционных норм – определить вид патологического процесса и наметить план терапевтических мероприятий.

Длительность жизни лабораторных мышей составляет 2–3 года, а скорость метаболизма и частота смены их поколений выше, чем у человека. Хорошо известна восприимчивость и способность к межвидовому переносу значительного количества заболеваний от людей к мышам и наоборот.

Одним из наиболее часто используемых исследовательских объектов в таких областях, как онкология, токсикология, иммунология, геронтология, тератология и др., являются аутбредные (нелинейные) лабораторные мыши линии ICR (International Cancer Research), или CD-1 [2, 3]. В связи с этим данная линия мышей становится самой востребованной в доклинических исследованиях.

Анализ источников научной литературы позволяет сделать вывод о недостаточной изученности референтных интервалов (РИ) гематологических показателей лабораторных мышей ICR (CD-1). Для разных их видов отмечают либо противоречивость результатов, либо значительный разброс полученных данных [2, 4–7], так как на значения показателей гематологического исследования крови влияют многочисленные переменные факторы: вид, пол, возраст, условия содержания в клетке, влияние окружающей среды, рацион, методика отбора пробы крови, использование анестезии, методика анализа, используемый гематологический анализатор и др. В связи с этим необходимым представляется выполнение рутинных внутрилабораторных проверок и регулярного сопоставления результатов с полученными ранее в динамике контроля РИ для цитогематологических показателей [5].



В клинической практике применяют два способа установления референтных интервалов. Прямой метод определения – формирование референтной группы с применением строгих правил включения и исключения, обследование и последующий расчет РИ. Это трудоемкий и дорогостоящий процесс для медицинских учреждений, а в доклинических исследованиях еще и противоречит нормам биоэтики, так как для установления РИ в каждой половой или возрастной группе требуется не менее 120 наблюдений. Второй подход – непрямой метод определения (ретроспективный) – позволяет использовать для определения референтного интервала результаты, ранее полученные в данной лаборатории за определенный период [8].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение стандартизированного массива данных оценки морфологического состава крови самок мышей линии ICR (CD-1) и установление референтных интервалов гематологических показателей и лейкограмм.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животных содержали в комнатах барьерного типа с контролируемыми условиями окружающей среды: температура 18–26 °С, относительная влажность 30–70%, 100% вентиляция. Особи находились в индивидуальных клетках по 8–10 голов на полноценной диете со свободным доступом к воде в виварии Института физиологии НАН Беларуси, соответствующего требованиям СанПиН 2.1.2.12-18-2006 [9].

Массив данных общего анализа крови формировали после обработки биологического материала от интактных самок аутбредных мышей линии CD-1 (n=157), отобранных для различных исследований или участвовавших в них, в период с ноября 2022 г. по апрель 2024 г. Это были половозрелые животные возрастом 2–2,5 месяца с массой тела  $20 \pm 2$  г, что составило не более 10% отклонения от средней массы тела. Ранее животные не подвергались никаким экспериментальным процедурам.

В правилах GLP (Good Laboratory Practices) особое внимание уделяется качеству используемых биологических тест-систем [10]. В список многочисленных стандартных и визуальных критериев отбора животных для содержания и выполнения экспериментов входит скрининговая оценка здоровья по общему морфологическому анализу крови. Поэтому перед процедурой подопытных приучали к рукам экспериментатора и обеспечивали минимизацию стресса во время пребывания в условиях взятия крови. Накануне животных лишали кормов на ночь, оставляя свободным доступ к воде. Благодаря простому и быстрому способу забора крови из поверхностной височной вены (superficial temporal vein) мышей удавалось практически безболезненно получить необходимый объем крови (50–100 мкл) для определения гематологических показателей, при этом жизнь животного сохраняется [11, 12].

Биоматериал (периферическая кровь) собирали самотеком с использованием верхнего края пробирки с K2 ЭДТА.

Гематологические показатели в цельной крови определяли на автоматических анализаторах: URIT VET3000 Plus (ветеринарная версия, URIT Medical Electronic Group Co., Ltd, Китай) и NIHON KOHDEN MEK-6410 (Nihon Kohden, Япония), где были рассчитаны следующие показатели (табл.1).

**Таблица 1**  
**Гематологические показатели, определяемые автоматическим анализатором URIT VET3000 Plus**  
**Table 1**  
**Haematological parameters determined by the automatic analyser URIT VET3000 Plus**

| Параметр | Ед. изм.             | Complete Blood Count                      | Показатели крови                                  |
|----------|----------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| WBC      | ×10 <sup>9</sup> /л  | White Blood Cells                         | Количество лейкоцитов                             |
| LYM#     | ×10 <sup>9</sup> /л  | Lymphocytes                               | Лимфоциты                                         |
| MID#     | ×10 <sup>9</sup> /л  | Medium cells                              | Средние клетки                                    |
| GRAN#    | ×10 <sup>9</sup> /л  | Granylocytes                              | Гранулоциты                                       |
| LYM%     | %                    | Lymphocytes                               | Лимфоциты                                         |
| MID%     | %                    | Medium cells                              | Средние клетки                                    |
| GRAN%    | %                    | Granylocytes                              | Гранулоциты                                       |
| RBC      | ×10 <sup>12</sup> /л | Red Blood Cells                           | Количество эритроцитов                            |
| HGB      | г/л                  | Hemoglobin                                | Гемоглобин                                        |
| HCT      | %                    | Hematocrit                                | Гематокрит                                        |
| MCV      | fl                   | Mean Cell Volume                          | Средний объем эритроцитов                         |
| MCH      | пг                   | Mean Corpuscular Hemoglobin               | Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците |
| MCHC     | г/л                  | Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration | Средняя концентрация гемоглобина в эритроците     |
| RDW-CV   | %                    | Red Distribution Width                    | Ширина распределения эритроцитов по объему        |
| RDW-SD   | fl                   | Red Distribution Width                    | Ширина распределения эритроцитов по объему        |
| PLT      | ×10 <sup>9</sup> /л  | Platelet                                  | Количество тромбоцитов                            |
| MPV      | fl                   | Mean Platelets Volume                     | Средний объем тромбоцитов                         |
| PDW      | fl                   | Platelet Distribution Width               | Ширина распределения тромбоцитов по объему        |
| PCT      | %                    | Plateletcrit                              | Тромбокрит                                        |
| P-LCR    | %                    | Platelet large cell ratio                 | Коэффициент крупных клеток тромбоцитов            |
| P-LCC    | ×10 <sup>9</sup> /л  | Platelet large cell coefficient           | Коэффициент крупных клеток тромбоцитов            |

С использованием гематологического автоанализатора были рассчитаны: лейкоцитарные индексы (WBC, LYM#, MID#, GRAN#, LYM%, MID%, GRAN%); эритроцитарные индексы (RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD); тромбоцитарные индексы (PLT, MPV, PDW, PCT, P-LCR, P-LCC).

Известно, что определение лейкоцитарной формулы – самая сложная задача исследования с применением гематологических анализаторов данного типа. В основе работы этих приборов лежит только кондуктометрический метод, и разделение лейкоцитов происходит только на три субпопуляции: лимфоциты (LYM% и LYM#), средние клетки (MID# и MID%) и гранулоциты (GRAN# и GRAN%), которые формируются в результате обработки лейкоцитов лизирующим раствором. К средним клеткам относят моноциты, эозинофилы и базофилы; субпопуляция гранулоцитов в основном представлена нейтрофилами [13]. В связи с этим оценка лейкограммы проводилась «ручным» микроскопическим методом (данные гемоанализатора не учитывали): для подсчета форменных элементов крови на окрашенных по Романовскому – Гимзе



мазках крови использовали микроскоп LEICA DM-2500 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия).

Статистический анализ проводили в программе Statistica.10.0. Для всех данных была применена описательная статистика: вид распределения определяли по критерию Шапиро – Уилка; подсчитали средние значения (Mean), медианы (Median), стандартные отклонения (SD), нижний и верхний квартили (LQ и UQ), которые вместе со значением  $n$ , минимальным (Min) и максимальным (Max) показателями представлены в итоговых таблицах со сведениями о референтных интервалах.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Массив данных ( $n=157$ ), полученный за 2022–2024 гг. от интактных самок мышей CD-1, был суммирован и подвергнут статистическому анализу (табл. 2, 3). Для составления РИ из массива были исключены статистические выбросы по методу Тьюки: в расчет не принимали данные, не входящие в интервал  $(Q1-1,5iQr) - (Q3+1,5iQr)$ , рассчитанный для каждого параметра, где  $Q1$  и  $Q3$  – границы 1-го и 3-го квартилей,  $iQR=Q3-Q1$  – межквартильный размах. Вид распределения устанавливали по критерию Шапиро – Уилка.

Представляли РИ для нормального распределения как  $Mean \pm 1,96SD$ . Также были определены и доверительные интервалы (ДИ), учитывая, что в настоящее время в зарубежной научной медицинской литературе для представления результатов исследования они используются очень широко, а в ряде изданий это является обязательным требованием [14, 15]. Как видно из табл. 4 и 5, оба интервала (РИ и ДИ) не имеют значимых различий.

**Таблица 2**  
**Показатели периферической крови интактных самок мышей ICR/CD-1 (возраст 2–2,5 мес.)**  
**Table 2**

**Peripheral blood parameters of intact female ICR/CD-1 mice (age 2–2.5 months)**

| Показатель | Ед                        | n   | Min   | Max   | Mean  | Median | SD    | Q1 (LQ) | Q3 (UQ) |
|------------|---------------------------|-----|-------|-------|-------|--------|-------|---------|---------|
| WBC        | $\times 10^9/\text{л}$    | 155 | 6,2   | 17,1  | 11,45 | 11,3   | 2,87  | 9,3     | 13,5    |
| RBC        | $\times 10^{12}/\text{л}$ | 156 | 8,1   | 11,64 | 9,8   | 9,8    | 0,64  | 9,37    | 10,25   |
| HGB        | г/л                       | 156 | 146   | 183   | 163   | 162    | 8,05  | 158     | 170     |
| HCT        | %                         | 157 | 50,4  | 67,3  | 59,05 | 58,9   | 3,35  | 56,8    | 61      |
| MCV        | fl                        | 157 | 52,1  | 67,1  | 60,34 | 60,7   | 2,80  | 58,5    | 62,2    |
| MCH        | пг                        | 157 | 14,5  | 19    | 16,68 | 16,7   | 0,90  | 16,1    | 17,3    |
| MCHC       | г/л                       | 157 | 260   | 293   | 276   | 275    | 7,64  | 270     | 282     |
| RDW_CV     | %                         | 157 | 10,2  | 13,4  | 11,73 | 11,6   | 0,77  | 11,2    | 12,3    |
| RDW_SD     | fl                        | 157 | 29,7  | 36,6  | 32,62 | 32,4   | 1,60  | 31,1    | 33,8    |
| PLT        | $\times 10^9/\text{л}$    | 155 | 883   | 1666  | 1176  | 1168   | 144,0 | 1069    | 1234    |
| MPV        | fl                        | 157 | 4     | 5,7   | 4,7   | 4,7    | 0,32  | 4,5     | 4,9     |
| PDW        | fl                        | 157 | 4,9   | 6,5   | 5,47  | 5,5    | 0,43  | 5,2     | 5,8     |
| PDW        | %                         | 157 | 14,21 | 18,85 | 15,84 | 15,95  | 1,24  | 15,08   | 16,82   |
| PCT        | %                         | 157 | 0,46  | 0,68  | 0,543 | 0,53   | 0,05  | 0,5     | 0,56    |
| P_LCR      | %                         | 157 | 0,8   | 5,2   | 2,05  | 1,8    | 1,03  | 1,3     | 2,5     |
| P_LCC      | $\times 10^9/\text{л}$    | 157 | 9     | 54    | 22,6  | 20     | 9,75  | 16      | 27      |

Таблица 3  
Лейкограмма интактных самок мышей ICR/CD-1 (возраст 2–2,5 мес.)  
Table 3  
Leukogram of intact female ICR/CD-1 mice (age 2–2.5 months)

| Показатель                 | Ед                  | n   | Min   | Max   | Mean  | Median | SD   | Q1 (LQ) | Q3 (UQ) |
|----------------------------|---------------------|-----|-------|-------|-------|--------|------|---------|---------|
| Лимфоциты                  | %                   | 157 | 49    | 87    | 67,3  | 68     | 8,53 | 61      | 73      |
|                            | ×10 <sup>9</sup> /л | 157 | 3,3   | 14,7  | 7,9   | 7,3    | 2,59 | 6,1     | 9,4     |
| Моноциты                   | %                   | 157 | 1     | 9     | 4,2   | 4      | 2,39 | 2       | 6       |
|                            | ×10 <sup>9</sup> /л | 157 | 0,07  | 1,17  | 0,51  | 0,44   | 0,30 | 0,24    | 0,74    |
| Нейтрофилы                 | %                   | 157 | 6     | 37    | 20,7  | 19     | 7,61 | 15      | 25      |
|                            | ×10 <sup>9</sup> /л | 157 | 0,74  | 4,39  | 2,35  | 2,28   | 0,88 | 1,63    | 2,93    |
| Сегментоядерные нейтрофилы | %                   | 157 | 5     | 32    | 17,6  | 17     | 7,25 | 12      | 23      |
|                            | ×10 <sup>9</sup> /л | 157 | 0,63  | 3,89  | 1,99  | 1,88   | 0,83 | 1,34    | 2,58    |
| Палочкоядерные нейтрофилы  | %                   | 157 | 1     | 7     | 3,17  | 3      | 1,74 | 2       | 4       |
|                            | ×10 <sup>9</sup> /л | 157 | 0,06  | 0,88  | 0,36  | 0,33   | 0,21 | 0,17    | 0,5     |
| Эозинофилы                 | %                   | 157 | 1     | 8     | 4,171 | 4      | 1,88 | 2,5     | 7,5     |
|                            | ×10 <sup>9</sup> /л | 157 | 0,071 | 0,98  | 0,483 | 0,485  | 0,24 | 0,306   | 0,66    |
| Базофилы                   | %                   | 157 | 0     | 1     | 0,03  | 0      | 0,17 | 0       | 0       |
|                            | ×10 <sup>9</sup> /л | 157 | 0     | 0,134 | 0     | 0      | 0,02 | 0       | 0       |

Выполнение исследования на автоматическом гематологическом анализаторе является более точным, чем с применением «ручного» метода. Но обращает на себя внимание отсутствие данных по всему спектру возможностей. Так, в настоящее время в справочных источниках РИ выделяют 5–8 основных, часто встречаемых показателей общего анализа крови лабораторных мышей: количество лейкоцитов

Таблица 4  
Диапазоны референтных и доверительных интервалов показателей морфологического состава периферической крови интактных самок мышей ICR/CD-1 (возраст 2–2,5 мес.)  
Table 4  
Reference and confidence intervals ranges for peripheral blood morphology parameters in intact female ICR/CD-1 mice (age 2–2.5 months)

| Показатель | Ед                   | Референтный интервал | Доверительный интервал |
|------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| WBC        | ×10 <sup>9</sup> /л  | 5,82–17,07           | 5,76–17,14             |
| RBC        | ×10 <sup>12</sup> /л | 8,56–11,07           | 8,54–11,08             |
| HGB        | г/л                  | 146,7–179,2          | 147–179                |
| HCT        | %                    | 52,5–65,6            | 52,4–65,7              |
| MCV        | fl                   | 54,9–65,8            | 54,8–65,9              |
| MCH        | пг                   | 14,9–18,4            | 14,9–18,4              |
| MCHC       | г/л                  | 261–291              | 261–291                |
| RDW_CV     | %                    | 10,2–13,2            | 10,2–13,3              |
| RDW_SD     | fl                   | 29,5–35,7            | 29,5–35,8              |
| PLT        | ×10 <sup>9</sup> /л  | 893,5–1458           | 890–1462               |
| MPV        | fl                   | 4,1–5,3              | 4,1–5,4                |
| PDW        | fl                   | 4,6–6,3              | 4,6–6,3                |
| PDW        | %                    | 13,4–18,3            | 13,38–18,31            |
| PCT        | %                    | 0,44–0,65            | 0,44–0,65              |
| P_LCR      | %                    | 0,0–4,1              | 0,0–4,1                |
| P_LCC      | ×10 <sup>9</sup> /л  | 3,5–41,7             | 3,3–41,9               |



**Таблица 5**

**Диапазоны референтных и доверительных интервалов показателей лейкограммы intactных самок мышей ICR/CD-1 (возраст 2–2,5 мес.)**

**Table 5**

**Reference and confidence intervals ranges for leukogram of intact female ICR/CD-1 mice (age 2–2.5 months)**

| Показатель                 | Ед                     | Референтный интервал | Доверительный интервал |
|----------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Лимфоциты                  | %                      | 50,5–84,00           | 50,4–84,0              |
|                            | $\times 10^9/\text{л}$ | 2,8–13,0             | 2,8–13,0               |
| Моноциты                   | %                      | 0–9,0                | 0–9,0                  |
|                            | $\times 10^9/\text{л}$ | 0–1,10               | 0–1,11                 |
| Нейтрофилы                 | %                      | 5,8–35,7             | 5,7–35,9               |
|                            | $\times 10^9/\text{л}$ | 0,6–4,09             | 0,6–4,1                |
| Сегментоядерные нейтрофилы | %                      | 3,4–31,8             | 3,2–32                 |
|                            | $\times 10^9/\text{л}$ | 0,30–3,60            | 0,33–3,65              |
| Палочкоядерные нейтрофилы  | %                      | 0–6,6                | 0–6,6                  |
|                            | $\times 10^9/\text{л}$ | 0–0,79               | 0–0,79                 |
| Эозинофилы                 | %                      | 0,49–7,85            | 0,45–7,89              |
|                            | $\times 10^9/\text{л}$ | 0–0,96               | 0–0,96                 |
| Базофилы                   | %                      | 0–0,38               | 0–0,38                 |
|                            | $\times 10^9/\text{л}$ | 0–0,04               | 0–0,04                 |

(WBC), количество эритроцитов (RBC), уровень гемоглобина (Hb), гематокрит (HCT), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC), тромбоциты (PLT). В то же время такие цитогематологические показатели лабораторных мышей, как ширина распределения эритроцитов по объему (RDW\_CV (%), RDW\_SD (фл)), средний объем тромбоцитов (MPV), ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW (% и фл)), тромбоцит (PCT), коэффициент крупных клеток тромбоцитов (P\_LCR (%) и P\_LCC ( $\times 10^9/\text{л}$ )), отсутствуют. Это свидетельствует о том, что значимость данных показателей ранее не была учтена.

При проведении анализа морфологического состава крови «вручную» обращали внимание на размер, цвет и форму кровяных телец. По отклонению формы и размера клеток от нормального судили о пойкилоцитозе и анизоцитозе. В зависимости от того, какие форменные элементы крови изменили свой размер, различали анизоцитоз эритроцитов (RDW) или анизоцитоз тромбоцитов (PDW).

Для обозначения степени гетерогенности эритроцитов определяли индекс RDW (ширина распределения красных клеток), известный также как индекс анизоцитоза эритроцитов. Если RDW демонстрировал неоднородность размеров популяций эритроцитов в исследуемых образцах, то выделяли два типа показателей – RDW-CV и RDW-SD. RDW-CV – степень отклонения размера эритроцитов от нормального, а RDW-SD – разница между самым большим и самым маленьким эритроцитом в образцах крови. В нашем исследовании для данных показателей были установлены РИ у лабораторных мышей: RDW-CV=10,2–13,2% и RDW-SD=29,5–35,7 фл.

Ширина распределения тромбоцитов (PDW) отражает изменчивость размера тромбоцитов и считается маркером функции и активации тромбоцитов, играющих ключевую роль в процессе свертывания крови. В норме между формами тромбоцитов

существует определенный баланс, однако его нарушение является признаком той или иной патологии [16]. Для показателей гетерогенности популяции тромбоцитов и ширины их распределения у лабораторных мышей установлены РИ:  $PDW=4,6-6,3$  фл и  $PDW=13,4-18,3\%$ .

Средний объем тромбоцитов как показатель, отражающий средний объем всех исследуемых форм (MPV), практически не учитывается в интерпретации общего анализа крови. Однако данный показатель помогает выявить различные нарушения и состояния в функционировании тромбоцитов, например повышенную агрегацию тромбоцитов и даже тромбозы; при обнаружении еще крупных тромбоцитов (P\_LCR) – активную кровопотерю у пациентов с железодефицитной анемией [17]. Высокие значения PDW и MPV характерны для хронических миелопролиферативных заболеваний [18], при сахарном диабете и туберкулезе [19]. РИ для данного показателя у лабораторных мышей, находящихся в физиологической норме, составлял  $MPV=4,1-5,3$  фл.

Референтный интервал для относительно нового показателя, отражающего количество тромбоцитов и их размеры, – тромбокрита у мышей – составил  $PCT=0,44-0,65\%$ .

Практически не используемые в диагностике P-LCC (Platelet large cell coefficient,  $\times 10^9/\text{л}$ ) и P-LCR (Platelet large cell ratio, %) позволяют оценить количество и относительный объем крупных тромбоцитов. Для лабораторных мышей установили РИ показателей этого теста:  $P\_LCR=0,0-4,1\%$  и  $P\_LCC=3,5-41,7 \times 10^9/\text{л}$ . В настоящее время P-LCC рассматривают как маркер активации тромбоцитарного звена гемостаза при ишемической болезни сердца или ишемическом инсульте [20, 21]. Потенциал диагностической значимости всех исследованных показателей еще предстоит раскрыть.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые определены референтные интервалы для гематологических показателей самок лабораторных мышей линии ICR/CD-1, а также дополнены сведения о таких показателях, как ширина распределения эритроцитов по объему, средний объем тромбоцитов, ширина распределения тромбоцитов по объему, тромбокрит, коэффициент крупных клеток тромбоцитов.

Установленные референтные и доверительные интервалы гематологических показателей будут полезны в интерпретации и оценке результатов общего (морфологического) анализа крови в ходе проведения научных и доклинических исследований, включая биомоделирование опухолевых и иных процессов, имеющих большое социально-экономическое значение.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Stempen T.P., Lelevich S.V. (2016) *Clinical laboratory hematology*. Grodno: GrSMU. (in Russian)
2. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., et al. (1983) *Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in experiments*. Kiev: Vyscha shkola. (in Russian)
3. Kim J.E., Nam J.H., Cho J.Y., et al. Annual tendency of research papers used ICR mice as experimental animals in biomedical research fields. *Lab Anim Res*. 2017 Jun;33(2):171–178. doi: 10.5625/lar.2017.33.2.171
4. Kravchenko I.N., Khokhlova O.N., et al. Hematologic parameters of pathogen-free CD rats (SPRAGUE DAWLEY) and CD 1 mice in normal. *Journal Biomed*. 2008;1(2):20–30. (in Russian)
5. Sorokina A.V., Alekseeva S.V., et al. Summary of Clinical Laboratory Studies Performed During Preclinical Safety Evaluation of Medicinal Products (Part I: Haematological Studies). *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(3):197–206. doi: 10.30895/1991-2919-2019-9-3-197-206 (in Russian)

6. Ermakova A.V., Kudyasheva A.G. Variability of hematological parameters in different species of laboratory mice. *Proceedings of the Komi Science Centre of the Ural Division of the Russian Academy of Sciences*. 2021;5:13–19. doi: 10.19110/1994-5655-2021-5-13-19 (in Russian)
7. Yushkov B.G., Korneva E.A., Chereshev V.A. (2021) *The concept of norm in physiology and pathophysiology. Physiological constants of laboratory animals*. Ekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. (in Russian)
8. Evgina S.A., Savelliev L.I. Current theory and practice of reference interval. *Laboratory Service*. 2019;8(2):36–44. doi: 10.17116/labs2019802136 (in Russian)
9. Sanitary rules and regulations 2.1.2.12-18-2006 "Design, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)" (Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus, dated October 31, 2006, №. 131) (in Russian)
10. Semakova A.P., Germanchuk V.G., Shavina N.Yu. Modern approach to assessing quality of laboratory animals used for experimental purposes. *Public Health and Life Environment*. 2021;(2):84–90. doi: 10.35627/2219-5238/2021-332-2-84-90 (in Russian)
11. How to obtain blood samples from the facial vein of a mouse? Available at: <https://www.youtube.com/watch?v=niTVnEAHOk0>
12. Animal Lancets – Medipoint. Available at: <https://medipoint.com/goldenrod-animal-lancets/for-use-on-mice>
13. Kravchenko I.N., Rzhnevsky D.I., Pahomova I.A., et al. Use of automated blood analysis results in toxicological studies on rodents. *Journal of New Medical Technologies*. 2012;19(3):88–90. (in Russian)
14. Schober P, Vetter T.R. Confidence Intervals in Clinical Research. *Anesth Analg*. 2020 May;130(5):1303. doi: 10.1213/ANE.0000000000004731
15. Attia A.M. EVIDENCE-BASED MEDICINE CORNER: Why should researchers report the confidence interval in modern research? *Middle East Fertility Society Journal*. 2005;10(1):78.
16. Tzur I., Barchel D., et al. Platelet distribution width: a novel prognostic marker in an internal medicine ward. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2019 Dec 14;9(6):464–470. doi: 10.1080/20009666.2019.1688095
17. Deshmukh A.V., et al. Significance of platelet parameters in cases of iron deficiency anemia with reference to thromboembolic complications – A study in central India. *Saudi Journal for Health Sciences*. 2021;10(3):165–169. doi: 10.4103/sjhs.sjhs\_132\_21
18. Li M., Bai J., Wang S., et al. Mean platelet volume and platelet distribution width serve as prognostic biomarkers in skull base chordoma: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2020;20: 988. doi: 10.1186/s12885-020-07497-7
19. Xu F., Qu S., et al. Mean platelet volume (MPV): new diagnostic indices for co-morbidity of tuberculosis and diabetes mellitus. *BMC Infect Dis*. 2021 May 20;21(1):461. doi: 10.1186/s12879-021-06152-1
20. Dorn O.Y., Tsikalenko E.A., Stepanova E.G., et al. PLCC indicator as laboratory marker activation of thrombocytic hemostasis at patients with coronary heart disease. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2015;(1):22. (in Russian)
21. Mykhailenko O.Y., Zhulkevych I. V. Thrombocytogram parameters in patients of early recovery period of ischemic stroke. *Achievements of Clinical and Experimental Medicine*. 2021;(2):108–112. doi: 10.11603/1811-2471.2021.v.i2.12211 (in Ukrainian)



Жигалова К.Н.<sup>1</sup>, Кротова М.М.<sup>1</sup>, Денисов П.А.<sup>1</sup>✉, Припутневич Т.В.<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

## Развитие «быстрой» медицинской микробиологии за последние 10 лет: обзор

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** написание текста – Жигалова К.Н., Кротова М.М., Денисов П.А.; концепция, редактирование – Припутневич Т.В.

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-65-00015 «Экспресс-определение антибиотикорезистентности бактерий в биологических образцах с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния».

Подана: 18.05.2025

Принята: 20.08.2025

Контакты: [pa\\_denisov@oparina4.ru](mailto:pa_denisov@oparina4.ru)

### Резюме

За последнее десятилетие медицинская микробиология претерпела радикальные изменения на всех этапах лабораторной работы и превратилась в «быструю» дисциплину. В обзоре освещаются ключевые технологические достижения, интегрированные в рутинную практику: секвенирование следующего поколения, ПЦР в реальном времени и MALDI-TOF масс-спектрометрия, которые существенно ускоряют идентификацию возбудителей и определение их резистентности. Иммунохроматографические экспресс-тесты позволили ставить диагнозы за считанные часы, тогда как рамановская спектроскопия рассматривается как перспективный инструмент для быстрой идентификации микроорганизмов и мониторинга устойчивости к антибиотикам. В статье обсуждаются современные подходы к цифровизации лабораторий, внедрению искусственного интеллекта и интеграции данных, что способствует улучшению эпиднадзора и принятию клинических решений. Подчеркивается необходимость реструктуризации лабораторной инфраструктуры, повышения квалификации персонала и междисциплинарного взаимодействия для борьбы с ростом антибиотикорезистентности.

**Ключевые слова:** медицинская микробиология, быстрая микробиология, микробиологические исследования, лабораторная диагностика, антибиотикорезистентность

Zhigalova K.<sup>1</sup>, Krotova M.<sup>1</sup>, Denisov P.<sup>1</sup>✉, Priputnevich T.<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

## Development of "Fast" Medical Microbiology over the Past 10 Years: A Review

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** text writing – Zhigalova K., Krotova M., Denisov P.; concept, editing – Priputnevich T.

**Funding:** the study was supported by the grant of the Russian Science Foundation No. 24-65-00015 "Rapid determination of antibiotic resistance of bacteria in biological samples using giant Raman spectroscopy".

Submitted: 18.05.2025

Accepted: 20.08.2025

Contacts: pa\_denisov@oparina4.ru

### Abstract

Over the past decade, medical microbiology has undergone radical changes at all stages of laboratory work and has become a "fast" discipline. The review highlights key technological advances integrated into routine practice: next-generation sequencing, real-time PCR, and MALDI-TOF mass spectrometry, which substantially accelerate the identification of pathogens and determination of their resistance. Immunochromatographic rapid tests enable making diagnoses within a few hours, while Raman spectroscopy is considered a promising tool for rapid identification of microorganisms and monitoring of antibiotic resistance. The article discusses modern approaches to digitalizing laboratories, implementing artificial intelligence, and data integration, which contribute to improved epidemiological surveillance and clinical decision-making. The need for restructuring in laboratory infrastructure, improving staff qualifications, and promoting interdisciplinary cooperation to counter the rise of antibiotic resistance is emphasized.

**Keywords:** medical microbiology, fast microbiology, microbiological research, laboratory diagnostics, antibiotic resistance

### ■ ВВЕДЕНИЕ

Медицинская микробиология как наука существует уже более двух столетий, однако за последние 10 лет ее парадигма кардинально изменилась. Значительные трансформации затронули организацию работы микробиологических лабораторий на всех этапах – преаналитическом, аналитическом и постаналитическом – что требует отражения самых значимых достижений в совокупности изменений во всей лабораторной цепочке.

Микробиологическое исследование – это сложный и многопроцессный механизм, подверженный риску ошибок. Ввиду того, что ранее факторы, приводящие к получению недостоверных данных, часто не контролировались и не учитывались, необходимо внедрять меры, позволяющие минимизировать влияние подобных факторов [2].

Внедрение в рутинную практику таких инновационных методов, как секвенирование следующего поколения, ПЦР в реальном времени и MALDI-TOF масс-спектрометрия, заметно расширило диапазон возможностей микробиологических исследований. Иммунохроматографические экспресс-тесты позволяют быстро ставить диагнозы при различных инфекциях, а рамановская спектроскопия рассматривается как перспективное средство идентификации микроорганизмов и мониторинга антибиотикорезистентности. В настоящее время активно развиваются и внедряются цифровизация лабораторий, искусственный интеллект и интеграция данных, что создает новые возможности для анализа и принятия клинических решений. Усилия по реструктуризации и консолидации микробиологических лабораторий открывают перспективы для устойчивого развития отрасли [1].

## ■ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

Известно, что преаналитические ошибки составляют около 60–70% всех лабораторных ошибок. Это связано с несоблюдением необходимых взаимосвязанных действий как пациента, так и медицинского персонала, происходящих за пределами лаборатории, и ручной обработкой образцов на этом этапе [3]. Преаналитический этап включает в себя ряд рабочих процессов: назначение исследования врачом, подготовка пациента к исследованию, взятие биоматериала, его транспортировка в лабораторию, пробоподготовка. В этой цепочке участвуют врачи, средний и младший медицинский персонал, администраторы, координаторы и персонал, доставляющий образцы биоматериала в лабораторию. Ошибки на любом этапе этого сложного замкнутого цикла могут влиять на результаты микробиологических исследований, что в итоге может привести к постановке неверного диагноза пациенту и необоснованному использованию противомикробных препаратов.

Исследования подтвердили, что дополнительное обучение персонала и налаженная связь между участниками процесса эффективны для оптимизации преаналитического этапа [4]. С этой целью в настоящее время разрабатываются, совершенствуются и активно внедряются в работу лабораторные информационные системы (ЛИС) и электронные медицинские карты (ЭМК), что позволяет налаживать качественное взаимодействие между микробиологами и врачами-клиницистами [5], помогает обеспечивать правильные назначения микробиологических исследований, предотвращает использование лишних диагностических тестов у пациентов без симптомов инфекции [6].

## ■ АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

Аналитический этап в медицинской микробиологии за последнее десятилетие претерпел значительные изменения, а термин «быстрая микробиология» прочно вошел в наш лексикон. Новые возможности позволяют выполнять большой объем исследований за короткий срок, получать быстрые и точные результаты. Ряд исследований показали, что внедрение новых микробиологических технологий в значительной степени влияет на клинические результаты [7, 8].

### **MALDI-TOF масс-спектрометрия**

Традиционная микробиологическая диагностика с использованием биохимической видовой идентификации бактериальных изолятов занимает не менее 24–48 ч.

Поэтому пациентам часто, не дожидаясь результата исследования, назначают эмпирическую антибиотикотерапию, которая не всегда обоснована. Лабораториям медицинской микробиологии необходимы быстрые, надежные и экономически эффективные методы идентификации потенциальных патогенов в клинических образцах, чтобы как можно раньше начать соответствующую антимикробную терапию пациенту [9].

Самым значимым достижением в медицинской микробиологии является внедрение матрично-активированной лазерной десорбционной ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) для идентификации микроорганизмов. Успех MALDI-TOF масс-спектрометрии обусловлен тем, что идентификация микроорганизмов выполняется в разы быстрее, точнее и дешевле, чем стандартные фенотипические или генотипические методы. Масс-спектральный анализ каждого микроорганизма уникален, как отпечаток пальца [10].

Масс-спектрометр включает в себя источник для генерации ионов из пробы, один или несколько масс-анализаторов для разделения ионов, детектор для регистрации количества ионов и компьютер для обработки данных, на основе которых пользователь получает информацию о микроорганизме [11].

Образец для анализа с помощью MALDI MS готовят путем смешивания или покрытия его раствором энергопоглощающего органического соединения, называемого матрицей. При высыхании матрица и заключенный в матрицу образец кристаллизуются, а затем в автоматическом режиме подвергаются ионизации лазерным лучом. Десорбция и ионизация лазерным лучом приводит к образованию из аналитов протонированных ионов, которые ускоряются при фиксированном потенциале и отделяются друг от друга на основе отношения массы к заряду ( $m/z$ ). Заряженные аналиты измеряют с использованием различных типов масс-анализаторов. Для медицинских микробиологических лабораторий в основном используются масс-анализаторы TOF [12].

Важной особенностью MALDI-TOF MS является то, что помимо идентификации бактерий ее можно использовать для обнаружения микробных токсинов [13], изучения устойчивости к антибиотикам [14, 15], обнаружения вирусов [16], паразитов [17], грибов [18], а также для изучения клеток человека и растений [11].

MALDI-TOF MS – надежный метод, оснащенный компьютеризованной технологией обработки данных, внедрен в микробиологических лабораториях для замены или дополнения традиционной фенотипической идентификации бактерий и грибов. MALDI-TOF MS позволяет сократить время анализа в среднем на 1,45 суток по сравнению с традиционными методами идентификации. Автоматизация ручного процесса уменьшает количество возможных ошибок за счет исключения этапов ручной подготовки и обеспечивает полный контроль рабочего процесса идентификации [19].

В эпоху растущей устойчивости к противомикробным препаратам быстрое обнаружение и идентификация бактерий с определением чувствительности к противомикробным препаратам имеют решающее значение для таргетной терапии на ранних стадиях заболевания. Устойчивость к ряду антибиотиков, принадлежащих к различным классам, успешно протестирована с помощью MALDI-TOF MS на различных клинически значимых видах бактерий, включая представителей семейства Enterobacteriaceae, неферментирующие грамотрицательные бактерии, грамположительные бактерии, облигатно-анаэробные бактерии и микобактерии, открывая эту

область для дальнейших клинически важных разработок. Раннее выявление лекарственной устойчивости с помощью MALDI-TOF MS может стать особенно полезным клиницистам для оптимизации терапии антибиотиками, улучшения исходов у пациентов с системной инфекцией, когда быстрое и эффективное лечение антибиотиками необходимо для сохранения функций органов или выживания пациента [20].

Идентификация дрожжей и плесневых грибов исторически основывалась на сочетании фенотипических и морфологических характеристик. Преимущества MALDI-TOF MS для идентификации дрожжей по сравнению с фенотипическими платформами очевидны. Точная идентификация дрожжей и плесневых грибов на видовом уровне вполне достижима с помощью MALDI-TOF MS. Проведенные исследования показывают, что MALDI-TOF MS можно использовать и для выявления устойчивости дрожжей к противогрибковым препаратам, однако в случае идентификации плесневых грибов в клинической практике к единому мнению пока не пришли [20]. Современные протоколы подготовки образцов плесневых грибов различаются между производителями платформ MALDI-TOF MS и поставщиками библиотек данных.

Вирусы традиционно выявляли с помощью клеточной культуры, которая, хотя и считается «золотым стандартом», часто требовала несколько суток или даже недель, прежде чем были получены окончательные результаты. Позже на смену пришли менее чувствительные иммунологические методы, основанные на анализе антител (иммуноанализ, или иммунофлуоресценция), а также более чувствительные молекулярные методы, основанные на ПЦР и дот-блоттинге. Использование MALDI-TOF MS в области вирусологии продвинулось меньше, чем в бактериологии и микологии. Это может быть следствием относительно низкого содержания белка в вирусах [21], более высокой молекулярной массы вирусных белков (>20 000 Да) и возможного переноса остатков клеточного субстрата, в котором вирусы культивируются *in vitro*. Тем не менее некоторые исследователи доказали эффективность MALDI-TOF MS для выявления различных вирусов в клинических образцах, таких как вирусы гриппа, энтеровирусы, вирусы папилломы человека, вирус герпеса, вирус гепатита и другие [22–24].

MALDI-TOF MS в последние годы показала потенциальную эффективность для идентификации простейших, гельминтов и членистоногих. Применение технологии MALDI-TOF MS в клинической диагностике паразитов человека сейчас находится на стадии становления, в большей степени из-за отсутствия баз данных [25]. Необходимо провести более глубокие исследования, прежде чем расширить применение MALDI-TOF MS для рутинной идентификации паразитов, поскольку использование особых жидких питательных сред для выращивания простейших кишечника мешает созданию специфических белковых профилей для их идентификации. В недавнем исследовании метод MALDI-TOF MS использовался для потенциального обнаружения и количественной оценки *Plasmodium falciparum* в крови человека, но для практического применения данной методики требуется доработка [26].

### **Полимеразная цепная реакция**

ПЦР представляет собой простую химическую реакцию *in vitro*, которая позволяет синтезировать практически неограниченные количества целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Это достигается за счет действия ДНК-полимеразы, которая при определенных условиях может копировать цепь ДНК. В простейшем

случае реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции состоит из ДНК-мишени, двух олигонуклеотидных праймеров, взятых в избытке, термостабильной ДНК-полимеразы, эквимольной смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ; дАТФ, дЦТФ, дГТФ и дТТФ),  $MgCl_2$ , KCl и буфера Tris-HCl. Два праймера фланкируют амплифицируемую последовательность двухцепочечной ДНК (дцДНК), обычно от <100 до нескольких сотен оснований, и комплементарны противоположным цепям мишени [27].

ПЦР основана на многократном реплицировании специфического участка нуклеотидной последовательности, катализируемого ДНК-полимеразой, и работе праймера – фрагмента ДНК, несущего специфичную для конкретного микроорганизма нуклеотидную последовательность гена (или участка гена). С помощью праймера обнаруживается фрагмент идентифицируемого микроорганизма. ДНК-полимераза, полученная из грамотрицательной палочковидной экстремально термофильной бактерии *Thermus aquaticus*, также известна как Taq-полимераза (термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus*). Taq-полимераза обладает термостабильными свойствами, предотвращающими необратимое изменение физических и химических свойств ДНК или РНК, что делает ее идеальной для высокочувствительной процедуры полимеразной цепной реакции при диагностике широкого спектра бактериальных и вирусных инфекций, а также для скрининга генетических заболеваний [28].

ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR – реал-тайм ПЦР) является одним из самых мощных молекулярных подходов и широко используется в биологических науках и медицине, так как является высокочувствительным, точным и быстрым диагностическим методом [29].

ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР, кПЦР) в настоящее время является хорошо зарекомендовавшим себя методом обнаружения, количественного определения и типирования различных микробных агентов. Основные преимущества кПЦР заключаются в том, что данный метод обеспечивает быстрое и высокопроизводительное обнаружение и количественную оценку целевых последовательностей ДНК в различных матрицах. Количество ПЦР-продукта измеряется в каждом цикле кПЦР с помощью флуоресцентных меток. Более того, кПЦР безопаснее с точки зрения предотвращения перекрестного загрязнения, поскольку после амплификации не требуется никаких дальнейших манипуляций с образцами [30].

Используется кПЦР не только для обнаружения целевой нуклеотидной последовательности в образце биоматериала и измерения количества ее копий, но и для определения специфических генов и аллелей, например, при типировании штаммов микроорганизмов, выявлении маркеров резистентности к противомикробным препаратам, обнаружении токсигенных штаммов и т. д. Однако само наличие генов, ответственных за устойчивость к противомикробным соединениям или выработку грибковых токсинов, не означает автоматически их экспрессию или продукцию. И хотя тесты типирования на основе кПЦР выполняются быстрее, их результаты следует коррелировать с фенотипическими и биохимическими тестами.

Быстрое обнаружение микробных патогенов с помощью кПЦР позволяет врачам оперативно назначать индивидуальное лечение, тем самым сокращая количество госпитализаций и предотвращая необоснованное применение антимикробных препаратов [28].

Благодаря высокой чувствительности, специфичности и скорости выполнения, метод кПЦР является незаменимым инструментом в диагностике таких быстро развивающихся заболеваний, как менингит, сепсис и воспалительные заболевания кишечника, поскольку помогает выявить возбудителя на ранних стадиях и назначить адекватное лечение. Кроме того, данный метод может помочь в отслеживании источника заболевания, что, в свою очередь, позволяет контролировать существующие и потенциальные вспышки [31].

Другие преимущества кПЦР включают широкий динамический диапазон количественного определения и мультиплексирование амплификации нескольких мишеней в одну реакцию. С помощью мультиплексирования появляется возможность детектировать одновременно несколько патогенов, что уменьшает себестоимость тестирования [30].

Панели мультиплексной ПЦР коммерчески доступны для выявления патогенов из разных локусов, включая верхние и нижние дыхательные пути, кровь, кал, брюшную полость и мочеполовые пути. Эти панели включают в себя несколько организмов-мишеней, общих для конкретного инфекционного синдрома, что позволяет осуществлять быстрое обнаружение микроорганизма, вызывающего заболевание, а следовательно, снижает риск ошибки при назначении лечения [6].

### **Иммунохроматографические (ИХ) тест-системы**

Иммунохроматографические тест-системы на основе иммуноферментного анализа с латеральным потоком (lateral flow immunoassay, LFIA) уже несколько десятков лет широко используются для быстрого обнаружения молекул-мишеней (лигандов) в биосубстратах и диагностики различных заболеваний и состояний. Эти устройства рассматриваются в качестве упрощенных моделей современных биосенсоров, где элемент распознавания располагается на поверхности пористой мембраны, и результат реакции визуализируется через несколько минут [32].

Первым экспресс-тестом, сконструированным на парафиновой бумаге, является тест для определения инсулина в плазме крови человека [33]. Технология создания и использования подобных экспресс-тестов стала прорывной для лабораторной диагностики многих состояний и заболеваний. За многие годы применения данного метода тест-системы стали более доступными и простыми в использовании, приобрели высокую аналитическую чувствительность и специфичность.

Появление и совершенствование методики LFIA привело к становлению глобальной концепции «point-of-care testing» (тестирование в месте оказания медицинской помощи) [34].

Потенциалом появления подобных эффективных технологий является постоянное развитие и совершенствование многочисленных LFIA-платформ, разработка мультиплексных форматов, повышение уровня сложности диагностических задач. Отсутствие необходимости специальных температурных условий хранения значительно расширяет ареал их применения в развивающихся странах, малонаселенных и отдаленных регионах [35].

Стандартные ИХ тест-системы состоят из пластикового основания с нанесенными слоями пористых мембран, содержащих молекулы распознавания для взаимодействия с молекулой-мишенью. Одной из важнейших составляющих тест-системы является пористая мембрана из нитроцеллюлозы, у которой размер

диаметра пор варьируется от 0,05 до 12 мкм. Пористость мембраны обеспечивает важнейшие свойства, влияющие на качество тест-систем: скорость, время и однородность капиллярного потока [36].

Анализируемый жидкий образец наносят на прокладку, которая выполняет роль фильтра, задерживая нежелательные элементы исследуемого биосубстрата. По мере движения пробы по прокладке высвобождается конъюгат со специфическими антителами, которые связываются с целевым анализом и перемещаются в зону распознавания. В этой части тест-системы происходит дальнейшая реакция с комплексом анализит – антитело, которая сопровождается образованием цветных линий в тестовой и контрольной зонах. Интенсивность цвета тестовой линии, которая пропорциональна содержанию анализа в образце, оценивается визуально или при помощи специального оборудования.

Современные мультитиплексные тест-системы LFIA способны детектировать сразу несколько анализитов в одной пробе. В данном случае система имеет несколько прокладок для высвобождения конъюгата, содержащих специфические антитела для каждого целевого анализа, и столько же тестовых зон для считывания результата [37].

Экспресс-тесты на основе LFIA активно используются в медицинской микробиологии для идентификации различных возбудителей заболеваний. Так, в недавнем исследовании сообщается о применении нового иммунохроматографического теста для выявления инфекции, ассоциированной с *Neisseria gonorrhoeae*, у пациентов в Южной Америке [38]. Используемый экспресс-тест показал высокий уровень чувствительности и специфичности у пациентов с симптомами гонококковой инфекции и может стать важным инструментом оптимизации диагностики урогенитальных инфекций и сокращения избыточного использования антимикробных препаратов.

Иммунохроматографические экспресс-тесты часто применяются для дифференциации бактериальных и острых вирусных инфекций дыхательных путей [39, 40].

Пандемия COVID-19 (COronaVirus Disease 2019) привела к значительному росту спроса на эффективные диагностические экспресс-тесты, которые применяются для быстрого выявления инфицированных лиц. Использование иммунохроматографических тест-систем для обнаружения антител к коронавирусу-2, вызывающему тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus), сыграло важнейшую роль в борьбе с заболеванием, особенно в районах с ограниченными ресурсами. Разработанные тест-системы отличаются доступностью и простотой использования, поэтому получили широкое применение в программах массового скрининга для эффективного сдерживания передачи COVID-19 [41].

### **Автоматизированные бактериологические анализаторы**

За последнее время наблюдается эволюция автоматизированных систем идентификации микроорганизмов и тестирования чувствительности к антимикробным препаратам. Такие платформы в настоящее время состоят из персонального компьютера, считывающего устройства/инкубатора и интеллектуальной составляющей, поддерживающей множество интеллектуальных функций. В некоторых системах присутствует модуль подготовки образцов, который стандартизирует посевной материал и идентифицирует образец с помощью этикетки со штрихкодом перед загрузкой кассет. Существует несколько доступных систем в зависимости от желаемого

размера прибора и объема исследований. Разработаны карты для идентификации анаэробов и коринеформных бактерий; дрожжевых грибов; видов *Neisseria*, *Haemophilus* и других прихотливых микроорганизмов; грамположительных микроорганизмов; грамотрицательных микроорганизмов (*Enterobacterales* spp., non-*Enterobacterales* spp. и высокопатогенных микроорганизмов, таких как возбудители бруцеллеза и туляремии – виды родов *Brucella* и *Francisella*). Примерами таких платформ являются системы Vitek 2 (продукция фирмы bioMérieux, Франция), Phoenix (продукция фирмы Becton Dickinson, США), Trek Diagnostic System Sensititre (продукция фирмы Thermo Fisher Scientific, США). Традиционно микробиологическая диагностика с использованием биохимической видовой идентификации бактериальных изолятов занимает не менее 24–48 ч. Такие панели содержат биохимические субстраты для идентификации микроорганизмов и определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотиков методом микроразведений в бульоне. Результаты можно считывать визуально и автоматически.

Кроме того, разработаны «быстрые» тест-панели, в которых используются флуорогенные субстраты или флуорогенные индикаторы для обнаружения изменений pH при появлении специфических микробных метаболитов. «Быстрые» тест-системы обеспечивают идентификацию микроорганизмов уже через 2–2,5 часа, а результаты определения МПК методом микроразведений в бульоне могут быть получены через 4,5–16–18 часов [42].

В настоящее время возможно проведение цифровой обработки изображений, которая автоматизирует процесс считывания и интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам диско-диффузионным методом, а также результатов идентификации микроорганизмов и тестирования чувствительности к антибиотикам с помощью коммерческих наборов и тест-систем, выполняемых в ручном режиме. Существуют приборы, которые автоматически считывают МПК при постановке Е-тестов (тест-полосок для определения МПК градиентным методом) и при использовании панелей для определения МПК методом микроразведений в бульоне. Примером является микробиологический анализатор BIOMIC V3, продукция фирмы Giles Scientific, США [43].

### **Рамановская спектроскопия**

Все вышеперечисленные методы имеют свои преимущества и недостатки. Для сокращения времени, необходимого для идентификации микроорганизмов, предложено много подходов, которые позволяют, минуя этап культивирования, определять видовую принадлежность возбудителя и его чувствительность к антибиотикам.

Данные методы ориентированы на уменьшение времени анализа, количества расходных материалов, необходимых для идентификации, автоматизацию процесса и/или возможность получения дополнительной информации о возбудителе (например, факторах вирулентности). Необходимо учитывать, что постоянно обнаруживаются микроорганизмы с неизвестными механизмами устойчивости к антибиотикам, что требует выявления молекулярных основ, связанных с этими механизмами, и изучения кодирующих их генов. В то же время в клинической практике невозможно охватить их все и получить стопроцентно верный результат. Перспективным инструментом для разработки такого метода экспресс-оценки является рамановская спектроскопия, позволяющая получать информацию о концентрации компонентов

в сложной смеси по интенсивности их характерного спектра [44]. Рамановская спектроскопия (Raman spectroscopy), или спектроскопия комбинационного рассеяния, имеет ряд преимуществ по сравнению с другими аналитическими методами: простота пробоподготовки и значительный объем получаемой информации. В последнее время рамановская спектроскопия переживает бум в области микробиологии, поскольку этот метод позволяет проводить идентификацию микроорганизмов, выявлять факторы их вирулентности, обнаруживать метаболические изменения и, что не менее важно, – анализировать отдельные микробные клетки [45].

Рамановская спектроскопия является ценным инструментом для идентификации микроорганизмов даже в смешанных образцах [46]. Кроме того, спектроскопию комбинационного рассеяния света можно использовать для характеристики факторов вирулентности микроорганизмов, включая устойчивость к противомикробным препаратам [47].

Существуют методики определения антибиотикорезистентности бактерий с использованием реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид-феназин метосульфата). МТТ-тест, широко используемый для оценки метаболической активности живых клеток, подходит для оценки цитотоксических эффектов лекарственных препаратов, эффективности действия противораковых препаратов, противогрибковых средств и антибиотиков. МТТ-тест представляет собой колориметрический метод, который ранее использовался для оценки метаболической активности живых клеток [48]. В этом методе слабоокрашенная тетразолиевая соль ферментативно восстанавливается до ее интенсивно фиолетово-голубой формазановой формы. Реакция восстановления тетразолия связана с системой транспорта электронов жизнеспособных микроорганизмов [49]. Хотя механизм восстановления МТТ в бактериях остается неизвестным, количество восстановленного формазана пропорционально количеству жизнеспособных бактерий в тестовом растворе [50]. Эту реакцию можно контролировать спектрофотометрически, обеспечивая полуколичественный результат, указывающий на присутствие микроорганизмов. Предлагается использовать МТТ-тест в сочетании с гигантским комбинационным рассеянием (ГКР, SERS), что позволит получать спектр одной-единственной бактерии и интерпретировать интенсивность сигналов ассоциаций бактерий, не разделяя их микробиологическими методами.

Показано, что сочетание рамановской спектроскопии и МТТ-теста может быть использовано для определения антибиотикорезистентности чистых бактериальных культур, включая количественную оценку минимальной подавляющей концентрации антибиотика.

## ■ ПОСТАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

Возможность использования цифровых данных микробиологами и другими лабораторными специалистами позволит персонализировать диагностический подход и лечение, повышать точность и чувствительность диагностических тестов, снижать риск ошибок, тем самым улучшать качество диагностики и лечения пациентов [51].

В лабораториях медицинской микробиологии ежедневно накапливаются и хранятся гигабайты данных, например, масс-спектры MALDI-TOF, фотодокументированные микропрепараты, данные секвенирования (микробная геномика, анализ микробиоты), результаты ПЦР в режиме реального времени, данные серологических

исследований. Из-за быстрого роста количества данных вскоре исследователям станет сложно использовать и анализировать наиболее важную и актуальную информацию [52].

Лабораторные системы хранения данных и рабочие процессы могут быть объединены в лабораторное хранилище информации, которое оптимизирует сбор биобразцов, тестирование, структуру данных и отчетность, охватывая все аспекты преаналитического и постаналитического этапов [53].

В медицинской микробиологии методы графического искусственного интеллекта могут быть использованы для интеграции данных о пациенте, включая историю болезни, результаты лабораторных исследований и данные медицинской визуализации. Создавая сеть гетерогенных точек данных, графический искусственный интеллект может различать закономерности и корреляции между, казалось бы, разрозненными фрагментами информации, что потенциально приводит к более точной диагностике и выбору целенаправленного лечения. Этот подход уже применялся к COVID-19 [54], туберкулезу и оценке резистентности патогенов к противомикробным препаратам [55].

Сообщается, что цифровизация в сфере медицинской микробиологии способна существенно повлиять на эпидемиологический надзор за патогенами и растущей антибиотикорезистентностью [56].

В настоящее время известно о создании и применении на практике автоматизированной системы персонализированного лечения матерей и новорожденных с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Эта система позволяет не только интерпретировать результаты микробиологических исследований, но и предлагать персональное врачебное решение для конкретного пациента с учетом базовых принципов устойчивости бактерий к антибиотикам, молекулярных механизмов резистентности и персональных параметров фармакокинетики лекарственных средств.

Система персонализированного лечения ориентирована на использование модели генотипирования возбудителей по генам резистентности посредством ПЦР и оптимизацию подбора лечения согласно методике определения терапевтической концентрации антимикробных препаратов. Ожидаемый эффект от использования данной автоматизированной системы – снижение материнской и младенческой инфекционной заболеваемости и смертности.

Кроме того, в настоящее время активно развивается и внедряется в работу разных областей медицины новая технология чат-ботов с искусственным интеллектом, которая позволяет пользователям задавать вопросы и получать развернутые ответы на интерактивном уровне [57].

Врачи используют инструменты искусственного интеллекта (чат-боты), чтобы просматривать наборы медицинских данных и выявлять важные закономерности, что помогает им лучше диагностировать заболевания и лечить пациентов. Однако полностью заменить медицинских работников и официально диагностировать состояния пациентов чат-боты пока не могут.

Постаналитический этап является заключительным этапом микробиологического исследования и включает оценку полученных результатов, подготовку заключения, составление статистической отчетности, своевременную передачу результатов исследований соответствующим лицам, особенно критически значимых результатов, необходимых для принятия срочных клинических решений [58]. Постаналитический

этап исследования состоит из трех важнейших действий: анализа протокола исследований, хранения критически важных биообразцов и изолятов микроорганизмов, а также утилизации путем обеззараживания биообразцов и изолятов, когда они больше не нужны [59].

Недопонимание и недосказанность в общении сотрудников лабораторий часто являются причиной ошибок в заключениях. Поэтому крайне важно разрабатывать эффективные стратегии коммуникации между сотрудниками для избегания неправильного толкования результатов исследований, которые могут поставить под угрозу лечение и выздоровление пациентов [59].

Анализ результатов так же важен, как и проведение микробиологического исследования. Двумя важными факторами, влияющими на постаналитический этап исследования, являются отчет и интерпретация результатов исследований [59]. Анализ результатов на постаналитическом этапе может выявить ошибки как на преаналитическом, так и на аналитическом этапах (например, неверную идентификацию образца, которая является частью преаналитического этапа, но очень часто распознается на постаналитическом этапе). Анализ результатов начинается со сравнения полученных значений с референтными интервалами и/или критическими результатами, диагнозами и результатами предыдущих исследований, если таковые имеются. После сравнения результаты подтверждаются как приемлемые или рекомендуются дополнительные процедуры, включая повторение аналитического этапа [58].

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен обобщенный обзор основных достижений медицинской микробиологии, которые затрагивают все этапы микробиологических исследований. Специалистам микробиологических лабораторий необходимо постоянно повышать уровень знаний и квалификации для эффективного применения перечисленных методов в рутинной практике. Кроме того, на данном этапе важно развивать междисциплинарный подход и слаженное взаимодействие всех специалистов смежных специальностей для быстрой диагностики инфекционных заболеваний и борьбы с растущей антибиотикорезистентностью. Наиболее перспективным в этом направлении является внедрение методов «быстрой» микробиологии в рутинную практику микробиологических лабораторий.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Jhaveri T.A., Weiss Z.F., Winkler M.L., Pyden A.D., Basu S.S., Pecora N.D. A decade of clinical microbiology: top 10 advances in 10 years: what every infection preventionist and antimicrobial steward should know. *Antimicrob. Steward. Healthc. Epidemiol.* 2024;4(1):e8. doi: 10.1017/ash.2024.10
2. Conrad S., Gant Kanegusuku A., Conklin S.E. Taking a step back from testing: Preanalytical considerations in molecular infectious disease diagnostics. *Clin. Biochem.* 2022;115:22. doi: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2022.12.003
3. Nordin N. et al. Preanalytical Errors in Clinical Laboratory Testing at a Glance: Source and Control Measures. *Cureus.* 2024;16(3):e57243. doi: 10.7759/CUREUS.57243
4. Zheng F., Wang K., Wang Q., Yu T., Zhang X. The pre-analytical process management status and influencing factors of laboratory test before prescribing antimicrobial in developing country. *BMC Health Serv. Res.* 2023;23(1):283. doi: 10.1186/s12913-023-09243-8
5. Egli A., Schrenzel J., Greub G. Digital microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020;26(10):1324–1331. doi: 10.1016/J.CMI.2020.06.023
6. Hayton D.E., Wickramasinghe D.N. Key concepts in diagnosing infection – when to treat and when not to. *Clin Med (Lond).* 2024;24(6):100264. doi: 10.1016/j.clinme.2024.100264.
7. Valiquette L., Laupland K.B. Looking beyond the laboratory is not preposterous. *J. Assoc. Med. Microbiol. Infect. Dis. Canada.* 2020;5(1):4–7. doi: 10.3138/jammi.2019-09-19
8. Pripitnevich T. et al. The evolution of technologies in microbiology is the key to creating new opportunities for surveillance and prevention of infections in obstetrics. *Ann. Russ. Acad. Med. Sci.* 2020;74(6):364–370. doi: 10.15690/vramn1198

9. Elbehiry A. et al. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines*. 2022;10(11):1881. doi: 10.3390/vaccines10111881
10. Croxatto A., Prod'homme G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012;36(2):380–407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x
11. Alizadeh M. et al. MALDI-TOF Mass Spectroscopy Applications in Clinical Microbiology. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* 2021;2021:9928238. doi: 10.1155/2021/9928238
12. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 2015;6:791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791
13. Doellinger J., Schneider A., Stark T.D., Ehling-Schulz M., Lasch P. Evaluation of MALDI-ToF Mass Spectrometry for Rapid Detection of Cereulide From *Bacillus cereus* Cultures. *Front. Microbiol.* 2020;11:511674. doi: 10.3389/fmicb.2020.511674
14. Yoon E.-J., Jeong S.H. MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology as a Tool for the Rapid Diagnosis of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Antibiotics*. 2021;10(8):982. doi: 10.3390/antibiotics10080982
15. Sun H. et al. MALDI-TOF MS Based Bacterial Antibiotics Resistance Finger Print for Diabetic Pedopathy. *Front. Chem.* 2022;9:785848. doi: 10.3389/fchem.2021.785848
16. Do T., Guran R., Adam V., Zitka O. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for virus identification: a review. *Analyst*. 2022;147(14):3131–3154. doi: 10.1039/D2AN00431C
17. Syl L., Conrad L., Becker S.L. Recent Advances and Potential Future Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Identification of Helminths. *Diagnostics*. 2022;12(12):3035. doi: 10.3390/diagnostics12123035
18. Lu J.-J. et al. The Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry to Analyze Commensal Oral Yeasts in Nursing Home Residents. *Microorganisms*. 2021;9(1):142. doi: 10.3390/microorganisms9010142
19. Calderaro A., Chezzi C. MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory. *Microorganisms*. 2024;12(2):322. doi: 10.3390/microorganisms12020322
20. Florio W., Baldeschi L., Rizzato C., Tavanti A., Ghelardi E., Lupetti A. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10. doi: 10.3389/fcimb.2020.572909
21. Kliem M., Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2012;15(3):397–402. doi: 10.1016/j.mib.2012.02.006
22. Yaman G., Akyar I., Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012;73(1):65–67. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.013
23. Spanu T. et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: An observational study in two large microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(1). doi: 10.1128/JCM.05742-11
24. Lavergne R.-A. et al. An extraction method of positive blood cultures for direct identification of *Candida* species by Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med. Mycol.* 2013;51(6):652–656. doi: 10.3109/13693786.2012.762607
25. Sánchez-Juanes F. et al. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry to the Identification of Parasites and Arthropod Vectors of Human Diseases. *Microorganisms*. 2022;10(11):2300. doi: 10.3390/microorganisms10112300
26. Stauning M.A., Jensen C.S., Staalset T., Kurtzhals J.A.L. Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* in human blood by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a proof of concept study. *Malar. J.* 2023;22(1):285. doi: 10.1186/s12936-023-04719-8
27. Priputnevich T., Efimov B., Isaeva E., Gordeev A. *Medical microbiology. From microscopy to mass spectrometry*. Moscow: GEOTAR-Media, 2024; p. 192. doi: 10.33029/9704-8495-1-LFP-2024-1-192
28. Khehra N., Padda I.S., Zubair M. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. 2025. [Online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1304285>
29. Artika I.M., Dewi Y.P., Nainggolan I.M., Siregar J.E., Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes (Basel)*. 2022;13(12):2387. doi: 10.3390/genes13122387
30. Kralik P., Ricchi M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front. Microbiol.* 2017;8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108
31. Mackay I.M. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292–1305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292
32. Anfossi L., Di Nardo F., Cavallera S., Giovannoli C., Baggiani C. Multiplex Lateral Flow Immunoassay: An Overview of Strategies towards High-throughput Point-of-Need Testing. *Biosensors*. 2018;9(1):2. doi: 10.3390/bios9010002
33. Yalow R.S., Berson S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 1960;39(7):1157–1175. doi: 10.1172/JCI104130
34. Li G. et al. Lateral flow immunoassays for antigens, antibodies and haptens detection. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;242:125186. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125186
35. Kim H., Chung D.-R., Kang M. A new point-of-care test for the diagnosis of infectious diseases based on multiplex lateral flow immunoassays. *Analyst*. 2019;144(8):2460–2466. doi: 10.1039/C8AN02295J
36. Andryukov B., Lyapun I., Matosova E., Somova L. Biosensor Technologies in Medicine: from Detection of Biochemical Markers to Research into Molecular Targets (Review). *Sovrem. Tehnol. v Med.* 2020;12(6):70. doi: 10.17691/stm2020.12.6.09
37. Di Nardo F., Chiarello M., Cavallera S., Baggiani C., Anfossi L. Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. *Sensors*. 2021;21(15):5185. doi: 10.3390/s21155185
38. Peters R.P.H. et al. Novel lateral flow assay for point-of-care detection of *Neisseria gonorrhoeae* infection in syndromic management settings: a cross-sectional performance evaluation. *Lancet*. 2024;403(10427):657–664. doi: 10.1016/S0140-6736(23)02240-7
39. Gentilotti E. et al. Diagnostic accuracy of point-of-care tests in acute community-acquired lower respiratory tract infections. A systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2022;28(1):13–22. doi: 10.1016/j.cmi.2021.09.025
40. Jenks J.D., Miceli M.H., Prattes J., Mercier T., Hoenigl M. The Aspergillus Lateral Flow Assay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis: an Update. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 2020;14(4):378–383. doi: 10.1007/s12281-020-00409-z
41. Mousavi S.M., Kalashgrani M.Y., Gholami A., Omidifar N., Binazadeh M., Chiang W.-H. Recent Advances in Quantum Dot-Based Lateral Flow Immunoassays for the Rapid, Point-of-Care Diagnosis of COVID-19. *Biosensors*. 2023;13(8):786. doi: 10.3390/bios13080786
42. Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. 2019;9(2). doi: 10.3390/diagnostics9020049
43. Baron E.J., D'Souza H., Qi Wang A., Gibbs D.L. Evaluation of the Biomic V3 Microbiology System for Identification of Selected Species on BBL CHROMagar Orientation Agar and CHROMagar MRSA Medium. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46(910):3488–3490. doi: 10.1128/JCM.02460-07

44. Thomsen B.L. et al. Accurate and fast identification of minimally prepared bacteria phenotypes using Raman spectroscopy assisted by machine learning. *Sci. Rep.* 2022;12(1):16436. doi: 10.1038/s41598-022-20850-z
45. Franco-Duarte R. et al. Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms – From Past to Present. *Microorganisms.* 2019;7(5):130. doi: 10.3390/microorganisms7050130
46. Rebřošová K. et al. Raman spectroscopy – a tool for rapid differentiation among microbes causing urinary tract infections. *Anal. Chim. Acta.* 2022;1191:339292. doi: 10.1016/j.jaca.2021.339292
47. Rebřošová K., Samek O., Kizovsky M., Bernatova S., Hola V., Ruzicka F. Raman Spectroscopy – A Novel Method for Identification and Characterization of Microbes on a Single-Cell Level in Clinical Settings. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2022;12. doi: 10.3389/fcimb.2022.866463
48. Chen C.-H. et al. Detection of Microorganisms in Body Fluids via MTT-PMS Assay. *Diagnostics.* 2021;12(10):46. doi: 10.3390/diagnostics12010046
49. Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem.* 2018;120(4):303–311. doi: 10.1016/j.acthis.2018.03.007
50. Braissant O., Astasov-Frauenhoffer M., Waltimo T., Bonkat G. A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. *Front. Microbiol.* 2020;11. doi: 10.3389/fmicb.2020.547458
51. Gruson D., Helleputte T., Rousseau P., Gruson D. Data science, artificial intelligence, and machine learning: Opportunities for laboratory medicine and the value of positive regulation. *Clin. Biochem.* 2019;69:1–7. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2019.04.013
52. Galetsi P., Katsaliaki K., Kumar S. Values, challenges and future directions of big data analytics in healthcare: A systematic review. *Soc. Sci. Med.* 2019;241:112533. doi: 10.1016/j.socscimed.2019.112533
53. Karami M., Rahimi A., Shahmirzadi A.H. Clinical Data Warehouse. *Health Care Manag. (Frederick).* 2017;36(4):380–384. doi: 10.1097/HCM.0000000000000113
54. Huo L., Jiao Li J., Chen L., Yu Z., Hutvagner G., Li J. Single-cell multi-omics sequencing: application trends, COVID-19, data analysis issues and prospects. *Brief. Bioinform.* 2021;22(6). doi: 10.1093/bib/bbab229
55. Fitzpatrick K.K., Darcy A., Vierhile M. Delivering Cognitive Behavior Therapy to Young Adults With Symptoms of Depression and Anxiety Using a Fully Automated Conversational Agent (Woebot): A Randomized Controlled Trial. *JMIR Ment. Heal.* 2017;4(2):e19. doi: 10.2196/mental.7785
56. Basak S.C. et al. Computer-Assisted and Data Driven Approaches for Surveillance, Drug Discovery, and Vaccine Design for the Zika Virus. *Pharmaceuticals.* 2019;12(4):157. doi: 10.3390/ph12040157
57. Lee P., Bubeck S., Petro J. Benefits, Limits, and Risks of GPT-4 as an AI Chatbot for Medicine. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(13):1233–1239. doi: 10.1056/NEJMsrr2214184
58. Lenicek Krleza J., Honovic L., Vlasic Tanaskovic J., Podolar S., Rimac V., Jokic A. Post-analytical laboratory work: national recommendations from the Working Group for Post-analytics on behalf of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem. Medica.* 2019;29(2):228–261. doi: 10.11613/BM.2019.020502
59. Carey R.B. et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Implementing a Quality Management System in the Medical Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018;31(3). doi: 10.1128/CMR.00062-17



Шилейко И.Д.<sup>1</sup>✉, Колядко Н.Н.<sup>1,2</sup>, Калина А.С.<sup>3</sup>, Русак А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальная антидопинговая лаборатория, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>3</sup> Брестская областная клиническая больница, Брест, Беларусь

## Обзор Европейского руководства по анализу мочи 2023 года

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Шилейко И.Д. – написание текста, литературный обзор; Колядко Н.Н. – концепция, дизайн, редактирование; Калина А.С. – редактирование, литературный обзор; Русак А.А. – написание текста.

Подана: 30.05.2025

Принята: 26.08.2025

Контакты: cdl@antidoping.by

### Резюме

В 2023 г. вышла в свет обновленная версия Европейского руководства по анализу мочи Европейской федерации лабораторной медицины. Данный документ ориентирован на пересмотр условий повышения надежности результатов клиничко-лабораторных исследований и содержит ряд рекомендаций, направленных на совершенствование лабораторной диагностики инфекций мочевыводящих путей, а также заболеваний почек и мочевыводящих путей неинфекционного характера. Обновленное Европейское руководство включает в себя разделы, посвященные вопросам назначения клиничко-лабораторного исследования, правилам сбора и транспортировки образцов мочи для исследования, биохимическому исследованию мочи, микроскопии элементов ее осадка и исследованию бактериурии. В документе подчеркнута необходимость рационального использования различных методов для выполнения клиничко-лабораторного исследования мочи. Например, рекомендовано проводить количественное определение белка после получения положительного результата предварительного тестирования образца мочи тест-полосками. В то же время отмечено, что в некоторых случаях количественное определение белка является обязательным, например у пациентов с заболеваниями почек или высоким риском развития таковых, а также при подозрении на протеинурию не альбуминовой природы. Подчеркнуто, что при использовании многофункциональных тест-полосок учет результата следует осуществлять с применением автоматизированных считывающих устройств, отмечена важность проведения при этом внутрилабораторного контроля качества. В связи с внедрением в лабораторную практику автоматизированного подсчета клеточных и неклеточных элементов мочи введен новый термин «анализ взвешенных частиц». Мануальную микроскопию рекомендовано выполнять в тех образцах, где были получены положительные результаты при исследовании многофункциональными тест-полосками или по результатам автоматизированного подсчета элементов мочи. Отмечено, что наиболее информативным оптическим методом исследования взвешенных частиц является фазово-контрастная микроскопия.

**Ключевые слова:** тест-полоски, протеинурия, маркерные белки, осмоляльность, микроскопия

Shileiko I.<sup>1</sup>✉, Kaliadka N.<sup>1,2</sup>, Kalina A.<sup>3</sup>, Rusak A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Anti-Doping Laboratory, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>3</sup> Brest Regional Clinical Hospital, Brest, Belarus

## Review of the EFLM European Urinalysis Guidelines 2023

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Shileiko I. – text writing, literature review; Kaliadka N. – concept, design, editing; Kalina A. – editing, literature review; Rusak A. – text writing.

Submitted: 30.05.2025

Accepted: 26.08.2025

Contacts: cdl@antidoping.by

### Abstract

In 2023, an updated version of the European Federation of Laboratory Medicine's European Guidelines for Urinalysis was published. This document is aimed at revising conditions for increasing the reliability of the results of clinical laboratory tests and contains a number of recommendations aimed at improving the laboratory diagnostics of urinary tract infections, as well as non-infectious diseases of the kidneys and urinary tract. The updated European Guidelines include sections covering prescribing clinical laboratory tests, rules for collecting and transporting urine samples for testing, biochemical urine testing, microscopy of urine sediment elements, and tests for bacteriuria. The document emphasizes the need for rational use of various methods for performing clinical laboratory testing of urine. For example, it is recommended to perform protein quantification after receiving a positive result of preliminary urine strip test. At the same time, it is noted that in some cases, quantitative determination of protein is mandatory, for example, in patients with kidney disease or at high risk of its occurrence, as well as when non-albumin proteinuria is suspected. It was emphasized that when using multifunctional test strips, the results should be recorded using automated reading devices, and the importance of conducting in-laboratory quality control was highlighted. In connection with the introduction of automated counting of cellular and non-cellular elements of urine into laboratory practice, a new term, "suspended particle analysis", was introduced. Manual microscopy is recommended for samples that showed positive results when tested with multifunctional test strips or based on automated urine element counting. It is stated that phase-contrast microscopy is the most informative optical method for testing suspended particles.

**Keywords:** test strips, proteinuria, marker proteins, osmolality, microscopy

Клинико-лабораторное исследование мочи играет важную роль в диагностике заболеваний почек и мочевыводящих путей и включает в себя широкий спектр лабораторных методов, позволяющих проводить оценку физических свойств мочи, ее биохимических показателей и элементов мочевого осадка. С целью повышения надежности результатов клинико-лабораторных исследований специалистами рабочей группы Европейской федерации клинической химии и лабораторной медицины в 2000 г. были разработаны рекомендации по лабораторному исследованию мочи, которые легли в основу Европейского руководства по анализу мочи. В современных условиях методы и технологии лабораторной медицины постоянно совершенствуются. К настоящему времени разработан широкий спектр тест-систем для определения физических и химических свойств мочи. Расширяются возможности автоматизации процедуры исследования мочи, включая дифференциацию и подсчет элементов мочевого осадка. В то же время сохраняются определенные сложности в обеспечении качества преаналитических процедур. Поэтому в 2023 г. Европейское руководство по анализу мочи (далее по тексту – Руководство) было пересмотрено с учетом требований современности.

В настоящей статье представлены выборочные рекомендации из обновленного Руководства, имеющие с точки зрения авторов статьи наиболее важное значение для повышения качества осуществления преаналитического этапа клинико-лабораторного исследования, а также анализа химического состава и элементов осадка мочи.

Каждая из представленных рекомендаций имеет свой уровень доказательности, основанный на принципах системы классификации, оценки, разработки и экспертизы рекомендаций GRADE. В соответствии с системой градации GRADE рекомендации классифицированы по уровням доказательности (A–D) и по силе (1–2).

Уровни доказательности рекомендаций:

**A** – высокий уровень: доказательства получены в результате проведенных контролируемых исследований или неопровержимых доказательств в какой-либо другой форме. Дальнейшие исследования вряд ли смогут изменить уверенность в оценке эффекта.

**B** – средний уровень: доказательства основаны на результатах контролируемых исследований, имеющих некоторые ограничения, например: противоречивые результаты, методологические недостатки, косвенные или неточные доказательства. Дальнейшие исследования могут привести к изменению оценки эффекта.

**C** – низкий уровень: доказательства получены из наблюдательных или ограниченных исследований или из контролируемых исследований с серьезными недостатками. Скорее всего, дальнейшие исследования изменят оценку эффекта.

Сила рекомендаций (уровни убедительности рекомендаций):

**1** – сильная рекомендация (strong recommendation): рекомендация по использованию процедуры оценивалась как сильная, если предполагаемая польза значительно превышала вред или затраты;

**2** – слабая рекомендация (conditional recommendation): рекомендация по использованию процедуры оценивалась как слабая в тех случаях, когда предполагаемая польза могла оказаться спорной в сравнении с причиненным вредом или затратами [1].

В новой версии Руководства методы клинико-лабораторного исследования мочи разделены на 3 уровня в зависимости от точности измерения [2].

Уровень 1: представлен экспресс-методами, позволяющими получать качественные или полуколичественные результаты. Это метод «сухой химии», нестандартизированная микроскопия осадка мочи, а также подсчет количества колоний при бактериологическом посеве.

Уровень 2: включает рутинные количественные методы, предназначенные для измерения параметров мочи в условиях повседневной практики клинико-диагностической лаборатории. Точность рутинных количественных методов значительно выше, чем у методов уровня 1, поскольку процедуры измерения уровня 2 подтверждены эталонными процедурами и материалами (методами уровня 3). К методам уровня 2 относят как мануальные, так и автоматизированные, например количественное определение биохимических компонентов мочи, а также количественный анализ элементов мочи.

Уровень 3: расширенные методы сравнения, которые представляют собой вторичные референтные методы, позволяющие получать диагностически более надежные результаты исследования по сравнению с таковыми, достигаемыми с использованием рутинных методов анализа. Они не предназначены для повседневного использования в клинико-диагностических лабораториях ввиду большой трудоемкости и могут применяться в медицинских лабораториях для верификации методов уровня 2, например вводимого лабораторией автоматизированного подсчета частиц мочи.

Отдельное внимание в обновленном Руководстве уделяется подходу к назначениям клинико-лабораторных исследований мочи. Необоснованный лабораторный скрининг, включающий обследование значительной части населения, связан с большими материальными затратами и не всегда приводит к ожидаемым результатам. Клинико-лабораторное исследование мочи с целью диагностики заболеваний почек или мочевыводящих путей необходимо назначать в первую очередь тем пациентам, которые обращаются за медицинской помощью с наличием какой-либо симптоматики, например с гематурией, дизурией или характерным болевым синдромом.

Если симптомы заболевания отсутствуют, клинико-лабораторные исследования целесообразно проводить в тех случаях, когда они оправданы с точки зрения соотношения затраты – польза. К таким случаям можно отнести, например, обследование беременных женщин на предмет поиска бессимптомной бактериурии или протеинурии или лиц с высоким риском развития хронической болезни почек. Обоснованность клинико-лабораторного исследования мочи может быть также обусловлена наличием заболеваний, сопряженных с высоким риском повреждения почек, таких как сахарный диабет или артериальная гипертензия, даже при отсутствии клинических проявлений поражения почек или мочевыводящих путей [3].

Табл. 1 содержит перечень рекомендаций в соответствии с уровнями доказательности и убедительности, направленных на совершенствование процедуры назначения клинико-лабораторных исследований мочи [2].

Для обеспечения качества преаналитического этапа клинико-лабораторного исследования мочи важен процесс взаимодействия медицинского работника с пациентом. Пациента в обязательном порядке следует информировать о цели выполнения исследования мочи, правилах ее сбора и последствиях несоблюдения этих правил. Правила сбора мочи рекомендуется оформлять в виде памятки или брошюры с иллюстрациями, обеспечивающими наглядность и легкое восприятие изложенной информации.

**Таблица 1**  
**Рекомендации по назначению исследований**  
**Table 1**  
**Recommendations for prescribing tests**

| Рекомендации                                                                                                                                                                                                                                                    | Уровень доказательности |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| При назначении пациенту исследования мочи следует учитывать наличие или отсутствие у него клинических симптомов заболевания, а также диагностическую значимость тех лабораторных тестов, которые будут выполнены в ходе клинико-лабораторного исследования      | B (1)                   |
| Исследование мочи целесообразно назначать в тех случаях, когда у пациента имеется риск развития заболевания почек или осложнение уже имеющегося заболевания                                                                                                     | C (1)                   |
| Объем назначаемого лабораторного исследования пациентам с отсутствием риска или с низким риском развития заболевания почек должен отличаться от объема исследований, назначаемых пациентам с высоким риском развития таких заболеваний                          | C (1)                   |
| С целью повышения качества обмена информацией между клиницистами и специалистами клинико-диагностической лаборатории для передачи заявок на исследование и результатов лабораторного исследования рекомендуется использовать электронные информационные системы | B (1)                   |

Наиболее информативным для клинико-лабораторного исследования образцом является первая утренняя порция мочи, которую собирают сразу после ночного сна перед завтраком до начала физической активности. Такой образец мочи, являясь наиболее концентрированным, оптимален для исследования биохимических параметров, кроме этого, в нем хорошо сохраняются цилиндры и клеточные элементы. На результаты клинико-лабораторного исследования мочи существенное влияние оказывает время инкубации (длительность пребывания) ее в мочевом пузыре: оно должно составлять в среднем от 4 до 8 ч. Поэтому для минимизации ложноотрицательных результатов сбор мочи необходимо проводить не ранее чем через 4 ч от момента последнего мочеиспускания [4].

При исследовании разовой (однократно собранной) мочи предпочтение отдается ее средней порции, процедура сбора которой подразумевает, что первая порция мочи (в начале мочеиспускания) не собирается. Это минимизирует риск получения недостоверного результата исследования, поскольку в первой порции мочи, в отличие от средней, содержится большее количество клеток многослойного плоского эпителия, лейкоцитов, а также генитальной и уретральной флоры. Сбор последней порции также не проводится [5].

Вторая утренняя порция мочи – разовый образец мочи, который выделяется через 2–4 ч после первой утренней порции. Безусловно, на ее состав могут влиять прием пищи и жидкости, а также нахождение пациента в вертикальном положении. Тем не менее сбор второй порции мочи может быть удобен для амбулаторных пациентов. Качество клинико-лабораторного исследования в таком случае обеспечивается за счет ограничения приема жидкости: пациенту разрешается принять один стакан воды (200 мл) в период с 22 ч предыдущего дня и до момента сбора второй утренней порции мочи. Такой питьевой режим обеспечит инкубацию мочи в мочевом пузыре не менее 4 ч. Если данные рекомендации не были соблюдены, то вторая утренняя порция мочи классифицируется как случайный образец.

Длительность хранения образца мочи после ее сбора – это еще один важный фактор, влияющий на качество клинико-лабораторного исследования. Моча, предназначенная для биохимического исследования, может храниться в холодильнике до 24 ч без изменения ее лабораторных показателей. Однако исследование мочевого осадка необходимо проводить не позднее 2 ч от момента сбора материала. Если же такая возможность отсутствует, то хранение мочи следует осуществлять в холодильной камере (но не более 6 ч) рефрижератора, при этом важно учитывать то обстоятельство, что в некоторых образцах мочи при охлаждении могут осаждаться ураты и фосфаты, которые будут мешать идентификации клеточных элементов. Чем дольше срок хранения образца, тем выше вероятность лизиса элементов мочевого осадка, особенно в моче со щелочной реакцией и с низкой относительной плотностью [6, 7]. Поэтому если образец мочи не может быть проанализирован в течение 2 ч от момента сбора, то наилучшим способом его стабилизации является применение специальных консервантов. Замораживать мочу нельзя, поскольку при оттаивании разрушаются либо повреждаются многие ее элементы. При оформлении результата клинико-лабораторного исследования для правильной его интерпретации фактическое время сбора образца мочи в обязательном порядке должно быть перенесено из запроса на исследование в бланк с результатом.

Рекомендации по сбору и транспортировке образцов мочи для клинико-лабораторного исследования, призванные повысить качество преаналитического этапа, представлены в табл. 2 [2].

Общий анализ мочи традиционно включает в себя 2 этапа – анализ физико-химических свойств и исследование элементов ее осадка.

В настоящее время для исследования физико-химических свойств мочи широко применяют методы, основанные на технологии «сухой химии», которые реализуются с использованием тест-полосок. Метод является полуколичественным, что может потребовать проведения дополнительных исследований другими, количественными методами исследования.

Изменение окраски тестовых зон тест-полосок нередко определяется оператором визуально. В то же время визуальная оценка реакций зависит от ряда факторов (например, освещенности или особенности цветовосприятия оператора). К тому же при использовании многофункциональных тест-полосок приходится одновременно оценивать до 10 и более тестовых зон, что также затрудняет процесс визуализации результата. С целью стандартизации процедуры исследования и получения объективной информации для оценки результата реакции на реактивных зонах тест-полосок рекомендуется использовать автоматизированные считывающие устройства.

При исследовании мочи тест-полосками с применением считывающих устройств следует осуществлять внутренний контроль качества с использованием контрольных материалов разных уровней и построением контрольных карт Леви-Дженнинга. Контроль качества особенно важен для концентраций аналитов на грани порогового уровня – во избежание получения недостоверных результатов.

Среди биохимических показателей мочи одним из наиболее значимых с диагностической точки зрения является белок. Но проводить количественное определение белка в образцах мочи всех обследуемых пациентов нецелесообразно с точки зрения материальных затрат, поэтому определять его содержание в моче рекомендуется после предварительного тестирования образца при помощи тест-полосок

**Таблица 2**  
**Рекомендации к осуществлению сбора и транспортировки мочи в клиничко-диагностическую лабораторию для выполнения аналитических исследований**  
**Table 2**  
**Recommendations for urine collection and transportation to a clinical diagnostic laboratory for analytical testing**

| Рекомендации                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Уровень доказательности |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Для улучшения качества образца мочи и для соблюдения правил ее сбора важно повысить ответственность пациента за принятие решений по поводу своего заболевания                                                                                                                                                                                                                                                                   | C (1)                   |
| Наиболее информативным образцом для клиничко-лабораторного исследования является первая утренняя порция мочи, которую следует собирать после 8-часового пребывания в положении лежа и не ранее 4–8 ч от момента последнего мочеиспускания. Для амбулаторных пациентов предпочтительной может быть вторая утренняя порция, а для исследования пациентов, находящихся в критическом состоянии, используются случайные порции мочи | B (1)                   |
| Для правильной интерпретации результата клиничко-лабораторного исследования важно учитывать длительность пребывания мочи в мочевом пузыре, которая должна составлять не менее 4 ч                                                                                                                                                                                                                                               | C (2)                   |
| Для исследования образцов разовой мочи рекомендуется собирать среднюю ее порцию                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | B (1)                   |
| Время сбора мочи необходимо документировать и сообщать в клиничко-диагностическую лабораторию при доставке образца, чтобы было возможно оценить приемлемость образца мочи с учетом сроков и условий хранения перед исследованием                                                                                                                                                                                                | B (1)                   |
| Стабилизация образцов мочи считается обязательной в тех случаях, когда образец не может быть проанализирован в течение 2–6 ч после мочеиспускания. В качестве способов стабилизации можно рассматривать охлаждение образца, если это применимо, или использование специальных консервантов                                                                                                                                      | B (1)                   |
| Сотрудники клиничко-диагностических лабораторий должны обеспечивать тесное взаимодействие с медицинским персоналом клинических подразделений в целях обеспечения качества преаналитического этапа клиничко-лабораторных исследований, включая подготовку пациентов к сбору образцов мочи                                                                                                                                        | C (1)                   |

и получения положительного результата. Исключение составляют пациенты с высоким риском развития заболеваний почек или с уже имеющейся почечной патологией, которым количественное определение белка в моче необходимо проводить в обязательном порядке. Кроме того, следует помнить, что тест определения белка, реализуемый с использованием тест-полоски, обладает высокой чувствительностью главным образом к альбумину. Поэтому, если имеется подозрение на протеинурию не альбуминовой природы (например, обусловленную легкими цепями), следует выполнять исследование образца мочи в обязательном порядке количественными методами.

Исследование суточной мочи рекомендуется заменить на исследование разовой ее порции, в которой для учета скорости фильтрации проводится расчет отношения измеряемого аналита к показателю содержания в ней креатинина.

Так, содержание белка рекомендуется определять в однократно взятой пробе мочи и представлять в виде соотношения альбумин/креатинин или общий белок/креатинин. Определение альбуминурии имеет важное значение для выявления возможного поражения почек у пациентов с артериальной гипертензией и для определения риска развития сердечно-сосудистой патологии у пациентов с хронической болезнью почек. В качестве основных прогностических маркеров в настоящее

время рассматриваются показатели скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и альбумин-креатининового соотношения (ACR) [3, 8].

При исследовании пациентов с высоким риском развития почечной патологии (с сахарным диабетом, артериальной гипертензией или иными заболеваниями, имеющими высокий риск нефрологических осложнений) рекомендуется проводить определение в моче не только альбумина, но и  $\alpha 1$ -микроглобулина, как одного из биомаркеров, позволяющих диагностировать ХБП на ранней стадии ее развития [9]. Также при первичной диагностике заболеваний почек следует дифференцировать протеинурию по происхождению (ренальная, постренальная) на основании определения так называемых маркерных белков, попадающих в мочу из различных отделов почек [10, 11].

Перечень отдельных биомаркеров для дифференциации протеинурии:

- $\alpha 1$ -микроглобулин – свидетельствует о тубулярной протеинурии, возникающей в результате ограничения канальцевой реабсорбции или тубулоинтерстициального повреждения (при нефрите, нефропатиях);
- альбумин – выявляется при селективной и неселективной гломерулярной протеинурии, развивающейся в результате усиления гломерулярного фильтрационного давления и гломерулярной гиперfiltrации;
- иммуноглобулин G (IgG) – свидетельствует о неселективной гломерулярной протеинурии, являющейся следствием нарушения в почках процесса фильтрации;
- $\alpha 2$ -макроглобулин – обнаруживается при постренальной протеинурии, причиной которой могут быть кровотечение или образование экссудата.

Концентрация анализов в моче может изменяться в зависимости от диуреза, количества потребляемой жидкости, а также в результате снижения концентрационной способности почек или приема мочегонных средств. Измеряемыми величинами, отражающими скорость выделения мочи, являются креатинин, осмоляльность и относительная плотность [12].

Осмоляльность представляет собой сумму показателей концентрации катионов, анионов и неэлектролитов, то есть всех осмотически активных частиц в 1 кг растворителя (например, воды). Значение осмоляльности мочи может колебаться в пределах от 50 до 1200 мосм/кгH<sub>2</sub>O (изотоническая моча соответствует примерно 300 мосм/кгH<sub>2</sub>O) и зависит от количества потребляемой жидкости, состояния канальцевого аппарата почек и гормональной регуляции диуреза [13]. У практически здорового человека концентрированная утренняя моча после ночного ограничения приема жидкости должна иметь уровень осмоляльности не менее 700 мосм/кгH<sub>2</sub>O [14]. Определение осмоляльности имеет значение для диагностики нарушений водно-электролитного баланса, несахарного диабета, а также для оценки концентрационной функции почек. Этот показатель также рекомендуют измерять в тех случаях, когда количественное содержание анализов в моче зависит от скорости экскреции жидкости [15, 16].

Для определения осмоляльности используют либо прямые методы осмометрии (криосмометрия или определение точки росы) либо метод кондуктометрии с определением проводимости мочи, из которой рассчитывается осмоляльность.

Относительная плотность мочи отражает концентрационную функцию почек и тесно связана с показателем осмоляльности. Определение относительной плотности мочи возможно при помощи тест-полосок. Однако в тех случаях, когда по клини-

ческим показаниям требуется точное измерение данного показателя, рекомендуется использовать метод рефрактометрии.

Определение реакции (pH) мочи важно для диагностики нарушений кислотно-основного состояния. Также рекомендуется определять pH при специфических заболеваниях почек или мочевыводящих путей, таких как почечный канальцевый ацидоз или рецидивирующая почечнокаменная болезнь.

Исследования по определению содержания глюкозы в моче в значительной степени заменены измерениями ее концентрации в крови. Тем не менее установление глюкозурии может помочь в выявлении пациентов с недиагностированным сахарным диабетом, поэтому исследование глюкозы в моче с использованием тест-полосок может быть целесообразно для тех пациентов, у которых по какой-либо причине не проводилось определение уровня глюкозы в крови. Диагностическую ценность определения глюкозы в моче также имеет для выявления гестационного диабета у беременных женщин [17, 18].

Кетоновые тела (ацетоацетат, бета-гидроксибутират и ацетон) выводятся с мочой при диабетическом ацидозе, во время интенсивных физических упражнений, голодания, а также при обезвоживании организма. Используемая в тест-полосках химическая реакция чувствительна к ацетоацетату и ацетону, но не к бета-гидроксибутирату. Поэтому пациентам с кетоацидотической комой необходимо определять содержание гидроксибутирата в плазме крови.

Определение нитритов в моче служит одним из косвенных признаков бактериурии. В качестве экспресс-диагностики инфекций мочевыводящих путей (ИМП) используется метод, основанный на способности некоторых микроорганизмов восстанавливать нитраты до нитритов под действием фермента нитратредуктазы. При этом преимущественно выявляются грамположительные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Чувствительность теста ограничена тем, что не все уропатогены обладают нитратредуктазной активностью: она отсутствует у *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. и некоторых других грамположительных микроорганизмов, что делает тест неинформативным при их наличии в моче. Диагностическая чувствительность теста на нитриты варьирует от 20 до 80%, при этом метод обладает высокой специфичностью, которая составляет 90% и более. Таким образом, положительный результат теста на нитриты обладает высокой предсказательной ценностью, в то же время отрицательный результат не исключает ИМП, особенно у детей, пожилых пациентов и при наличии нитратредуктаз-негативных микроорганизмов.

В табл. 3 представлены содержащиеся в Руководстве-2023 рекомендации по исследованию химического состава мочи [2].

Одним из нововведений Руководства 2023 г. является термин «анализ взвешенных частиц». В настоящее время подсчет элементов мочи может осуществляться как в ходе микроскопии, так и посредством автоматических анализаторов мочи, при этом разные методы требуют различной подготовки проб. Если для визуального микроскопического подсчета необходимо концентрирование осадка мочи путем центрифугирования, то для автоматического используются нецентрифугированные образцы, для которых термин «осадок мочи» применяться не может. Поэтому в Руководстве-2023 вопросы подсчета элементов мочи рассматриваются в разделе «Анализ взвешенных частиц мочи».

**Таблица 3**  
**Рекомендации по биохимическому исследованию мочи**  
**Table 3**  
**Recommendations for biochemical urine testing**

| Рекомендации                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Уровень доказательности |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Многофункциональные тест-полоски в связи с их экономической эффективностью рекомендуются для скринингового исследования образцов мочи. Однако тест-полоски не обладают достаточной чувствительностью для исследования образцов мочи от пациентов, имеющих высокий риск развития почечной патологии (например, пациентов с сахарным диабетом или сердечно-сосудистыми заболеваниями)                                                                                                                                                                                                                                                               | A (1)                   |
| При исследовании мочи пациентов, имеющих высокий риск развития почечной патологии, количественное определение белка в моче следует проводить в обязательном порядке                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | A (1)                   |
| Для уменьшения материальных затрат нецелесообразно проводить скрининг альбуминурии для всех пациентов с начинающейся хронической нефропатией. Для этого рекомендуется целевое обследование пациентов высокого риска (например, пациентов с диабетом или сердечно-сосудистыми заболеваниями)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | B (1)                   |
| Для выявления заболеваний почек в группах высокого риска необходимо определять в моче уровень не только альбумина, но и какого-либо из мочевых маркеров, отражающих состояние канальцев, например, $\alpha$ 1-микроглобулина, при этом результаты должны выражаться в виде отношения измеряемого параметра к креатинину                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | B (1)                   |
| Интерпретация результатов количественных измерений биохимических показателей мочи и подсчет ее элементов в образцах разовой мочи более объективны при параллельной оценке аналитов, характеризующих степень концентрирования мочи. Измеряемые биохимические показатели рекомендуется оценивать в виде отношения показателя концентрации измеряемого аналита к эталонному, в качестве которого используется показатель концентрации креатинина мочи, например отношение содержания альбумина к таковому креатинина. Результаты подсчета элементов осадка мочи также должны сопоставляться с уровнем относительной плотности мочи или осмоляльности | B (1)                   |
| Вместо исследования суточной мочи предпочтительно определять отношение показателя концентрации измеряемого аналита к уровню содержания креатинина в однократно собранных образцах мочи                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | A (1)                   |
| Для наблюдения за пациентами с кетоацидотической комой вместо исследования кетоновых тел в образцах мочи с использованием тест-полосок рекомендуется определять содержание гидроксипутирата в плазме крови                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | B (1)                   |
| В образцах мочи пациентов отделений интенсивной терапии или в тех случаях, когда требуется повышенная точность результата исследования, концентрацию мочи рекомендуется оценивать путем определения относительной плотности методом рефрактометрии или путем измерения осмоляльности                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | B (2)                   |
| Для оценки результатов исследования мочи с использованием тест-полосок рекомендуется применять специальные считывающие устройства, чтобы избежать ошибок оператора при измерении параметра или интерпретации результатов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | A (1)                   |
| Результаты, полученные при исследовании мочи тест-полосками, должны быть верифицированы путем проведения контроля качества исследований с использованием контрольных растворов разных уровней                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | B (1)                   |

Руководство подчеркивает важность выражения результатов исследования мочи в соответствии с Международной системой единиц (SI). Это касается в том числе и результатов подсчета взвешенных частиц в единице объема мочи, которые должны выражаться как количество определенных частиц в литре мочи. Применение Международной системы единиц (SI) обеспечивает сопоставимость данных, полученных при использовании различных методов измерения и в разных клиничко-диагностических лабораториях.

Для подсчета взвешенных частиц мочи рекомендованы стандартизированные методы уровня 2, к которым относят 3 варианта мануальных методов – стандартизированный метод исследования осадка мочи под покровным стеклом, подсчет взвешенных частиц мочи в счетной камере после центрифугирования и подсчет в счетной камере элементов нецентрифугированной мочи, а также 2 варианта автоматического метода исследования: метод анализа микрофотографий в камере или потоке и метод проточной цитофлуориметрии.

В качестве одного из наиболее распространенных мануальных методов подсчета взвешенных частиц в Руководстве приводится стандартизированный метод исследования осадка мочи под покровным стеклом. Важным условием при реализации этого метода является строгая стандартизация каждого этапа: для центрифугирования отбирается точный объем мочи; процесс центрифугирования осуществляется с соблюдением строгих условий: при 400g в течение 5 мин; удаляется точный объем надосадочной жидкости; осадок ресуспендируется до точного конечного объема; для микроскопии используется покровное стекло с известными размерами; микроскопия основана на применении фазово-контрастной оптики.

Традиционно для анализа мочи используются пробирки конической формы, которые позволяют легко сливать надосадочную жидкость после центрифугирования. Однако круглодонные пробирки имеют ряд преимуществ перед коническими: круглое дно позволяет бережно ресуспендировать осадок, не повреждая клеточные элементы и цилиндры. Поэтому при процедуре подготовки пробы для подсчета элементов мочевого осадка методом световой микроскопии рекомендуется использовать пробирки с круглым дном [19].

При исследовании клеточных элементов мочевого осадка с диагностической точки зрения важно проводить дифференциацию эритроцитов на предмет того, являются ли они изоморфными (неизмененными) или дисморфными (измененными). Изоморфные эритроциты свидетельствуют о кровотечении из мочевыводящих путей, в то время как дисморфные эритроциты позволяют предполагать наличие кровотечения на уровне почечных клубочков. Для оценки морфологии эритроцитов с погрешностью 10% требуется подсчет не менее 100 эритроцитов [20]. Повреждение почек диагностируется также при выявлении в моче патологических цилиндров или клеток почечного эпителия [21].

Наличие кристаллов в моче в большинстве случаев является следствием временного пересыщения, вызванного, например, пищей, богатой уратами или оксалатами, либо изменениями состояния мочи *in vitro*, связанными с пониженной температурой или сдвигами pH образца во время хранения. Поэтому проводить идентификацию кристаллов в образцах мочи всех пациентов нецелесообразно. Следует уделять внимание тем патологическим состояниям, при которых идентификация кристаллов действительно имеет клиническое значение, например при рецидивирующей почечно-каменной болезни, а также в случае острого повреждения почек, развивающегося вследствие острой мочекишечной нефропатии или отравления этиленгликолем [22, 23]. Идентификация кристаллов имеет диагностическое значение и в педиатрической практике при подозрении на появление атипичных кристаллов, связанных с нарушением метаболизма (например, обмена аминокислот).

В связи с этим информацию о необходимости выявления и идентификации кристаллов в моче необходимо включать в запрос на исследование – в тех случаях, когда это действительно требуется для постановки диагноза заболевания.

Идентификация частиц осадка мочи требует применения оптического метода, позволяющего отличить форменные элементы от их фона. Световая микроскопия неокрашенных препаратов не может в полном объеме обеспечить обнаружение бактерий, эритроцитов, гиалиновых цилиндров и, следовательно, не может использоваться для улучшенной дифференциации элементов. Для обнаружения и распознавания элементов мочевого осадка рекомендуется фазово-контрастная микроскопия [24]. Но следует отметить, что, в отличие от клеточных элементов, морфологию кристаллов лучше оценивать с помощью световой, а не фазово-контрастной оптики. Дополнительно для дифференциации ядродержащих клеток можно исследовать осадки мочи, окрашенные суправитально.

В сравнении с визуальной микроскопией более высокой аналитической надежностью при подсчете элементов мочи обладают автоматизированные анализаторы мочи во многом благодаря возможности подсчета частиц в большем объеме биологической жидкости. Кроме этого, автоматизация упрощает дифференциацию элементов и повышает эффективность лабораторного процесса, поскольку после автоматизированного подсчета частиц визуальная микроскопия осадка мочи требуется только в отдельных случаях. К тому же автоматизация позволяет выполнять анализ мочи стандартизированным, быстрым и менее зависимым от оператора методом [25].

Представленная табл. 4 содержит перечень рекомендаций по совершенствованию клинично-лабораторного исследования взвешенных частиц мочи методом микроскопии и с применением автоматических анализаторов [2].

Внедрение автоматизированных систем анализа взвешенных частиц мочи позволило оптимизировать диагностику инфекций мочевыводящих путей (ИМП). Так, при подозрении на ИМП бактериологическое исследование следует выполнять лишь в тех случаях, когда имеются показания для проведения такого рода исследования.

**Таблица 4**  
**Рекомендации по исследованию элементов осадка мочи**  
**Table 4**  
**Recommendations for urinary sediment elements testing**

| Рекомендации                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Уровень доказательности |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Анализ элементов мочи имеет важное значение при диагностике инфекций мочевыводящих путей, гематурии и заболеваний почек                                                                                                                                                                                                                  | A (1)                   |
| Стандартная единица измерения концентрации взвешенных частиц в единице объема мочи – частицы/литр (единица SI).                                                                                                                                                                                                                          | C (1)                   |
| Для выявления заболеваний почек у пациентов с низким или высоким риском протеинурии рекомендуется проводить автоматизированный подсчет элементов мочи либо визуальную микроскопию мочевого осадка                                                                                                                                        | B (1)                   |
| Кристаллы не рекомендуется исследовать во всех образцах мочи. В определенных ситуациях наличие в моче кристаллов может указывать на наследственное или метаболическое заболевание, приводящее к образованию камней или к почечной недостаточности. Но чаще всего кристаллы или аморфный осадок мешают идентификации других частиц в моче | A (1)                   |
| Для микроскопии мочи рекомендуется фазово-контрастная оптика                                                                                                                                                                                                                                                                             | A (1)                   |
| Автоматические анализаторы осадка мочи перед внедрением в повседневную практику должны быть валидированы с учетом характеристик, заявленных производителем                                                                                                                                                                               | A (1)                   |

Поэтому для оптимизации диагностического поиска и снижения нагрузки на микробиологические лаборатории Руководство-2023 предлагает использовать чувствительные процедуры микробиологического скрининга. К методам, которые могут быть использованы для этих целей, предъявляются определенные требования: диагностическая чувствительность не менее 95% при уровне бактериурии  $\geq 10^5$  КОЕ/мл или  $>80\%$  при уровне бактериурии  $\geq 10^3$  КОЕ/мл, диагностическая специфичность не менее 50%. В том случае если при использовании метода, отвечающего указанным выше требованиям, получен отрицательный результат, то выполнять бактериологический посев не имеет смысла.

Такой подход рекомендован при скрининге бессимптомной бактериурии в клинически значимых группах, например у беременных. Рекомендуется использовать экспресс-методы с аналитической чувствительностью  $>90\text{--}95\%$  при уровне бактериурии  $10^5$  КОЕ/мл (что соответствует  $10^8$  КОБ/л), а в случае положительных результатов – проводить посеvy мочи с целью подтверждения. Следует подчеркнуть, что наличие бактериурии ( $\geq 10^5$  КОЕ/мл) без проявления клинических симптомов у беременных ассоциировано с повышенным риском восходящей инфекции, вплоть до пиелонефрита, преждевременных родов и антенатальной гибели плода. Поэтому беременным женщинам показаны скрининг бессимптомной бактериурии и ее лечение. Аналогичные подходы следует применять и к пациентам перед урологическими вмешательствами, в остальных случаях скрининг бессимптомной бактериурии нецелесообразен.

В обновленном Руководстве-2023 подчеркивается необходимость рационального использования различных методов для выполнения клинического анализа мочи, что позволяет оптимизировать как диагностический поиск, так и расходы на этот поиск. В качестве первого шага рекомендовано исследование с использованием многофункциональных тест-полосок, после чего в зависимости от результата тестирования и клинической ситуации принимается решение о необходимости дальнейшего количественного измерения биохимических параметров и/или взвешенных частиц мочи. При диагностике инфекции мочевыводящих путей и принятии решения о целесообразности бактериологического посева следует ориентироваться на результаты скринингового метода оценки бактериурии.

Таким образом, представленные в Руководстве рекомендации направлены не только на повышение качества клинико-лабораторного исследования мочи, но и на оптимизацию процесса исследования и снижение материальных затрат. Стандартизация и верифицированное качество всех этапов клинико-лабораторного исследования мочи – от назначения исследования до выдачи его результата – представляют собой общую профессиональную задачу, объединяющую специалистов клинико-диагностических лабораторий и врачей-клиницистов.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Guyatt G.H., Oxman A.D., Vist G.E. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2008;336(7650):924–926. doi: 10.1136/bmj.39489.470347.AD
2. Kouri T., Hofmann W., Falbo R. The EFLM European Urinalysis Guideline 2023. *Clin Chem Lab Med*. 2024;62(9):1653–1786. doi: 10.1515/cclm-2024-0070
3. Levin A., Stevens P.E., Bilous R.W. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*. 2013;3(1):1–150. Available at: <http://www.kidney-international.org> (accessed 2 June 2025).

4. Czerwinski A.W., Wilkerson R.G., Merrill J.A. Further evaluation of the Griess test to detect significant bacteriuria. Part II. *Am J Obstet Gynecol.* 1971;110(5):677–81. doi: 10.1016/0002-9378(71)90253-5
5. Manoni F., Gessoni G., Alessio M.G. Mid-stream vs. first-voided urine collection by using automated analyzers for particle examination in healthy subjects: an Italian multicenter study. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(4):679–684. doi: 10.1515/CCLM. 2011.823
6. Triger D.R., Smith J.W.G. Survival of urinary leucocytes. *J Clin Path.* 1966;19(5):443–447. doi: 10.1136/jcp.19.5.443
7. Kierkegaard H., Feldt-Rasmussen U., Hoerder M. Falsely negative urinary leukocyte counts due to delayed examination. *Scand J Clin Lab Invest.* 1980;40(3):259–261. doi: 10.3109/00365518009095576
8. Visseren F.L.J., Mach F., Smulders Y.M. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J.* 2021;42(34):3227–3337. doi: 10.1093/eurheartj/ehab484
9. Wehlou C., Speeckaert M., Fiers T.  $\alpha$ 1-Microglobulin/albumin ratio may improve interpretation of albuminuria in statin-treated patients. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(7):1529–1534. doi: 10.1515/cclm-2012-0798
10. Hofmann W., Ehrlich J.H.H., Guder W.G. Diagnostic pathways for exclusion and diagnosis of kidney diseases. *Clin Lab.* 2012;58(9–10):871–889. doi: 10.7754/Clin.Lab.2012.110914
11. Regeniter A., Siede W.H., Scholer A. Interpreting complex urinary patterns with MDI LABLINK: a statistical evaluation. *Clin Chim Acta.* 2000;297(1–2):261–273. doi: 10.1016/s0009-8981(00)00252-7
12. Pradella M., Dorizzi R.M., Rigolin F. Relative density of urine: methods and clinical significance. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1988;26(3):195–242. doi: 10.3109/10408368809105890
13. Sands J.M., Layton H.E. The physiology of urinary concentration: an update. *Semin Nephrol.* 2009;29(3):178–195. doi: 10.1016/j.semnephrol.2009.03.008
14. Perrier E., Demazières A., Girard N. Circadian variation and responsiveness of hydration biomarkers to changes in daily water intake. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113(8):2143–2151. doi: 10.1007/s00421-013-2649-0
15. Kamel K.S., Halperin M.L. Use of urine electrolytes and urine osmolality in the clinical diagnosis of fluid, electrolytes, and acid-base disorders. *Kidney Int Rep.* 2021;6(5):1211–1224. doi: 10.1016/j.ekir.2021.02.003
16. Refardt J., Winzeler B., Christ-Crain M. Diabetes insipidus: an update. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2020;49(3):517–531. doi: 10.1016/j.jec.2020.05.012
17. Sayed N.A., Aleppo G., Arora V.R. Classification and diagnosis of diabetes: standards of care in diabetes – 2023. *Diabetes Care.* 2023;46(1):19–40. doi: 10.2337/dc23-S002
18. Storey H.L., van Pelt M.H., Bun S. Diagnostic accuracy of self-administered urine glucose test strips as a diabetes screening tool in a low-resource setting in Cambodia. *BMJ Open.* 2018;8(3):e019924. Available at: <http://bmjopen.bmj.com> (accessed 2 June 2025). doi: 10.1136/bmjopen-2017-019924
19. Koivula T., Gronroos P., Gavert J. Basic urinalysis and urine culture: finnish recommendations from the working group on clean midstream specimens. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1990;200:26–33. doi: 10.3109/00365519009090552
20. Fogazzi G., Ponticelli C. Microscopic haematuria diagnosis and management. *Nephron.* 1996;72(2):125–134. doi: 10.1159/000188830
21. Perazella M.A. The urine sediment as a biomarker of kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(5):748–55. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.02.342
22. Daudon M., Hennequin C., Boujelben G. Serial crystalluria determination and the risk of recurrence in calcium stone formers. *Kidney Int.* 2005;67(5):1934–1943. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00292.x
23. Frochot V., Daudon M. Clinical value of crystalluria and quantitative morphoconstitutional analysis of urinary calculi. *Int J Surg.* 2016;36:624–632. doi: 10.1016/j.ijsu.2016.11.023
24. Fogazzi G.B., Delanghe J. Microscopic examination of urine sediment: phase contrast versus bright field. *Clin Chim Acta.* 2018;487:168–73. doi: 10.1016/j.cca.2018.09.036
25. Oyaert M., Delanghe J. Progress in automated urinalysis. *Ann Lab Med.* 2019;39(1):15–22. doi: 10.3343/alm.2019.39.1.15



Сыров Г.А.<sup>1</sup>✉, Титилкина А.А.<sup>2</sup>, Литвиненко А.Д.<sup>3</sup>, Щенникова З.Р.<sup>2</sup>, Ильина К.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

<sup>2</sup> Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

<sup>3</sup> Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

<sup>4</sup> Тверской государственный медицинский университет, Тверь, Россия

## Современные стратегии диагностики аутоиммунных заболеваний: обзор литературы

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Сыров Г.А., Титилкина А.А., Литвиненко А.Д. – концепция статьи; Щенникова З.Р., Ильина К.В. – сбор и обработка данных; Сыров Г.А., Титилкина А.А., Литвиненко А.Д. – написание текста; Сыров Г.А., Титилкина А.А. – редактирование.

Подана: 25.03.2025

Принята: 08.07.2025

Контакты: grisha.syrov@rambler.ru

### Резюме

В статье рассмотрены современные подходы к диагностике аутоиммунных заболеваний (АИЗ), объединяющие традиционные методы серологического анализа с высокотехнологичными молекулярными и мультиомными инструментами. Подчеркивается гетерогенность клинических проявлений АИЗ и сложность их дифференциальной диагностики в условиях отсутствия универсальных биомаркеров. Указываются основные направления развития лабораторной диагностики, включая оценку уровня аутоантител, провоспалительных цитокинов и маркеров тканевого повреждения. Особое внимание уделено применению мультиплексных технологий, проточной цитометрии и иммуноферментного анализа для мониторинга активности воспалительного процесса. Описаны достижения в разработке биосенсоров, способных определять ключевые маркеры АИЗ с высокой чувствительностью и специфичностью в реальном времени. Представлены примеры применения сенсорных платформ при ревматоидном артрите, целиакии, рассеянном склерозе и системной красной волчанке. Рассматриваются перспективы использования одноклеточного РНК-секвенирования, протеомики и анализа экзосом для выявления органоспецифичных молекулярных признаков аутоиммунного воспаления. Описаны результаты исследований, подтверждающих высокую точность установления диагноза при использовании машинного обучения. Подчеркиваются сложности, связанные с высокой стоимостью молекулярно-генетических методов и ограниченной доступностью технологий для большинства медицинских учреждений. Обозначены перспективы перехода к персонализированной диагностике на основе молекулярного профиля пациента.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания, диагностика, аутоантитела, биосенсоры, мультиомика, персонализированная медицина, машинное обучение, биомаркеры

Syrov G.<sup>1</sup>✉, Titilkina A.<sup>2</sup>, Litvinenko A.<sup>3</sup>, Shchennikova Z.<sup>2</sup>, Ilina K.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia

<sup>2</sup> Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russia

<sup>3</sup> Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

<sup>4</sup> Tver State Medical University, Tver, Russia

## Contemporary Strategies for Diagnosing Autoimmune Diseases: A Literature Review

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Syrov G., Titilkina A., Litvinenko A. – article concept; Shchennikova Z., Ilina K. – data collection and processing; Syrov G., Titilkina A., Litvinenko A. – text writing; Syrov G., Titilkina A. – editing.

Submitted: 25.03.2025

Accepted: 08.07.2025

Contacts: grisha.syrov@rambler.ru

### Резюме

The article discusses contemporary strategies for diagnosing autoimmune diseases (AIDs), integrating conventional serological methods and advanced molecular and multi-omic technologies. The clinical heterogeneity of AIDs and the challenges of differential diagnosis due to the lack of universal biomarkers are emphasized. Key directions in laboratory diagnostics are identified, including the evaluation of autoantibodies, proinflammatory cytokines, and tissue damage markers. Particular attention is given to the application of multiplex technologies, flow cytometry, and enzyme-linked immunosorbent assays for monitoring disease activity. Advances in designing biosensors enabling to detect key AID markers with high sensitivity and specificity in real time are described. Examples of sensor platforms for rheumatoid arthritis, celiac disease, multiple sclerosis, and systemic lupus erythematosus are presented. Promising applications of single-cell RNA sequencing, proteomics, and exosome analysis to detect organ-specific molecular patterns of autoimmune inflammation is discussed. Study findings confirming the high predictive accuracy of machine learning-based diagnostic models are described. Challenges associated with both high costs of molecular genetic technologies and their limited availability for most healthcare settings are highlighted. Prospects for switching to personalized diagnostics based on individual molecular profiles are outlined.

**Keywords:** autoimmune diseases, diagnostics, autoantibodies, biosensors, multi-omics, personalized medicine, machine learning, biomarkers

### ■ ВВЕДЕНИЕ

Аутоиммунные заболевания (АИЗ) представляют собой гетерогенную группу хронических воспалительных состояний, обусловленных нарушениями как врожденно-го, так и адаптивного иммунного ответа, что приводит к повреждению собственных тканей организма [1]. Патогенез АИЗ включает взаимодействие генетических, эпигенетических факторов и факторов внешней среды, провоцирующих активацию аутоагрессивных клонов лимфоцитов и продукцию патогенных аутоантител [2]. Наряду с клинической полиорганностью, для АИЗ характерны вариабельность течения

и отсутствие универсальных биомаркеров, что существенно затрудняет своевременное выявление и мониторинг.

По результатам крупного мультицентрового исследования, проведенного в США, было установлено, что как минимум одно АИЗ диагностировано у 15,44 млн человек, что составляет 4,6% от общей численности населения США на 2022 год ( $n=333,3$  млн; 95% доверительный интервал (ДИ) 15 437 949–15 442 501) [3]. Уточненная распространенность среди женщин составила 5,8% ( $n=9,71$  млн; 95% ДИ 9 680 412–9 750 250), а среди мужчин – 3,5% ( $n=5,72$  млн; 95% ДИ 5 695 208–5 754 578). В 63% случаев диагноз АИЗ устанавливался у женщин, что подтверждает ранее описанные данные о более высокой восприимчивости женского организма к аутоиммунной патологии. Особое значение имеет феномен множественности АИЗ: согласно данному исследованию, у 34% пациентов было выявлено более одного АИЗ, 24% страдали двумя нозологиями, 8% – тремя, а 2% – четырьмя и более. Полученные данные подчеркивают необходимость комплексного подхода к диагностике с учетом высокой вероятности сопутствующих иммунопатологий у одного и того же пациента. Наиболее распространенными формами АИЗ, по результатам данного исследования, являются ревматоидный артрит, псориаз, сахарный диабет 1-го типа, болезнь Грейвса и аутоиммунный тиреоидит.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ современных стратегий диагностики АИЗ на основе сведений из источников литературы последних лет.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения настоящего исследования был выполнен анализ научной литературы, опубликованной в период с 2019 года по настоящее время, с целью выявления актуальных подходов к диагностике АИЗ. Поиск источников осуществлялся в электронных базах данных PubMed, Scopus, Web of Science, eLibrary и Google Scholar. Отбор публикаций проводился с использованием следующих ключевых слов на русском языке: «аутоиммунные заболевания», «диагностика», «современные методы диагностики», «иммунология», «биомаркеры», «дифференциальная диагностика», а также соответствующих английских эквивалентов: autoimmune diseases, diagnostics, modern diagnostic methods, immunology, biomarkers, differential diagnosis. В исследование были включены оригинальные статьи, систематические обзоры, метаанализы и клинические рекомендации, отражающие современные концепции и инструментальные подходы к верификации АИЗ. Были исключены статьи с низким качеством доказательности данных и малым объемом выборки.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ

### **Классификация аутоиммунных заболеваний и особенности их диагностики**

Заболевания аутоиммунной природы представляют собой обширную группу патологий, которые подразделяются на органоспецифические и системные, в зависимости от локализации и характера иммунопатологического процесса [4]. Органоспецифические АИЗ характеризуются поражением одного органа или ткани с преимущественным участием антигенов данной анатомической области.

К ним относятся: сахарный диабет 1-го типа, аутоиммунный тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, целиакия и первичный билиарный холангит. Системные АИЗ поражают соединительную ткань и сосудистое русло с вовлечением множества органов и систем. Примерами таких заболеваний являются: системная красная волчанка, системная склеродермия, дерматомиозит, полиартериит, синдром Шегрена и ревматоидный артрит. В последние годы активно изучаются также пограничные формы АИЗ, обладающие признаками как системного, так и органоспецифического воспаления, а также так называемые перекрестные синдромы (overlap-синдромы), затрудняющие диагностику.

Диагностика АИЗ базируется на комплексной оценке клинической симптоматики, лабораторных показателей и инструментальных данных [5]. Основными методами лабораторной диагностики являются определение аутоантител (в том числе антинуклеарных, антинейтрофильных цитоплазматических, антикардиолипидных и других), иммуноблоттинг, иммунофлюоресцентный анализ, а также оценка уровня провоспалительных цитокинов. В ряде случаев проводится определение HLA-гена (Human Leukocyte Antigen – человеческий лейкоцитарный антиген), ассоциированного с конкретной АИЗ, например HLA-B27 при анкилозирующем спондилите. Следует отметить, что ни один из известных биомаркеров не обладает абсолютной специфичностью, что требует сочетания результатов с клинической картиной, данными визуализирующих методов и функциональных проб.

### Современные лабораторные методы диагностики

Современные лабораторные методы диагностики АИЗ направлены на выявление специфических иммунологических маркеров, отражающих активацию патологического аутоиммунного ответа. К числу наиболее информативных и широко применяемых методов относится определение аутоантител (см. таблицу) [6]. Методы их определения включают непрямую иммунофлюоресценцию, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг и мультиплексные иммунологические панели.

#### Аутоантитела при различных АИЗ Autoantibodies in various AIDs

| Аутоантитело                                        | Ассоциированное заболевание(-я)                                                               |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Антинуклеарные антитела                             | Системная красная волчанка, системная склеродермия, синдром Шегрена, дерматомиозит            |
| Антинейтрофильные цитоплазматические антитела       | Гранулематоз с полиангиитом, микроскопический полиангиит                                      |
| Антитела к двойной спирали ДНК                      | Системная красная волчанка                                                                    |
| Рибонуклеопротеиновый комплекс                      | Синдром Шегрена, подострая кожная волчанка, неонатальная волчанка                             |
| Нуклеарный фосфопротеин                             | Синдром Шегрена                                                                               |
| Ядерный фермент                                     | Системная склеродермия                                                                        |
| Цитоплазматический фермент                          | Идиопатические воспалительные миопатии, полимиозит, антисинтетазный синдром                   |
| Ревматоидный фактор                                 | Ревматоидный артрит (также может выявляться при других хронических воспалительных состояниях) |
| Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду | Ревматоидный артрит (высокая специфичность)                                                   |

Несмотря на наличие широкого спектра серологических маркеров, ассоциированных с конкретными АИЗ, их применение ограничено отсутствием универсальности и специфичности. Выявление аутоантител, указанных в таблице, способствует уточнению диагноза, однако данные биомаркеры не обладают достаточной чувствительностью или предсказательной ценностью во всех клинических сценариях, что подчеркивает необходимость дальнейшего поиска комплексных диагностических алгоритмов и более информативных биомаркеров, способных учитывать гетерогенность и полиорганность аутоиммунной патологии.

Анализ уровней провоспалительных и регуляторных цитокинов (например, ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-17, а также фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерферона- $\gamma$ ) применяется для оценки активности заболевания, мониторинга ответа на терапию и стратификации риска прогрессирования [7]. Определение цитокинового профиля осуществляется методом мультиплексного иммуноанализа ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – анализ с ферментным иммунологическим мечением) или с помощью технологий на основе проточной цитометрии.

С учетом сложности патогенеза АИЗ и высокой вариабельности иммунных маркеров в последние годы активное развитие получили технологии высокочувствительного обнаружения биомолекул [8]. К подобным технологиям относятся биосенсоры – устройства, которые обеспечивают экспресс-диагностику заболевания с высокой специфичностью. Их внедрение направлено на повышение эффективности первичного скрининга и уточняющей диагностики, особенно в условиях ограниченных лабораторных ресурсов.

Обзор Teniou A. посвящен анализу современных достижений в области разработки биосенсоров для диагностики АИЗ [9]. Авторы обобщили и проанализировали источники литературы, в которых представлены разработки биосенсоров для выявления биомаркеров различных АИЗ, таких как целиакия, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, системная красная волчанка и др. Рассматривались как традиционные биорецепторы (антитела, антигены, нуклеиновые кислоты), так и новые синтетические молекулы (аптамеры, молекулярно импринтированные полимеры). Особое внимание было уделено типам трансдюсеров (электрохимические, оптические, пьезоэлектрические, термометрические), их функциональным характеристикам, пределам обнаружения и применимости *in vitro* и *in vivo*. В данной работе были продемонстрированы значительные достижения в снижении пределов обнаружения ключевых биомаркеров (до фемтограммов на мл), повышении специфичности к антигенам, а также в разработке портативных платформ для диагностики на месте оказания медицинской помощи. Например, сенсоры на основе ферроцена и наночастиц золота обеспечивают обнаружение аутоантител к тканевой трансклутаминазе при целиакии с чувствительностью до 0,7 Ед/мл. Для рассеянного склероза представлены сенсоры для ИЛ-12, основного белка миелина, легкой цепи нейрофиламентов и микротрубочкового белка с пределами обнаружения до 0,016 мкг/л. Для диагностики ревматоидного артрита представлены сенсоры для антител к циклическому цитруллинированному пептиду, ревматоидному фактору, ИЛ-6, фактору некроза опухоли- $\alpha$  с чувствительностью до 0,2 нг/л. Для системной красной волчанки разработаны платформы для определения антитела к двойной спирали ДНК с пределами обнаружения до 0,005 мкг/л.

Приведены данные по мультиплексным биосенсорам с одновременным определением нескольких аутоантител и цитокинов, включая ИЛ-6, фактор некроза опухоли- $\alpha$ . В отдельных случаях устройства показали сопоставимую или более высокую эффективность по сравнению с таковой, достигаемой применением коммерческих ELISA-наборов. Авторы делают вывод о том, что биосенсоры представляют собой перспективную альтернативу традиционным методам диагностики АИЗ за счет высокой чувствительности и бысродействия. Однако для их внедрения в широкую клиническую практику требуется стандартизация, снижение производственных затрат, адаптация к анализу реальных образцов и повышение воспроизводимости.

Одним из векторов современного развития диагностики АИЗ является применение интегративных молекулярных и мультиомных технологий, обеспечивающих высокоточную идентификацию биомаркеров с органоспецифичной диагностической и прогностической значимостью [10]. Особую актуальность приобретает обзор Fenton K.A. et al., направленный на систематизацию современных методов молекулярной диагностики системной красной волчанки [11]. В рамках работы был проведен анализ более чем 680 публикаций, включая 488 работ последних 10 лет, охватывающих использование мультиомных технологий, транскриптомики, секвенирования одноклеточной РНК (single-cell RNA sequencing – scRNA-seq), молекулярной визуализации и жидкостной биопсии при системной красной волчанке.

Исследование подчеркивает возрастающую роль высокоточных диагностических методов, таких как RNA-seq (RNA sequencing – РНК-секвенирование), scRNA-seq и протеомика, в выявлении органоспецифичных маркеров воспаления, особенно при поражении почек (люпус-нефрит), кожи, легких и мозга. Выявлены перспективные к применению «диагностические» молекулы: VCAM1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1 – сосудистая клеточная адгезионная молекула 1), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1 – межклеточная адгезионная молекула 1), ИЛ-16, MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma Translocation Protein 1 – белок транслокации лимфомы слизистой ассоциированной лимфоидной ткани 1), CD163 (Cluster of Differentiation 163 – кластер дифференциации 163), TWEAK (TNF-like Weak Inducer of Apoptosis – слабый индуктор апоптоза, подобный фактору некроза опухоли), а также метаболиты и компоненты экзосом (например, miR-146a), являющиеся ключевым компонентом диагностических систем. Кроме того, обоснована значимость разработки и внедрения интегрированных биоинформационных моделей на основе машинного обучения и многомерных данных. Авторы подчеркивают потенциал создания комбинированных панелей биомаркеров, основанных на данных мультиомного анализа, для ранней диагностики, стратификации риска и оценки ответа на терапию.

Они отмечают, что в условиях высокой гетерогенности системной красной волчанки единого универсального биомаркера не существует. Однако интеграция современных методов (scRNA-seq, пространственной транскриптомики, молекулярной визуализации и жидкостной биопсии) открывает путь к персонализированной диагностике и терапии АИЗ, повышая точность мониторинга и улучшая прогнозирование заболевания у пациентов.

В статье Kruta J. et al. представлена разработка и апробация многоуровневого подхода к диагностике АИЗ посредством интеграции клинических, лабораторных и мультиомных данных с последующим применением методов машинного

обучения [12]. Цель исследования заключалась в разработке и апробации вычислительной среды, способной обрабатывать и анализировать разнородные данные: клинические, лабораторные, геномные, иммуномические и метаболомные – для прецизионной классификации пациентов с АИЗ, включая системную красную волчанку и ревматоидный артрит. В рамках данного исследования была реализована интеграционная платформа CNNMF (Clinical and multi-omics Neural Machine-learning Framework – нейросетевая машинообучающая платформа для анализа клинических и мультиомных данных), предназначенная для анализа клинических и мультиомных данных. Процесс анализа включал несколько этапов. На первом из них проводились сбор и предварительная обработка данных, включающих 84 признака из различных источников: 24 клинических, 13 лабораторных, 9 геномных, 21 иммуномический и 17 метаболомических. Все данные были нормализованы, категоризированы и закодированы. Далее осуществлялось снижение размерности и отбор признаков с использованием методов статистического уменьшения размерности, а также рас-пределительного анализа V и J генов иммуноглобулиновых тяжелых цепей и анализа CDR3-клонов (Complementarity Determining Region 3 – наиболее вариабельный участок в структуре антител или Т-клеточных рецепторов), предназначенного для изучения экспоненциальных и степенных распределений в популяциях В-клеток. На следующем этапе производилась генерация синтетических данных и балансировка классов. Завершающим этапом стало применение моделей машинного обучения, где были протестированы 5 алгоритмов как для отдельных типов данных, так и для их интеграции, что позволило оценить эффективность предложенной платформы для комплексного анализа данных.

Интеграция данных обеспечила существенный прирост точности классификации. При использовании всех типов данных медианная точность достигала 96% по сравнению с 75–80% при анализе только клинических данных. ROC-анализ (метод оценки качества бинарной классификации) показал увеличение площади AUC при добавлении лабораторных и геномных данных к клиническим. Наивысшие значения AUC (Area Under the Curve – площадь под ROC-кривой) зарегистрированы в моделях, использующих иммуномические и метаболомные признаки. Идентифицированы наиболее информативные признаки по значимости (feature importance), среди которых преобладали метаболомные и иммуномические данные. У пациентов с аутоиммунной патологией было зафиксировано смещение в распределении В-клеточных рецепторов от равномерного (экспоненциального) к степенному, что свидетельствует о преобладании ограниченного числа активных клонов и может служить потенциальным прогностическим биомаркером. Были построены мультиклассовые модели классификации с высокой чувствительностью к различению здоровых пациентов и пациентов с системной красной волчанкой и ревматоидным артритом, а также продемонстрирована применимость платформы к другим АИЗ при минимальной модификации входных данных. Разработанная в ходе данного исследования интеграционная платформа демонстрирует высокую эффективность и потенциальную возможность применения в персонализированной медицине, включая создание цифровых двойников пациентов и внедрение в системы поддержки клинических решений. Авторы подчеркивают необходимость дальнейшей стандартизации процедур обработки и кодирования мультиомных данных, а также расширения применения методологии в других нозологических группах.

## ■ ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на достигнутый прогресс в области диагностики АИЗ, проблема своевременного выявления данных состояний остается актуальной, что обусловлено как биологической сложностью иммунопатогенеза, так и ограниченной чувствительностью традиционных методов исследования. Диагностический поиск затрудняется фенотипическим полиморфизмом, сходством симптомов АИЗ с другими хроническими воспалительными и инфекционными заболеваниями, а также частым наличием сопутствующих иммунных нарушений. Отсутствие универсальных биомаркеров требует от клиницистов применения мультидисциплинарного подхода при интерпретации лабораторных и визуализирующих данных.

В условиях нарастающей доказательной базы, касающейся роли мультиомных данных и машинного обучения в клинической медицине, диагностические стратегии при АИЗ претерпевают фундаментальные изменения. Интеграция клинической, иммунологической, геномной и метаболомной информации позволяет не только повысить точность дифференциальной диагностики, но и приблизиться к концепции персонифицированной медицины, ориентированной на молекулярный профиль конкретного пациента. Однако такая трансформация требует решения ряда методологических и организационных задач.

Существенным барьером для внедрения интегративных платформ в рутинную практику остается отсутствие единых протоколов стандартизации данных, включая форматы хранения, методы кодирования и обработки, что особенно актуально при работе с мультиомными наборами: высокая вариативность детектируемых ими биологических сигналов сопряжена с риском искажения или потери диагностически значимой информации. Широкое применение алгоритмов машинного обучения и создание цифровых двойников пациента предполагает наличие высококачественных обучающих выборок, репрезентативных по полу, возрасту и этнической принадлежности, что в настоящее время реализуется лишь частично. Кроме того, из-за высокой стоимости технологий секвенирования, протеомного анализа и молекулярной визуализации возникает вопрос о доступности данных методов для большинства медицинских учреждений.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные подходы к диагностике АИЗ демонстрируют устойчивую тенденцию к интеграции молекулярно-генетических, иммунологических и мультиомных методов, что существенно повышает информативность диагностического процесса. Анализ данных источников литературы подтвердил высокую чувствительность и прогностическую значимость биомаркеров, получаемых с использованием технологий биосенсорики, протеомики, транскриптомики и одноклеточного секвенирования. Перспективным направлением является применение вычислительных платформ на основе методов машинного обучения, способных обрабатывать гетерогенные данные и обеспечивать точную стратификацию пациентов. Однако для внедрения подобных систем в рутинную практику необходима стандартизация методик, унификация протоколов и обеспечение доступности высокотехнологичных исследований.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Miller F.W. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention. *Curr Opin Immunol.* 2023;80:102266.
2. Pisetsky D.S. Pathogenesis of autoimmune disease. *Nat Rev Nephrol.* 2023;19:509–524.
3. Abend A.H., He I., Bahroos N., et al. Estimation of prevalence of autoimmune diseases in the United States using electronic health record data. *J Clin Invest.* 2024;135(4):e178722.
4. Untangling a Complex Web: How to Categorize Autoimmune Disease. URL: <https://www.autoimmuneinstitute.org/articles/untangling-a-complex-web-how-to-categorize-autoimmune-disease> (date of access: 25.03.2025)
5. Arévalo B., Serafin V., Garranzo-Asensio M., et al. Early and differential autoimmune diseases diagnosis by interrogating specific autoantibody signatures with multiplexed electrochemical bioplatfroms. *Biosensors and Bioelectronics: X.* 2023;13:100325.
6. Xiao Z.X., Miller J.S., Zheng S.G. An updated advance of autoantibodies in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews.* 2021;20(2):102743.
7. Moudgil K.D., Choubey D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31(10):695–703.
8. Yeganeh O., Dalir A.E., Razi S.S., et al. Biosensors for autoimmune diseases. *Clinica Chimica Acta.* 2025;565:119998.
9. Teniou A., Rhouati A., Marty J.L. Recent Advances in Biosensors for Diagnosis of Autoimmune Diseases. *Sensors.* 2024;24(5):1510.
10. Barturen G., Babaei S., Català-Moll F., et al. Integrative Analysis Reveals a Molecular Stratification of Systemic Autoimmune Diseases. *Arthritis Rheumatol.* 2021;73(6):1073–1085.
11. Fenton K.A., Pedersen H.L. Advanced methods and novel biomarkers in autoimmune diseases – a review of the recent year's progress in systemic lupus erythematosus. *Front Med (Lausanne).* 2023;10:1183535.
12. Kruta J., Carapito R., Trendelenburg M., et al. Machine learning for precision diagnostics of autoimmunity. *Sci Rep.* 2024;14:27848.