

12. Folch J., Busquets O., Ettcheto M., Sánchez-López E., Castro-Torres R. D., Verdaguer E., Garcia M. L., Olloquequi J., Casadesús G., Beas-Zarate C., Pelegri C., Vilaplana J., Auladell C., Camins A. Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *J. Alzheimers. Dis.*, 2018, vol. 62, no. 3, pp. 1223–1240. doi:10.3233/JAD-170672.
13. Jordan, B. D. The clinical spectrum of sport-related traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurol.*, 2013, vol. 9, no. 4, pp. 222–230.
14. Lamers K. J., Vos P., Verbeek M. M. Protein S100, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res. Bull.*, 2003, vol. 15, pp. 261–264.
15. Ling H., Kara E., Revesz T., Lees A. J., Plant G. T., Martino D., Houlden H., Hardy J., Holton J. L Concomitant progressive supranuclear palsy and chronic traumatic encephalopathy in a boxer. *Acta Neuropathologica Communications*, 2014, vol. 2, no. 24, pp. 1–11.
16. McKee A. C., Daneshvar D. H., Alvarez V. E., Stein T. D. The neuropathology of sport. *Acta Neuropathol.*, 2014, vol. 127, no. 1, pp. 29–51.
17. Patel S. P., Sullivan P. G., Pandya J. D. N-acetylcysteine amide preserves mitochondrial bioenergetics and improves functional recovery following spinal trauma. *Exp. Neurol.*, 2014, vol. 257, pp. 95–105. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.04.026.
18. Tator C. H. Chronic traumatic encephalopathy: how serious a sports problem is it? *Br. J. Sports Med.*, 2014, vol. 48, no. 2, pp. 81–83.
19. Voronkov A. V., Khaled M. M., Khoury E. I., Pozdnyakov D. I. The treatment of traumatic brain injury in experimental animals by pyrimidine derivatives. *International Journal of Advanced Research.*, 2019, vol. 7, no. 3, pp. 799–803.

03.02.03 – Микробиология (медицинские науки)

УДК 616.24-008.8.078

DOI 10.17021/2019.14.3.71.79

© О.В. Кондратенко, Д.А. Викторов,
А.Н. Тороповский, Ю.В. Назарова, А.В. Жестков,
Д.Ф. Сергиенко, С.А. Красовский, 2019

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИЙ *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEX В МОКРОТЕ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ПРИ МУКОВИСЦИДОЗЕ

Кондратенко Ольга Владимировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89, тел.: 8-972-200-55-00, e-mail: helga1983@yandex.ru.

Викторов Денис Александрович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, ООО «ТестГен», Россия, 432072, г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, д. 9, офис 13, тел.: 8-908-477-55-73, e-mail: viktorov_da@mail.ru.

Тороповский Андрей Николаевич, кандидат медицинских наук, генеральный директор, ООО «ТестГен», Россия, 432072, г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, д. 9, офис 13, тел.: 8-927-801-53-33, e-mail: director@testgen.ru.

Назарова Юлия Валерьевна, старший лаборант, ООО «ТестГен», Россия, 432072, г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, д. 9, офис 13, тел.: 8-937-870-27-58, e-mail: nazarova@testgen.ru.

Жестков Александр Викторович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89, тел.: 8-846-260-33-61, e-mail: zhestkovav2015@yandex.ru.

Сергиенко Диана Фикретовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской педиатрии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская д. 121, тел.: (8512) 52-41-43, e-mail: gazken@rambler.ru.

Красовский Станислав Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, лаборатория муковисцидоза, ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства», Россия, 115682, г. Москва, Ореховый бульвар, д. 28; старший научный сотрудник, научно-консультативный отдел муковисцидоза, ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Россия, 115478, г. Москва, Москворечье, стр. 1, тел.: 9-926-273-76-34, e-mail: sa_krasovsky@mail.ru.

Бактерии *Burkholderia cepacia* complex являются наиболее прогностически неблагоприятными патогенами при муковисцидозе. Штаммы характеризуются выраженной трансмиссивностью и способностью к распространению среди пациентов. Раннее выявление указанных бактерий является необходимым условием эрадикации и профилактики распространения в условиях стационара. Исследование мокроты методом полимеразной цепной реакции входит в перечень обследования пациентов с муковисцидозом в Европе, но пока не применяется в рутинной практике в России. Проведена разработка и апробация двух тест-систем для раннего выявления ДНК *Burkholderia cepacia* complex в мокроте методом полимеразной цепной реакции. Полученные результаты позволяют говорить о возможности внедрения указанных исследований в рутинную практику лабораторий центров муковисцидоза в Российской Федерации.

Ключевые слова: муковисцидоз, *Burkholderia cepacia* complex, полимеразная цепная реакция, профилактика.

DEVELOPMENT AND TESTING TEST SYSTEMS FOR THE EARLY DETECTION OF BURKHOLDERIA CEPACIA COMPLEX DNA IN SPUTUM BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN CYSTIC FIBROSIS

Kondratenko Olga V., Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of Department, Samara State Medical University, 89 Chapaevskaya St., Samara, 443099, Russia, tel.: 8-927-200-55-00, e-mail: helga1983@yandex.ru.

Viktorov Denis A., Cand. Sci. (Biol.), Head of Laboratory, TestGene LLC, 9 Inzhenernyy proezd 44, Ulyanovsk, 432072, Russia, tel.: 8-908-477-55-73, e-mail: viktorov_da@mail.ru.

Toropovskiy Andrey N., Cand. Sci. (Med.), General Manager, TestGene LLC, 9 Inzhenernyy proezd 44 bld. 9, Ulyanovsk 432072, Russia, tel.: 8-927-801-53-33, e-mail: director@testgen.ru.

Nazarova Yulia V., Senior laboratory assistant, TestGene LLC, 9 Inzhenernyy proezd 44, Ulyanovsk, 432072, Russia, tel.: 8-937-870-27-58, e-mail: nazarova@testgen.ru.

Zhestkov Aleksandr V., Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department, Samara State Medical University, 89 Chapaevskaya St., Samara, 443099, Russia, tel.: 8-846-260-33-31, e-mail: zhestkovav2015@yandex.ru.

Sergienko Diana F., Dr. Sci. (Med.), Professor of Department, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-41-43, e-mail: gazken@rambler.ru.

Krasovskiy Stanislav A., Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Research Institute of Pulmonology, 28 Orekhovyy bul'var St., Moscow, 115682, Russia; Senior Research Associate, Medico-Genetic Scientific Center named after academician N. P. Bochkov, 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115478, Russia, tel.: 9-926-273-76-34, e-mail: sa_krasovsky@mail.ru.

Burkholderia cepacia complex bacteria are the most prognostically adverse pathogens in cystic fibrosis. Strains are characterized by pronounced transmissibility and ability to spread among patients. Early detection of these bacteria is a necessary condition for eradication and prevention of spread in a hospital. The study of sputum by polymerase chain reaction is included in the list of examinations of patients with cystic fibrosis in Europe, but is not used in routine practice in Russia yet. Development and approbation of 2 test systems for early detection of *Burkholderia cepacia* complex DNA in sputum by polymerase chain reaction was carried out. The results allow to speak of implementing these studies in the routine practice of laboratories of cystic fibrosis centers in the Russian Federation.

Key words: cystic fibrosis, *Burkholderia cepacia* complex, polymerase chain reaction, prevention.

Введение. Сегодня бактерии группы *Burkholderia cepacia* complex (*B. cepacia* complex) являются одними из самых прогностически неблагоприятных патогенов при муковисцидозе (МВ), способных к формированию хронической инфекции, приводящей в 20 % случаев к развитию «серасиасиндрома» [1, 4, 14, 15, 16, 17, 18]. Как правило, появление эпидемических вспышек заболеваемости связано с некоторыми штаммами *B. cenocepacia*, обладающими выраженной трансмиссивностью [9, 19]. Эпидемическое распространение характерно для штаммов *B. cenocepacia*, который, наряду

с *B. multivorans*, выделяется из большинства образцов от пациентов с МВ [8]. К ним относится и штамм *B. cenocepacia* ST 12, ставший причиной эпидемии в центрах МВ Канады и Великобритании, штаммы PHDC и Midwest, клоны которых были обнаружены в американских центрах МВ и клон *B. cenocepacia* ST 32, вышедший из Канады и некоторых европейских стран, включая Чехию [5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 20]. Распространение штаммов *B. cenocepacia* приводило к вспышкам инфицирования и на территории Российской Федерации (РФ). В настоящий момент среди штаммов, выделяемых от пациентов в России, преобладают 2 эпидемических клона *B. cenocepacia*, являющихся потомками клонов *B. cenocepacia* ST 32 и ST 31. Доминирующим из них является клон *B. cenocepacia* ST 709, на долю которого приходится около 77 % всех выделенных штаммов, получивший наибольшее распространение в Центральной России и ставший причиной эпидемических вспышек в Москве (2006–2007) и Кемеровской области (2017). Также выделяется *B. cenocepacia* ST 208, на долю которого приходится 8,92 % штаммов, получивший название «самарского» типа, ввиду его преобладания у пациентов Самарской области и некоторых пациентов Поволжского региона. С распространением этого клона была связана эпидемическая вспышка в центре по лечению МВ в Самарской области в период 2011–2012 гг. Описанные события, явившиеся следствием многих факторов, в том числе и недостаточным уровнем микробиологической диагностики в регионах РФ, привели к значительному увеличению количества инфицированных пациентов (до 30–50 % от всех пациентов центра) [2, 3].

Печальный европейский, а позднее и российский опыт еще раз указывает на необходимость максимально раннего выявления бактерий *B. cenocepacia* complex еще на доклиническом этапе с целью разобщения потоков пациентов и профилактики перекрестного инфицирования. Так, в качестве дополнительного метода детекции штаммов *B. cenocepacia* complex в Чехии с 2001 г. разработана и внедрена тест-система для выявления ДНК возбудителя в нативной мокроте методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [11, 13]. Благодаря внедрению ПЦР-исследования в рутинную практику пражского центра по лечению МВ удалось остановить распространение инфекции, ассоциированной с трансмиссивным штаммом *B. cenocepacia* ST 32. Исчерпывающий поиск подобной тест-системы для выявления ДНК *B. cenocepacia* complex в нативной мокроте методом ПЦР у пациентов с МВ на территории РФ не увенчался успехом. Кроме того, подобные исследования не проводятся ни в одном из российских центров по лечению пациентов с МВ в рутинной практике.

Цель исследования – разработка и последующая апробация тест-систем для раннего выявления ДНК бактерий *Burkholderia cenocepacia* complex в мокроте пациентов с муковисцидозом методом полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы исследования. Разработаны и клинически апробированы две тест-системы для раннего выявления ДНК бактерий *B. cenocepacia* complex в клиническом материале из мокроты пациентов с МВ методом ПЦР. Разработка наборов осуществлялась на базе молекулярно-генетической лаборатории ООО «ТестГен» (Ульяновск, Россия). В результате проведенных исследований были получены специфичные олигонуклеотидные праймеры и TaqMan зонды для ПЦР в реальном времени. Для достижения цели исследования в качестве последовательности-мишени был выбран участок гена *parB* (partitioning protein), длиной 75 п. о. и консервативный для группы *B. cenocepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*. Разработанная тест-система № 1 была предназначена для выявления ДНК *B. cenocepacia* complex в препарате ДНК, полученном из мокроты пациентов с МВ методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. Для разработки тест-системы № 2 был дополнительно отобран участок гена *recA*, специфичный для *B. multivorans*. Разработанная тест-система № 2 предположительно позволяла выявлять ДНК бактерий *B. cenocepacia* и *B. multivorans* по двум оптическим каналам (FAM и HEX) в режиме мультиплексной ПЦР в реальном времени. Протоколы амплификации для проведения ПЦР были оптимизированы экспериментально.

Клиническая апробация указанных тест-систем осуществлялась на базе Клинико-диагностической лаборатории Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. Выделение ДНК из бактериальных культур и проб мокроты проводили с помощью набора реагентов «РеалБест экстракция 100» («Вектор-Бест», Новосибирск, Россия). Параллельно проводилось исследование всех респираторных образцов, включенных в исследование, с помощью микробиологического метода для оценки присутствия в клиническом материале бактерий рода *Burkholderia* с идентификацией выделенных культур с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF (масс-спектрометр «Microflex LT», «Bruker Corporation», США).

Результаты исследования и их обсуждение.

Результаты клинической апробации тест-системы № 1. За период с декабря 2016 г. по май 2017 г. в лаборатории для исследования были отобраны и заморожены 84 пробы мокроты от

81 пациента с МВ. В исследовании приняли участие пациенты из 9 регионов РФ.

Среди проб, включенных в работу, были образцы от пациентов, имеющих высев бактерий *Burkholderia cepacia* complex в анамнезе (рост в 28 (33,3 %) пробах при исследовании в параллельном посеве, среди них 25 (89,3 %) проб – *B. cenocepacia* и 3 (10,7 %) пробы – *B. multivorans*), также 1 (1,2 %) проба от пациента, ранее выделявшего бактерии *B. cepacia* complex из респираторных образцов, но свободного от инфекции в настоящее время. Кроме того, 55 (65,5 %) проб от пациентов, у которых ранее не было случаев выделения штаммов бактерий *B. cepacia* complex в анамнезе.

Процесс постановки проб осуществляли в несколько этапов. В декабре 2016 г. было отобрано 12 (100 %) проб от 12 пациентов Самарской области, среди которых 11 (91,7 %) человек имели хронический высев бактерий *B. cenocepacia* в анамнезе, 1 (8,3 %) пациент никогда ранее не имел случаев выделения бактерий *B. cenocepacia*. Для всех проб от пациентов, имевших высев *B. cenocepacia* в анамнезе, был получен положительный результат, что свидетельствует о высокой диагностической чувствительности апробируемой тест-системы в отношении штаммов *B. cenocepacia*. Проба пациента, ранее не выделявшего *B. cenocepacia* из респираторных образцов, прошла отрицательно.

Постановка 2 партии проб осуществлялась в марте 2017 г. и включала в себя 27 проб от 27 пациентов. Среди них 9 (33,3 %) проб от пациентов Самарской области, 8 (29,6 %) проб – от пациентов из Республики Татарстан, 5 (18,6 %) проб – из Санкт-Петербурга, 2 (7,4 %) пробы – из Москвы и по 1 (3,7%) пробе – из Краснодарского края, Ростовской области и Республики Адыгея. Среди исследованных проб 1 была от пациента, имевшего высев *B. multivorans*, остальные пациенты не имели высева бактерий *B. cepacia* complex в анамнезе. В результате исследования 1 (3,7 %) проба от пациента из Самарской области, не имевшего ранее эпизодов выделения бактерий *B. cepacia* complex в анамнезе, оказалась положительной, но при этом рост бактерий рода *Burkholderia* в параллельном посеве пробы не был получен. Данное обстоятельство, видимо, можно расценивать как техническую ошибку, однако пациент был взят на динамический микробиологический мониторинг. При повторном исследовании другой пробы мокроты от этого пациента в апреле 2017 г. она оказалась отрицательной, как и все последующие посевы мокроты. У пациента из Москвы, имеющего высев *B. multivorans* в параллельном посеве мокроты, ПЦР, напротив, оказалась отрицательной. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что разработанная тест-система не чувствительна в отношении штаммов *B. multivorans*. В апреле 2017 г. были исследованы 4 пробы от 2 (50,0 %) пациентов Самарской области, не имевших высева бактерий рода *Burkholderia* в анамнезе (в том числе от пациента, у которого был получен положительный результат ПЦР при отрицательном посеве), а также от 2 (50,0 %) пациентов из Ульяновской области и Москвы, имевших высев *B. multivorans* в анамнезе. Все пробы прошли как отрицательные, что еще раз указывает на отсутствие чувствительности тест-системы в отношении штаммов *B. multivorans*. В апреле 2017 г. была выполнена постановка 7 проб от 5 пациентов с МВ. Из них 2 (40,0 %) пациента из Санкт-Петербурга имели высев *B. cenocepacia* в параллельном посеве, от каждого из них исследовано по 2 пробы. Все 4 пробы оказались положительными, что еще раз указывает на высокую чувствительность тест-системы в отношении *B. cenocepacia*. Еще 2 (40,0 %) пациента из Санкт-Петербурга имели отрицательный и результат ПЦР-исследования и микробиологического исследования мокроты. Кроме того, исследована проба от пациента Самарской области, который ранее, до 2013 г., имел неоднократные высевы *B. cenocepacia* из мокроты в анамнезе, что было подтверждено исследованиями образцов в лабораториях экспертного уровня в Москве. С 2013 г. и по настоящее время после длительной и непрерывной антибактериальной терапии с использованием комбинации антибактериальных препаратов из проб от пациента не выделялись указанные бактерии, пациент считается свободным от инфекции. При проведении ПЦР-исследования проба от пациента также оказалась отрицательной, что может являться дополнительным свидетельством эрадикации штамма указанного возбудителя. В июне 2017 г. было проведено исследование 34 проб от 34 пациентов. Из них 30 (88,2 %) пациентов Кемеровской области. При этом у 10 (33,3%) пациентов из них в посеве отмечен первый в анамнезе высев бактерий *B. cenocepacia*. У всех этих пациентов результаты культурального исследования были подтверждены положительными результатами ПЦР-исследования. У оставшихся 20 (66,7 %) пациентов региона результаты посева и ПЦР-исследования были отрицательными. Пациенты были взяты на микробиологический мониторинг, учитывая эпидемиологически неблагоприятную ситуацию в регионе. Кроме этого, исследовано 4 (11,8 %) пробы от пациентов Самарской области и Санкт-Петербурга, не имевших высева возбудителя в анамнезе, при этом все пробы прошли отрицательно. Таким образом, были получены данные, представленные в итоговой диаграмме (рис. 1).

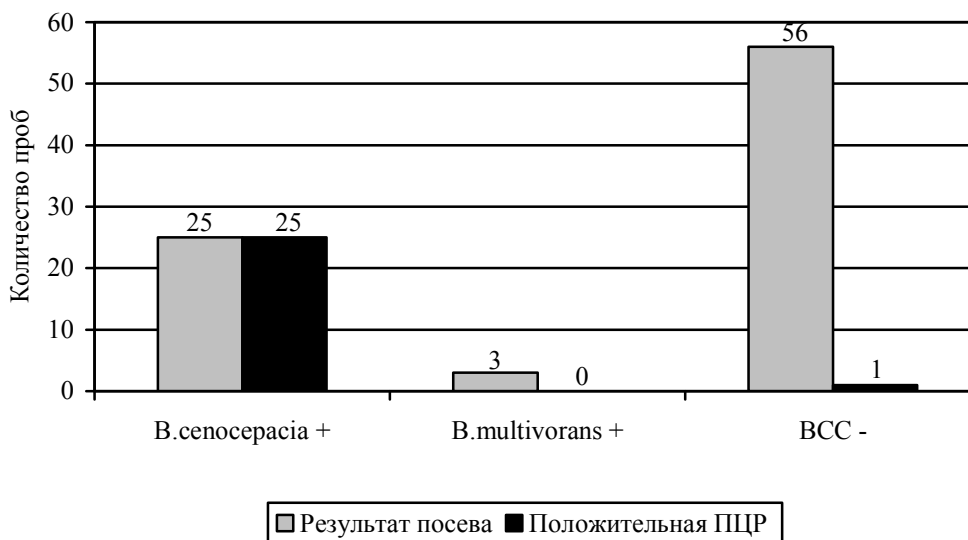


Рис. 1. Итоговое соотношение положительных и отрицательных результатов бактериологического исследования и ПЦР-исследования с использованием тест-системы № 1 (в пробах)

Из представленной диаграммы видно, что все 25 (100 %) проб, в которых был получен рост культуры *B. cenocepacia* дали положительный результат при постановке ПЦР с использованием тест-системы № 1. Этот факт указывает на высокую диагностическую чувствительность разработанной тест-системы в отношении данного геномвара. Однако при тестировании 3 (100 %) образцов, в которых был получен рост культуры *B. multivorans*, отмечен отрицательный результат при постановке пробы ПЦР. Данный факт свидетельствует о том, что разработанная тест-система не является специфичной в отношении штаммов *B. multivorans*. Среди 56 проб, в которых не было получено роста культур рода *Burkholderia* 1 (1,8 %), проба дала положительную реакцию, однако при повторном исследовании образца мокроты от данного пациента, никогда ранее не имевшего высева бактерий *B. ceracia* complex в анамнезе, проба показала отрицательный результат. Этот факт может быть результатом нарушения преаналитического этапа при постановке пробы, однако, учитывая клиническое значение бактерий данной группы для пациентов с МВ, пациент был взят на динамический микробиологический мониторинг.

Результаты клинической апробации тест-системы № 2. Учитывая отсутствие чувствительности тест-системы № 1 в отношении ДНК *B. multivorans*, а также тот факт, что бактерии данного геномвара в значительной степени распространены у пациентов с МВ, было принято решение о ее доработке производителем.

Для клинической апробации указанной тест-системы за период с октября 2017 г. по сентябрь 2018 г. в лаборатории для исследования были отобраны и заморожены 108 проб мокроты от 92 пациентов с МВ. В исследовании приняли участие пациенты из 14 регионов РФ. Из них 12 (13,0 %) человек ранее принимали участие в апробации тест-системы № 1. Среди обследованных образцов в 22 (20,4 %) пробах от 16 (17,4 %) пациентов был получен рост культуры бактерий рода *Burkholderia* из мокроты в анамнезе. Из них в 19 (86,4 %) пробах от 13 (81,3 %) пациентов выделена *B. cenocepacia*, в 2 (9,1 %) пробах от 2 (12,5 %) пациентов – *B. multivorans* и в 1 (4,5 %) пробе от 1 пациента – *B. gladioli* (6,2 %). При этом у 1 (6,2 %) пациента из Волгоградской области отмечали высев *B. ceracia* complex в анамнезе в региональной лаборатории, однако при параллельном посеве в нашей лаборатории штамм не был выделен, а при постановке ПЦР проба также дала отрицательный результат. Вероятно, это может быть связано со сложностями видовой идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий, с которыми сталкиваются многие бактериологи, работающие с материалом от пациентов с МВ, особенно при использовании автоматических анализаторов для идентификации. У еще 1 (6,2 %) пациента из Самарской области до 2013 г. на протяжении 3 лет отмечался высев *B. cenocepacia* из мокроты. После проведенных курсов непрерывной антибактериальной терапии с 2013 г. и на протяжении 5 лет пациент не имел высева возбудителя ни из мокроты, ни из жидкости назального лаважа. От этого пациента было исследовано 3 пробы, и все они не дали роста *B. cenocepacia* при культивировании на питательных средах, показали отрицательный результат при проведении ПЦР-исследования. Ранее, при апробации тест-системы № 1, проба от этого пациента

также дала отрицательный результат ПЦР-исследования. У остальных 14 (87,6 %) пациентов, имевших высев бактерий *B. ceracia* complex из мокроты в анамнезе был получен рост соответствующих культур на питательных средах при параллельной постановке ПЦР. При этом у 1 (6,2 %) пациента из Москвы был выделен штамм *B. gladioli* и получен отрицательный результат ПЦР-исследования, что закономерно ввиду специфичности тест-системы в отношении *B. cenosepacia* и *B. multivorans*. У обоих пациентов, имевших высев *B. multivorans* из мокроты в анамнезе, ПЦР-исследование дало положительный результат, что также отражает чувствительность тест-системы в отношении ДНК *B. multivorans* по сравнению с первым вариантом тест-системы. У 1 пациента из Санкт-Петербурга результат ПЦР показал наличие ДНК *B. cenosepacia* еще до получения результата микробиологического исследования. Позже в посевах был получен рост культуры в титре 10^2 . Ранее у этого пациента отмечали интермиттирующий высев *B. cenosepacia* и положительный результат исследования пробы методом ПЦР при апробации тест-системы № 1. Данный пациент был взят на динамический микробиологический мониторинг. При микробиологическом исследовании 86 (79,6 %) проб от 76 (82,6 %) пациентов с МВ не было выявлено роста *B. ceracia* complex при посевах из мокроты, в том числе и ранее в анамнезе. Из них 1 пациент из Республики Крым обследован троекратно в течение года, все результаты ПЦР оказались отрицательными. Одна пациентка из Санкт-Петербурга также была обследована троекратно, при этом в первом посевах не было получено роста бактерий *B. ceracia* complex, но получен положительный результат при проведении ПЦР-исследования в отношении *B. cenosepacia*. Учитывая это обстоятельство, были исследованы еще 2 пробы от этого пациента, однако при повторных исследованиях через 3 месяца и посевах, и ПЦР-исследования оказались отрицательными. Несмотря на то, что данное обстоятельство может быть следствием технической погрешности при постановке первой пробы, это может свидетельствовать и о транзитном попадании *B. cenosepacia* в организм. Данный пациент также был взят на динамический микробиологический мониторинг. 6 (2,2 %) пациентов, принявших участие в исследовании, были обследованы двукратно, при этом во всех случаях и ПЦР-исследования, и результаты микробиологического исследования в отношении *B. ceracia* complex оказались отрицательными. Таким образом, были получены данные, представленные в итоговой диаграмме (рис. 2).

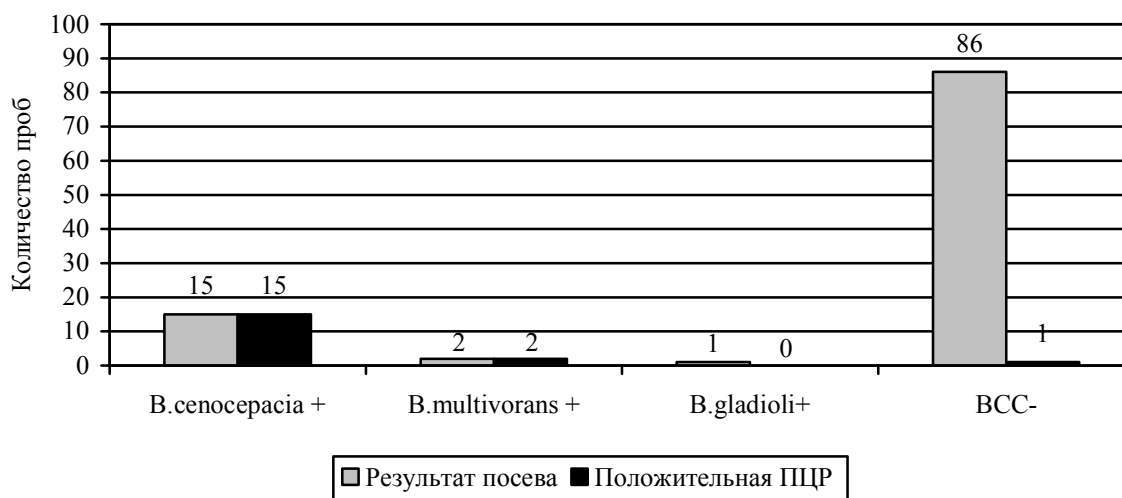


Рис. 2. Итоговое соотношение положительных и отрицательных результатов бактериологического исследования и ПЦР-исследования с использованием тест-системы № 2 (в пробах)

Из представленной диаграммы видно, что все 15 (100 %) проб, в которых был получен рост культуры *B. cenosepacia* дали положительный результат при постановке ПЦР с использованием тест-системы № 2. Этот факт указывает на высокую чувствительность разработанной тест-системы в отношении данного генома. При тестировании 2 (100 %) образцов, в которых был получен рост культуры *B. multivorans*, также отмечен положительный результат при постановке ПЦР. Этот факт указывает на высокую чувствительность разработанной тест-системы в отношении данного генома. При тестировании пробы, в которой зафиксирован рост *B. gladioli*, при постановке ПЦР-исследования был получен отрицательный результат, что отражает специфичность разработанного набора в отношении ДНК *B. cenosepacia* и *B. multivorans*. Среди 86 (79,6 %) проб, в которых

не было получено роста культур рода *Burkholderia*, 1 проба дала положительную реакцию, однако при повторном исследовании образца мокроты от данного пациента, никогда ранее не имевшего высева бактерий *B. cenocepacia* complex в анамнезе, проба показала отрицательный результат. Данный факт может быть результатом нарушения преаналитического этапа при постановке пробы, однако, учитывая клиническое значение бактерий данной группы для пациентов с МВ, пациент был взят на динамический микробиологический мониторинг.

Выводы.

1. Обе исследованные тест-системы показали высокую диагностическую чувствительность в отношении штаммов *B. cenocepacia*. Тест-система № 2 обнаружила также наличие чувствительности в отношении штаммов *B. multivorans*. Обе тест-системы не имеют специфичности к другим представителям рода.

2. Разработанные тест-системы для раннего выявления ДНК *B. cenocepacia* complex в клиническом материале от пациентов с муковисцидозом методом полимеразной цепной реакции могут быть рекомендованы для использования в качестве скрининговой методики в регионах с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией, а также как дополнительный метод исследования для подтверждения в регионах, имеющих низкий уровень доступности MLST-секвенирования.

3. Внедрение такого доступного и недорогого анализа, как ПЦР-исследование мокроты, в рутинную практику обследования пациентов с муковисцидозом в регионах Российской Федерации позволит выявлять колонизацию дыхательных путей клинически значимыми штаммами еще на том этапе, когда они не выявляются в рамках микробиологического метода. Это обстоятельство позволит вовремя скорректировать терапевтическую тактику в отношении пациента, своевременно изолировать его, не допустив распространения инфекции среди пациентов региональных центров муковисцидоза.

Список литературы

1. Афанасьева, М. В. Выживаемость взрослых больных муковисцидозом с хронической инфекцией респираторного тракта, обусловленной микроорганизмами *Burkholderia cenocepacia complex* / М. В. Афанасьева, Е. Л. Амелина, А. В. Черняк, И. Н. Бутюгина, О. Ю. Грачева, И. А. Шагинян, С. В. Поликарпова, М. Ю. Чернуха, Л. Р. Аветисян, Е. И. Кондратьева, А. В. Аверьянов, С. А. Красовский // Практическая пульмонология. – 2018. – № 1. – С. 60–64.
2. Воронина, О. Л. Характеристика генотипов штаммов *Burkholderia cenocepacia complex*, выделенных от больных в стационарах Российской Федерации / О. Л. Воронина, М. Ю. Чернуха, И. А. Шагинян, М. С. Кунда, Л. Р. Аветисян, А. А. Орлова, В. Г. Лунин, Л. В. Авакян, Н. И. Капранов, Е. Л. Амелина, А. Г. Чучалин, А. Л. Гинцбург // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2013. – № 2. – С. 22–30.
3. Красовский, С. А. Динамика показателей национального регистра больных муковисцидозом за 2011–2017 года / С. А. Красовский, Е. Л. Амелина, Н. Ю. Каширская, А. Ю. Воронкова, О. Г. Зоненко // Сибирское медицинское обозрение. – 2019. – № 2. – С. 14–18.
4. Красовский, С. А. Инфицирование респираторного тракта микроорганизмами *B. cenocepacia complex* как неблагоприятный прогностический фактор у больных муковисцидозом / С. А. Красовский, М. В. Афанасьева, Е. Л. Амелина, А. В. Черняк, И. А. Шагинян, С. В. Поликарпова, Л. Р. Аветисян, М. Ю. Чернуха, О. Г. Зоненко, И. Н. Бутюгина // Сибирское медицинское обозрение. – 2019. – № 2. – С. 89–94.
5. Baldwin, A. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cenocepacia complex* / A. Baldwin, E. Mahenthiralingam, K. M. Thickett, D. Honeybourne, M. C. Maiden., J. R. Govan, D. P. Speert, J. J. LiPuma, P. Vandamme, C. G. Dowson // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, № 9. – P. 4665–4673.
6. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry : 2017 annual data report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 2018. – Режим доступа : <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения : 23.09.2019.
7. Dedecova, K. Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST 32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients / K. Dedecova, L. Kalferova, H. Strnad, J. Vavrova, P. Drevinek // J. Cyst. Fibros. – 2013. – Vol. 12, № 5. – P. 475–481.
8. Dedecova, K. PCR detection of *Burkholderia cenocepacia complex* as one of key factors to handle a long-term outbreak / K. Dedecova, L. Fila, V. Skaliska, J. Bartosova, T. Kucerova, V. Vavrova, D. Zemkova, L. Kalferstova, O. Melter, O. Cinek, P. Drevinek // J. Cyst. Fibros. – 2012. – Vol. 11, № 5. – P. 440–445.
9. Dedecova, K. A novel diagnostic PCR for identification of highly transmissible *Burkholderia cenocepacia* ST32 infection / K. Dedecova, L. Kalferstova, J. Vavrova, P. Drevinek // J. Cyst. Fibros. – 2012. – Vol. 11. – P. S85. doi: 10.1016/S1569-1993(12)60283-5.

10. Dedekova, K. The role of PCR in early diagnosis and monitoring of infection with *Burkholderia cepacia* complex / K. Dedekova, O. Cinek, O. Melter, P. Drevinek // *J. Cyst. Fibros.* – 2010. – Vol. 9. – P. S27. doi: 10.1016/S1569-1993(10)60104-X.
11. Drevinek, P. Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic / P. Drevinek, S. Vosahlikova, O. Cinek, V. Vavrova, J. Bartosova, P. Pohunek, E. Mahenthalingam // *J. Med. Microbiol.* – 2005. – Vol. 54, Pt. 7. – P. 655–659.
12. Drevinek, P. *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence / P. Drevinek, E. Mahenthalingam // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2010. – Vol. 16, № 7. – P. 821–830.
13. Drevinek, P. Direct PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA / P. Drevinek, H. Hrbackova, O. Cinek, J. Bartosova, O. Nyc, A. Nemecek // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40. – P. 3485–3488.
14. Govan, J. R. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection / J. R. Govan, A. R. Brown, A. M. Jones // *Future Microbiol.* – 2007. – Vol. 2. – P. 153–164.
15. Isles, A. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem / A. Isles, I. Maclusky, M. Corey, R. Gold, C. Prober, P. Fleming, H. Levison // *J. Pediatr.* – 1984. – Vol. 104. – P. 206–210.
16. LiPuma, J. J. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis / J. J. LiPuma // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 299–323.
17. Mahenthalingam, E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting / E. Mahenthalingam, M. E. Campell, D. A. Henry, D. P. Speert // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol. 34. – P. 2914–2920.
18. Speert, D. P. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex in patients with cystic fibrosis / D. P. Speert, D. Henry, P. Vandamme, M. Corey, E. Mahenthalingam // *Canada Emerg. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 8. – P. 181–187.
19. Sun, L. The emergence of a highly transmissible lineage of *cbl+* *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* causing CF center epidemics in North America and Britain / L. Sun, R. Z. Jiang, S. Steinbach, A. Holmes, C. Campanelli, J. Forstnet, U. Sajjan, Y. Tan, M. Riley, R. Goldstein // *Nat. Med.* – 1995. – Vol. 1. – P. 661–666.
20. UK Registry Annual Data Report 2008. Bromley, UK: Cystic Fibrosis Trust, 2009.

References

1. Afanas'yeva M. V., Amelina E. L., Chernyak A. V., Butyugina I. N., Gracheva O. YU., Shaginyan I. A., Polikarpova S. V., Chernukha M. Yu., Avetisyan L. R., Kondrat'yeva E. I., Aver'yanov A. V., Krasovskiy S. A. Vyzhivayemost' vzroslykh bol'nykh mukovistsidozom s khronicheskoy infektsiyey respiratornogo trakta, obuslovlennogo mikroorganizmami *Burkholderia cepacia* complex [Survival of adult cystic fibrosis patients with chronic respiratory tract infection caused by *Burkholderia cepacia* complex microorganisms]. *Prakticheskaya pul'monologiya*. [Practical pulmonology], 2018, no. 1, pp. 60–64.
2. Voronina O. L., Chernukha M. Yu., Shaginyan I. A., Kunda M. S., Avetisyan L. R., Orlova A. A., Lunin V. G., Avakyan L. V., Kapranov N. I., Amelina E. L., Chuchalin A. G., Gintsburg A. L. Kharakteristika genotipov shtammov *Burkholderia cepacia* complex, vydelennykh ot bol'nykh v statsionarakh Rossiyskoy Federatsii [Characteristics of genotypes of *Burkholderia cepacia* complex strains isolated from patients in hospitals of the Russian Federation]. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* [Molecular genetics, Microbiology and Virology], 2013, no. 2, pp. 22–30.
3. Krasovskiy S. A., Amelina E. L., Kashirskaya N. Yu., Voronkova A. Yu., Zonenko O. G. Dinamika pokazateley natsional'nogo registra bol'nykh mukovistsidozom za 2011–2017 goda [Dynamics of indicators of the national register of patients with cystic fibrosis for 2011–2017]. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye* [Siberian Medical Review], 2019, no. 2, pp. 14–18.
4. Krasovskiy S. A., Afanas'yeva M. V., Amelina E. L., Chernyak A. V., Shaginyan I. A., Polikarpova S. V., Avetisyan L. R., Chernukha M. Yu., Zonenko O. G., Butyugina I. N. Infitsirovaniye respiratornogo trakta mikroorganizmami *B. cepacia* complex kak neblagopriyatnyy prognosticheskiy faktor u bol'nykh mukovistsidozom [Infection of the respiratory tract by *B. cepacia* complex microorganisms as an unfavorable prognostic factor in patients with cystic fibrosis.]. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye* [Siberian Medical Review], 2019, no. 2, pp. 89–94.
5. Baldwin A., Mahenthalingam E., Thickett K. M., Honeybourne D., Maiden M. C., Govan J. R., Speert D. P., Lipuma J. J., Vandamme P., Dowson C. G. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 9, pp. 4665–4673.
6. Cystic Fibrosis Foundation. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: 2017 annual data report. Bethesda, MD: Cystic Fibrosis Foundation; 2018. Available at: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2017-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf> (accessed 23 September 2019).
7. Dedekova K., Kalferova L., Strnad H., Vavrova J., Drevinek P. Novel diagnostic PCR assay for *Burkholderia cenocepacia* epidemic strain ST 32 and its utility in monitoring infection in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.*, 2013, vol. 12, no. 5, pp. 475–481.
8. Dedekova K., Fila L., Skaliska V., Bartosova J., Kucerova T., Vavrova V., Zemkova D., Kalferstova L., Melter O., Cinek O., Drevinek P. PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex as one of key factors to handle a long-term outbreak. *J. Cyst. Fibros.*, 2012, vol. 11, no. 5, pp. 440–445.

9. Dedekova K., Kalferstova L., Vavrova J., Drevinek P. A novel diagnostic PCR for identification of highly transmissible Burkholderia cenocepacia ST32 infection. J. Cyst. Fibros., 2012, vol. 11, pp. S85. doi: 10.1016/S1569-1993(12)60283-5.
10. Dedekova K., Cinek O., Melter O., Drevinek P. The role of PCR in early diagnosis and monitoring of infection with Burkholderia cepacia complex. J. Cyst. Fibros., 2010, vol. 9, pp. S27. doi: 10.1016/S1569-1993(10)60104-X.
11. Drevinek P., Vosahlikova S., Cinek O., Vavrova V., Bartosova J., Pohunek P., Mahenthiralingam E. Widespread clone of Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. J. Med. Microbiol., 2005, vol. 54, Pt. 7, pp. 655–659.
12. Drevinek P., Mahenthiralingam E. Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. Clin. Microbiol. Infect., 2010, vol. 16, no. 7, pp. 821–830.
13. Drevinek P., Hrbackova H., Cinek O., Bartosova J., Nyc O., Nemecek A. Direct PCR detection of Burkholderia cepacia complex and identification of its genomovars by using sputum as source of DNA. J. Clin. Microbiol., 2002, vol. 40, pp. 3485–3488.
14. Govan J. R., Brown A. R., Jones A. M. Evolving epidemiology of Pseudomonas aeruginosa and the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis lung infection. Future Microbiol., 2007, vol. 2, pp. 153–164.
15. Isles A., Maclusky I., Corey M., Gold R., Prober C., Fleming P., Levison H. Pseudomonas cepacia infection in cystic fibrosis: an emerging problem. J. Pediatr., 1984, vol. 104, pp. 206–210.
16. LiPuma J. J. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. Clin. Microbiol. Rev., 2010, vol. 23, no. 2, pp. 299–323.
17. Mahenthiralingam E., Campell M. E., Henry D. A., Speert D. P. Epidemiology of Burkholderia cepacia infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol., 1996, vol. 34, pp. 2914–2920.
18. Speert D. P., Henry D., Vandamme P., Corey M., Mahenthiralingam E. Epidemiology of Burkholderia cepacia complex in patients with cystic fibrosis. Canada Emerg. Infect. Dis., 2002, vol. 8, pp. 181–187.
19. Sun L., Jiang R. Z., Steinbach S., Holmes A., Campanelli C., Forstnet J., Sajjan U., Tan Y., Riley M., Goldstein R. The emergence of a highly transmissible lineage of cbl+ Pseudomonas (Burkholderia) cepacia causing CF center epidemics in North America and Britain. Nat. Med., 1995, vol. 1, pp. 661–666.
20. UK Registry Annual Data Report, 2008. Bromley, UK: Cystic Fibrosis Trust, 2009.

14.01.04 – Внутренние болезни (медицинские науки)

УДК 616.127-005.8-002:616.24-036.12

DOI 10.17021/2019.14.3.79.87

© Б.Ю. Кузьмичев, Л.П. Воронина, Д.С. Тарасочкина,
О.С. Полунина, Т.В. Прокофьева,
Е.А. Липницкая, Е.А. Полунина, 2019

ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ КАК ФАКТОР РИСКА ОСЛОЖНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ИНФАРКТА МИОКАРДА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ¹

Кузьмичев Богдан Юрьевич, аспирант очной формы обучения кафедры внутренних болезней педиатрического факультета, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-41-43, e-mail: bog13@list.ru.

Воронина Людмила Петровна, доктор медицинских наук, профессор кафедры внутренних болезней педиатрического факультета, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-41-43, e-mail: voroninaluda74@mail.ru.

Тарасочкина Дария Сергеевна, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры нормальной физиологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-41-43, e-mail: gilfo@yandex.ru.

¹ Работа выполнена в рамках реализации гранта Президента РФ по государственной поддержке молодых ученых за проект «Персонализированная диагностика и прогнозирование течения сердечно-сосудистых заболеваний» (МК-6200.2018.7).