

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки». – 2020. – 59 с. – URL: http://zdrav.spb.ru/media/filebrowser/цервикальная_интраэпителиальная_неоплазия%2C_эрозия_и_эктропион_шейки_матки.pdf (дата обращения: 29.03.2024). Текст: электронный.
2. Li, Y. Combining HPV DNA load with p16/Ki-67 staining to detect cervical precancerous lesions and predict the progression of CIN1–2 lesions / Y. Li, J. Liu, L. Gong [et al.] // *Journal of Virology* / – 2019. – Vol. 16, № 117.
3. Hosseini, M.S. Comparison of Ki-67 index and P16 expression in different grades of cervical squamous intraepithelial lesions / M.S. Hosseini, M. Talayeh [et al.] // *Caspian Journal of Internal Medicine*. – 2023. – Vol. 14, № 1.
4. Yu, L. Significance of Triple Detection of p16/ki-67 Dual-Staining, Liquid-Based Cytology and HR HPV Testing in Screening of Cervical Cancer: A Retrospective Study / L. Yu, X. Chen, X. Liu [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – № 12.
5. Zhong, P. P16 and Ki-67 expression improves the diagnostic accuracy of cervical lesions but not predict persistent high risk human papillomavirus infection with CIN1 / P. Zhong, J. Li [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2015. – Vol. 8, № 3.
6. Skinner, S.R. Progression of HPV infection to detectable cervical lesions or clearance in adult women: Analysis of the control arm of the VIVIANE study / S.R. Skinner, C.M. Wheeler, B. Romanowski [et al.] // *International Journal of Cancer*. – 2016. – Vol. 138, № 10. – P. 2428-38.
7. Lee, J.E. Untold story of human cervical cancers: HPV-negative cervical cancer / J.E. Lee, Y. Chung [et al.] // *BMB Reports*. – 2022. – Vol. 55, № 9.

Сведения об авторах

А.А. Петровских* – студент лечебно-профилактического факультета
 А.А. Насырова – студент лечебно-профилактического факультета
 Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент, зав. лабораторией
 Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, доцент, и.о. заведующего кафедрой

Information about the authors

A.A. Petrovskikh* – student of the Faculty of Treatment and Prevention
 A.A. Nasyrova – student of the Faculty of Treatment and Prevention
 D.L. Zornikov – Candidate of Sciences (Medicine), the Lab Head
 E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), the Department Head

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

arinapetrovskish@gmail.com

УДК: 616-093/-098

СРАВНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ВЗЯТИЯ И ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОТЫ КОЖИ

Нечаева Диана Мирзозоновна¹, Мещерякова Виолетта Вадимовна¹, Симарзина Вероника Михайловна², Корнилов Даниил Олегович², Тряпицын Михаил Андреевич², Савченко Наталья Викторовна^{2,3}, Зорников Данила Леонидович^{1,2}

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

²Лаборатория генетических и эпигенетических основ прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека

³Кафедра дерматовенерологии и безопасности жизнедеятельности

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
 Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Значительная часть всех лабораторных ошибок приходится на преаналитический этап. Это может быть связано с отсутствием регламентированных правил взятия биоматериала для определенного исследования. С такой проблемой сталкиваются при анализе микробиоты кожи. Исследование микробного состава кожи методом ПЦР является перспективным методом для выявления условно-патогенных микроорганизмов на поверхности кожи. Однако не существует регламентированной методики взятия биоматериала для проведения данного типа исследования. **Цель исследования** – сравнить эффективность различных способов взятия и пробоподготовки образцов с поверхности кожи для исследования кожной микробиоты методом полимеразной цепной реакции. **Материал и методы.** От 5 пациентов были взяты образцы с кожи внутренней поверхности предплечья 3 разными способами. Для одного из способов в дальнейшем применяли 2 модификации пробоподготовки. Состав кожной микробиоты определяли методом ПЦР с помощью наборов реагентов БакСкрин УПМ и МикозоСкрин. **Результаты.** Были определены 2 оптимальных и наименее эффективный способы взятия биоматериала с последующей пробоподготовкой для исследования микробиоты методом ПЦР. **Выводы.** Вне зависимости от пола и кожи пациента не рекомендуется оставлять использованный зонд в пробирке после переноса биоматериала; в случае наличия зонда в пробирке необходимо провести центрифугирование образца в течение 10 минут на 16000g перед удалением зонда.

Ключевые слова: микробиота кожи, полимеразная цепная реакция, способ взятия биоматериала

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS OF SAMPLING AND SAMPLE PREPARATION FOR THE ASSESMENT OF SKIN MICROBIOTA

Nechaeva Diana Mirzozonova¹, Meshcheryakova Violetta Vadimovna¹, Simarzhina Veronika Mikhailovna², Kornilov Daniil Olegovich², Tryapitsyn Mikhail Andreevich², Savchenko Natalia Viktorovna^{2,3}, Zornikov Danila Leonidovich^{1,2}

¹Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostic

²Laboratory of Genetic and Epigenetic Basis of the Human Ontogenesis Abnormalities and Human Senescence

³Department of Dermatovenerology and Life Safety

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. The majority of laboratory errors occur during the pre-analytical stage. This may be due to the lack of regimented rules for sampling. This is particularly important in skin microbiota research. The analysis of skin microbiota composition by real-time PCR is a perspective method for detecting opportunistic microorganisms on the skin surface. However, there is no regulated technique for sampling for this type of analysis. **The aim of the study** was to compare different methods of sampling and preparation of samples from the skin for the study of skin microbiota by real-time PCR. **Material and methods.** Samples of the skin from the inner surface of the forearm were taken from 5 patients by 3 sampling techniques. For one of the sampling techniques we used 2 modifications of sample preparation. The composition of the skin microbiota was determined by real-time PCR by the Bakscreen UPM and Mycososcreen kits. **Results.** We identified 2 superior and 1 the least effective skin sampling-preparation methods for the skin microbiota assessment real-time PCR. **Conclusion.** Regardless of the gender and skin of the patient it is not recommended to leave the swab in the tube after transferring the biomaterial; if there is a swab in the test tube, it is necessary to centrifuge the sample for 10 minutes at 16000g before removing and discarding the swab.

Keywords: skin microbiota, polymerase chain reaction, sampling technique

ВВЕДЕНИЕ

Преаналитический этап – важная часть исследования, которая целиком находится под контролем лечащего врача или среднего медицинского персонала, осуществляющих взятие биоматериала. Даже незначительные ошибки могут привести к серьезному искажению качества результатов лабораторных исследований. Показано, что на преаналитический этап приходится 70% всех лабораторных ошибок [1]. Однако до сих пор, существует ряд исследований, где нет четких методов взятия биоматериала и пробоподготовки. К таким относится получение образцов с поверхности кожи с целью оценки микробиоты биотопа.

Необходимость применения данного исследования в дерматологии ежегодно растет, что связано с доказанной ролью микробиоты в защите от проникновения патогенов, формировании и стимуляции иммунных реакций, и расщеплении продуктов обмена [2,3]. При этом многие исследователи полагают, что существует причинно-следственная связь между микробиотой кожи и возникновением и прогрессированием некоторых дерматологических патологий, аргументируя свои утверждения изучением микробного состава кожи пациентов с тяжелыми формами акне и атопическим дерматитом [4]. Такие данные наводят на мысли о необходимости изучения микробиоты пациентов в практике врача-дерматолога. Однако возникает вопрос о выборе метода взятия биоматериала из нескольких имеющихся в арсенале врача дерматовенеролога.

Цель исследования – сравнить эффективность различных способов взятия и пробоподготовки образцов с поверхности кожи для исследования кожной микробиоты методом полимеразной цепной реакции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

От 5 пациентов были взяты по 4 образца с кожи внутренней поверхности предплечья. Предварительно исследуемый участок не обрабатывали кожными антисептиками. Для взятия и последующей пробоподготовки использовали 4 следующих метода (рис. 1):

- Метод 1 – смыв с кожи стерильным зондом с дальнейшим тщательным его промыванием в пробирке со стерильным физиологическим раствором, перед извлечением

зонд вращательными движениями прижимали к внутренней стенке пробирки, отжимая излишнюю жидкость.

- Метод 2 – смыв с кожи стерильным зондом, зонд оставляли в пробирке, после чего встряхивали пробирку на центрифуге-встряхивателе в течение 5 секунд, далее после быстрого осаждения капелек с внутренней поверхности крышки пробирки зонд извлекали стерильным пинцетом, пробирку после извлечения зонда центрифугировали в течение 10 минут на 16000g.

- Метод 3 – смыв с кожи стерильным зондом, зонд оставляли в пробирке, пробирку центрифугировали в течение 10 минут на 16000g после чего удаляли зонд стерильным пинцетом.

- Метод 4 – соскоб стерильным предметным стеклом с дальнейшим сбором материала с поверхности стекла зондом, материал с предметного стекла предварительно смоченным стерильным зондом переносили в пробирку со стерильным физиологическим раствором.

После окончания любого из способов выделяли ДНК с использованием набора ПРОБА-НК-ПЛЮС (ДНК-технология, г. Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Для встряхивания образцов использовали центрифугу ELMi-СМ70 (Elmi, Латвия), для высокоскоростного центрифугирования – ELMi-СМ50 (Elmi, Латвия). Состав микробиоты определяли методом ПЦР в режиме реального времени с помощью наборов реагентов БакСкрин УПМ и МикозоСкрин в детектирующих амплификаторах ДТ-Прайм 5 (ДНК-Технология, г. Москва). Результаты амплификации оценивали с использованием программного обеспечения производителя.

Степень ксероза определяли по шкале Xerosis Severity Scale (XSS) с использованием дерматоскопа HEINE DELTA 20 [5].

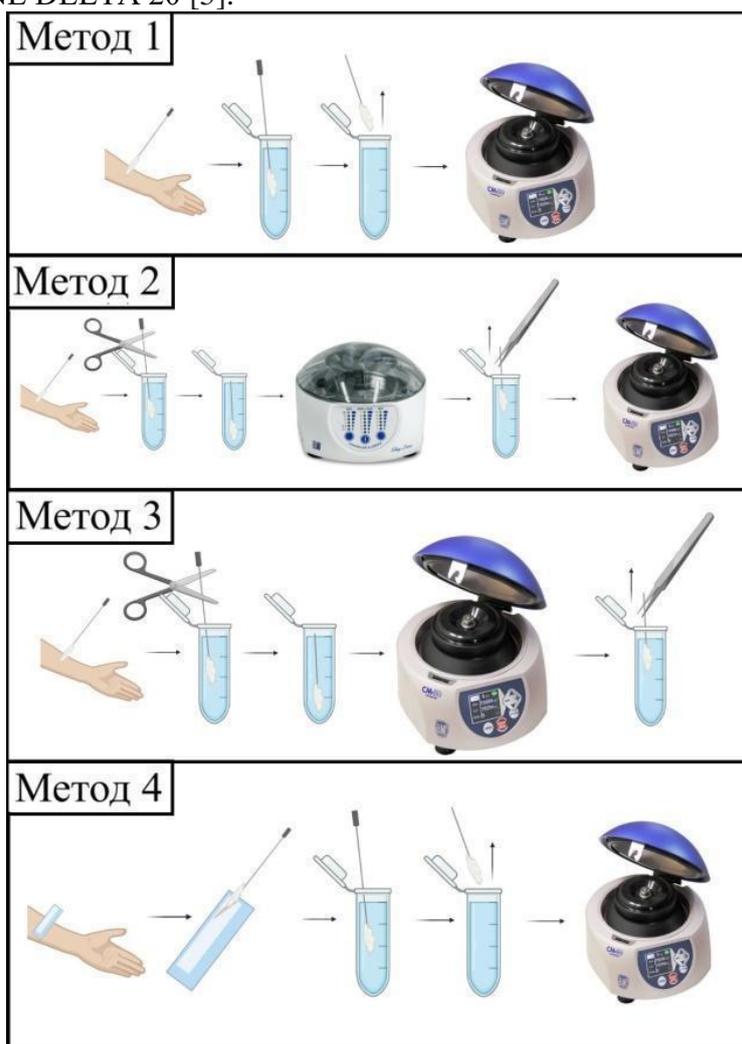


Рис. 1. Способы взятия и пробоподготовки образцов

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили с помощью R версии 4.3.2 (сборка 2023-10-31). Нормальность распределения признаков проверяли тестом Шапиро-Уилка. В качестве средних величин при описании переменных указывали медиану с 0,25 и 0,75 перцентилями. Достоверность различий между двумя количественными показателями оценивали с помощью U теста Манна-Уитни (теста Уилкоксона для независимых выборок). Все различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В пробах кожи от 5 испытуемых определяли 40 групп микроорганизмов (25 групп бактерий и 15 групп дрожжевых грибов). При использовании тестируемых методов разница по количеству отдельным групп МО у одного пациента в среднем составляла 0,5 lg (2,5 цикла в ПЦР).

Для сравнения эффективности тестируемых методик для каждого пациента отобрали группы МО, по которым был получен положительный результат хотя бы в одном из методов. После этого у каждого пациента рассчитывали коэффициент эффективности для методов 1-4 (КЭ) по отдельным групп МО. Расчет КЭ осуществляли по следующей формуле:

$$КЭ = R_x / R_{max}$$

КЭ – коэффициент эффективности

R_x – количество целевой группы МО, полученное при использовании оцениваемого метода взятия и пробоподготовки биоматериала

R_{max} – максимальное количество целевой группы МО, полученное при использовании всех тестируемых методов

В результате КЭ показывал, насколько оцениваемый метод эффективен в обнаружении целевой группы МО у конкретного пациента относительно лучшего метода. Например, при значении КЭ 0,5 оцениваемый метод смог выявить в 2 раза меньшее количество целевого МО в сравнении с идеальным методом, а при значении в 0,1 – в 10 раз меньшее количество. Значение КЭ для идеального метода было равным 1. Значения КЭ для каждого тестируемого метода представлены на рисунке (рис. 2).

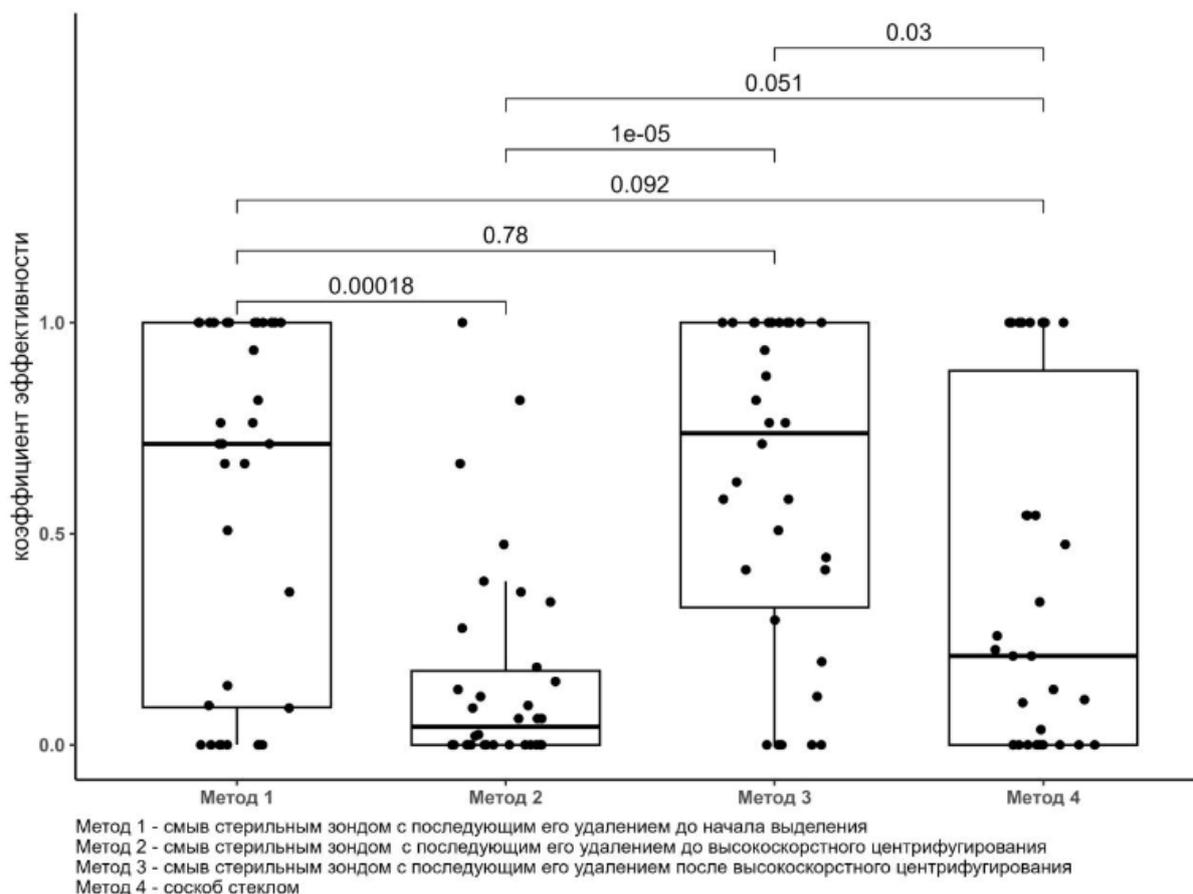


Рис. 2. Сравнение методов взятия и пробоподготовки образцов по коэффициенту эффективности

КЭ Метода 1 и Метода 3 одинаковы по величине и равны примерно 0,7, тогда как КЭ для Метода 4 равен 0,3, а для Метода 2 - 0,1. Кроме того, между Методом 1 и Методом 2, Методом 2 и Методом 3, Методом 3 и Методом 4 различия были статистически значимыми, что позволяет сделать вывод о том, что наименее эффективным методом является сохранение зонда в эппендорфе, а лучшими способами являются те при которых извлечение зонда осуществляется до начала этапа выделения нуклеиновых кислот или производится высокоскоростное центрифугирование перед извлечением зонда из пробирки.

Далее мы сравнивали эффективность различных методов взятия биоматериала в зависимости от пола и по степени ксероза кожи испытуемых (рис. 3).

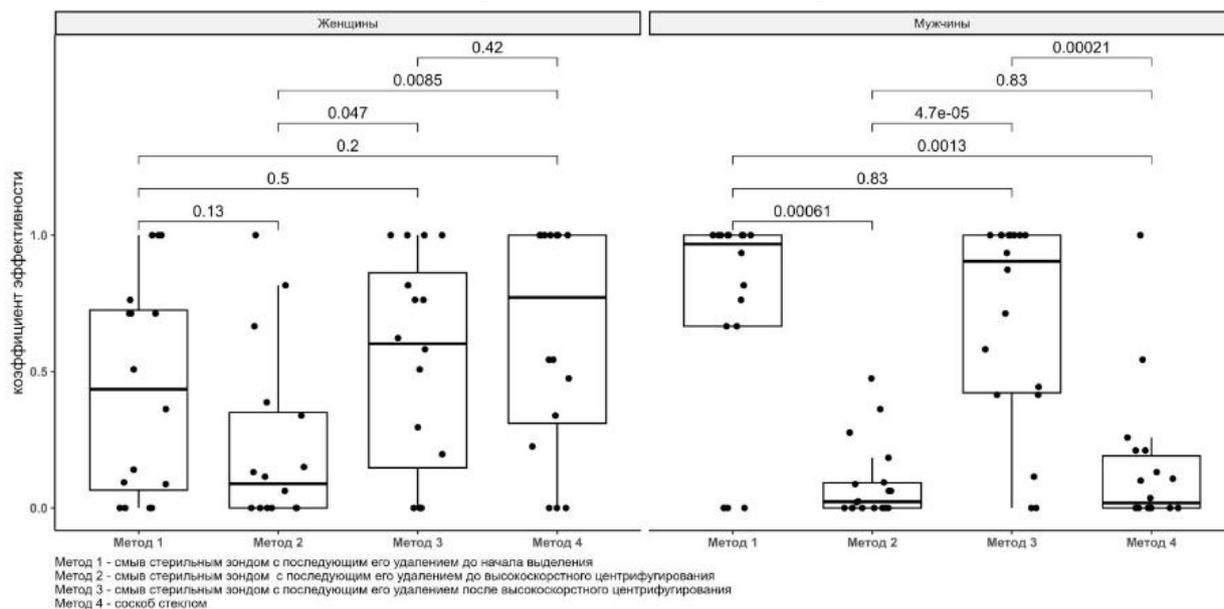


Рис.3. Сравнение эффективности методов в зависимости от пола

В случае проведения исследования у женщин, максимальное количество микроорганизмов отмечали при взятии материала Методом 4, тогда как у мужчин данный метод определяется как наименее эффективный. Максимальное значение КЭ у мужчин отмечалось при использовании 1 и 3 Методов. Статистически значимая разница определялась у женщин между Методом 2 и Методом 3, Методом 2 и Методом 4, у мужчин – между Методом 1 и Методом 2, Методом 1 и Методом 4, Методом 3 и Методом 4. Таким образом, можно сделать вывод, что Метод 2 неэффективен в независимости от пола испытуемого.

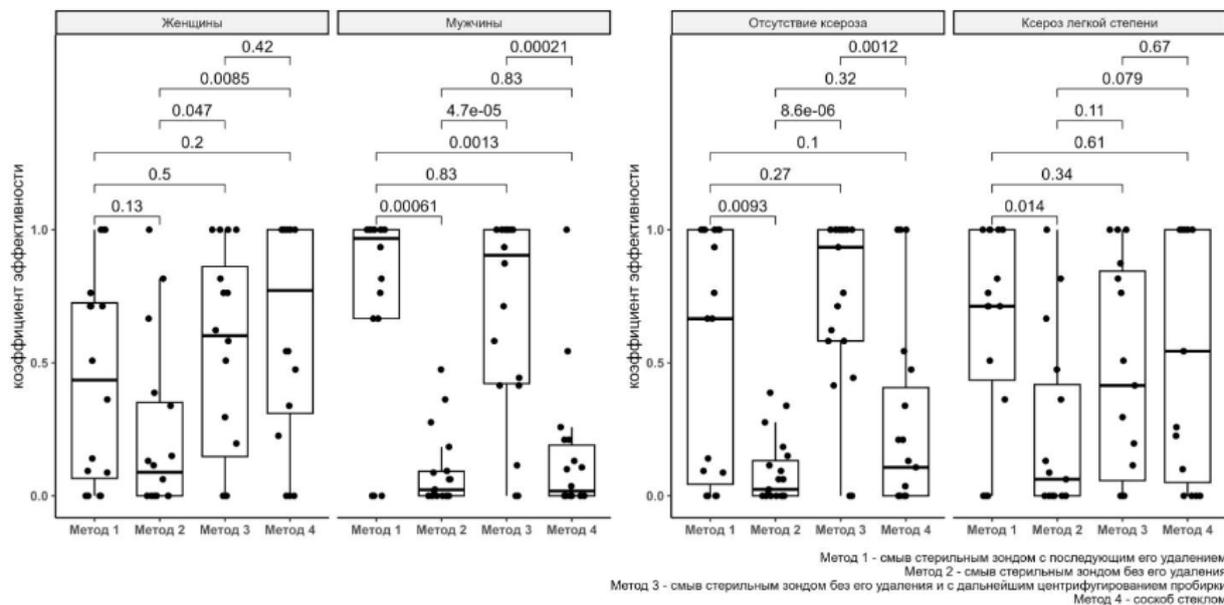


Рис.4. Сравнение эффективности методов в зависимости от степени ксероза

По степени выраженности ксероза распределили испытуемых на 2 группы: отсутствие ксероза и ксероз легкой степени. Определили зависимость эффективности методов от ксероза кожи.

Выявили статистически значимую разницу между следующими методами: в группе без признаков ксероза – между Методом 1 и Методом 2, Методом 2 и Методом 3, Методом 3 и Методом 4, в группе с легкой степенью ксероза – Метод 1 и Метод 2. Полученные данные позволяют сделать вывод о неэффективности Метода 2 как в случае использования его при отсутствии ксероза, так и при ксерозе легкой степени. Тогда как три остальных метода одиночного эффективны для всех типов кожи.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования демонстрируют важность выбора метода взятия и пробоподготовки образцов для исследования микробиоты кожи в практике врача-дерматолога.

Худшая эффективность Метода 2 скорее всего обусловлено пористым строением материала зонда. МО адгезируются как в порах, так и на поверхности зонда, находящегося продолжительное время в пробирке. Концентрация исследуемых клеток в растворе уменьшается, что приводит к выделению меньшего количества микробной ДНК. В таких случаях в ходе пробоподготовки необходимо центрифугировать образцы в течение 10 минут при 16000g перед извлечением зонда; данный подход продемонстрировал увеличение выхода бактериальной ДНК до сопоставимого с Методом 1. Однако процедура извлечения зонда из образца увеличивает риск контаминации лабораторного оборудования. Следовательно, взятие биоматериала Методом 1 (смыв с кожи стерильным зондом с дальнейшим тщательным его промыванием в пробирке и его извлечением) является наиболее эффективным и безопасным. При этом эффективность данного метода не зависит от пола и степени сухости кожи пациента. Последнее избавляет врача от дополнительного шага при взятии биоматериала – определения степени ксероза.

ВЫВОДЫ

1. Взятие мазков с поверхности кожи стерильным зондом с его последующим удалением (способ 1) является оптимальным способом взятия биоматериала; данный способ демонстрирует высокий выход микробной ДНК, не зависит от пола и сухости кожи пациента и минимизирует риски контаминации лабораторного оборудования.

2. В случае наличия зонда в образце необходимо центрифугировать образец в течение 10 минут при 16000g перед удалением зонда, что, однако не снижает риск контаминации оборудования; извлечение зонда без предварительного центрифугирования приводит примерно к 10-кратному снижению выхода микробной ДНК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Plebani, M Mistakes in a stat laboratory: types and frequency / M. Plebani, P. Carraro // Clin Chem. – 1997. – 43. – P. 1348-1351.
2. Byrd A. The human skin microbiome / A. Byrd, Y. Belkaid, J. Segre // Nat Rev Microbiol16. – 2018. – P. 143–155.
3. Crosstalk between skin microbiota and immune system in health and disease / Q. Liu, R. Ranallo, C. Rios [et al.] // Nat Immunol. – 2023. Jun. – Vol. 24 №6. – P. 895-898.
4. Characteristics of the Skin Microbiome in Selected Dermatological Conditions: A Narrative Review / E. Olunoiki, J. Rehner, M. Bischoff [et al.] // Life (Basel). – 2022. Sep 12. – Vol. 12 №9. – P. 1420.
5. Comparative efficacy of 12% ammonium lactate lotion and 5% lactic acidlotion in the treatment of moderate to severe xerosis / R.S. Rogers, J. Callen, R. Wehr [et al.] // J Am Acad Dermatol. – 1989. – 21. – P. 714-716.

Сведения об авторах

Д.М. Нечаева* – студент педиатрического факультета
В.В. Мещерякова – студент лечебно-профилактического факультета
В.М. Симарзина – лаборант-исследователь лаборатории
Д.О. Корнилов – лаборант-исследователь лаборатории
М.А. Тряпицын – лаборант-исследователь лаборатории
Н.В. Савченко – кандидат медицинских наук, ассистент
Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

D.M. Nechaeva* – Student of Pediatric Faculty
V.V. Meshcheryakova – Student of General Medicine Faculty
V.M. Simarzina – Assay Assistant of Laboratory

D.O. Kornilov – Assay Assistant of Laboratory
M.A. Tryapitsyn – Assay Assistant of Laboratory
N.V. Savchenko – Candidate of Sciences (Medicine), Assistant
D.L. Zornikov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor
*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
dinechaeva13@yandex.ru

УДК 614.4

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОБНАРУЖЕНИЯ НОРОВИРУСА GI В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Патрушева Анастасия Константиновна^{1,2}, Чалапа Владислав Игоревич¹, Итани Тарек Мохамедович¹

¹Федеральное бюджетное учреждение науки Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

²ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Норовирусы являются распространённой причиной небактериального гастроэнтерита, преобладающими геногруппами являются GI и GII. Из существующих методов детекции возбудителя приемлемые операционные характеристики демонстрирует лишь полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). В то же время разработка подобных тест-систем затруднена ввиду генетической изменчивости возбудителя, при этом ранее были описаны сложности в подборе олигонуклеотидов для детекции норовируса GI. **Цель исследования** – осуществить дизайн олигонуклеотидов для детекции норовирусов GI с применением ПЦР-РВ и оптимизировать тест-систему на их основе. **Материал и методы.** Была сформирована сплошная выборка из 1189 нуклеотидных последовательностей генома норовируса GI. К консервативному участку генома по выровненным последовательностям с помощью пакета Rprimer и программы UGENE были подобраны праймеры и зонды. Для экспериментальной части исследования использовались образцы фекалий больных гастроэнтеритом (n=125), включая образцы с положительными результатами ПЦР-теста на норовирус GI (n=32). В качестве золотого стандарта использовалась тест-система АмплиСенс® Norovirus GI/GII-FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). **Результаты.** При анализе выравнивания нуклеотидных последовательностей возбудителя была получена одна пара праймеров и шесть вариантов зонда. Наилучший результат ПЦР-РВ был получен с использованием зонда, имеющего модификацию в виде замкнутой нуклеиновой кислоты, что позволило проводить отжиг и элонгацию при 60°C. Полученная тест-система на ограниченной выборке образцов продемонстрировала полную сходимость с «золотым стандартом» (чувствительность 100%, специфичность 100%). **Выводы.** Был осуществлен дизайн праймеров и зонда TaqMan® для детекции норовирусов GI в ПЦР-РВ с учетом известных технических сложностей разработки тест-системы для детекции данного возбудителя. Результаты исследований на ограниченной выборке с экспериментальной тест-системой полностью сошлись с результатами для «золотого стандарта», показав валидность предлагаемого метода.

Ключевые слова: норовирус GI, ПЦР-РВ, олигонуклеотиды.

DEVELOPMENT OF A NOROVIRUS GENOGROUP I QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY

Patrusheva Anastasia Konstantinovna^{1,2}, Chalapa Vladislav Igorevich¹, Itani Tarek Mukhamedovich¹

¹Federal Budgetary Institution of Science «Federal Research Institute of Viral Infections «Virome» Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Health Wellbeing

²Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Norovirus is a common cause of non-bacterial gastroenteritis, and genogroups GI, GII are predominant. Among the existing detection assays, only quantitative polymerase chain reaction (qPCR) demonstrates acceptable accuracy. Nevertheless, the development an assay is difficult due to the genetic variability of the pathogen and specific obstacles in oligonucleotides design for norovirus GI as it has been described previously. **The aim of the study** - to design oligonucleotides for the detection of norovirus GI in qPCR and to optimize the experimental assay. **Material and methods.** A total sample of 1189 nucleotide sequences of norovirus GI genome was formed. Primers and probes were selected targeting the conservative region based on aligned sequences using the R primer package and the UGENE