

ЗНАЧИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ДНК В СОСТАВЕ МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ТЯЖЕЛЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ИНФЕКЦИЙ И МОДЕЛИРОВАНИИ ИСХОДА ЗАБОЛЕВАНИЯ

ЗЕМКО В.Ю.¹, ОКУЛИЧ В.К.¹, ДЗЯДЗЬКО А.М.², КОЛЧАНОВА Н.Э.¹, КОРНИЛОВ А.В.¹, СЕНЬКОВИЧ С.А.¹

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

²Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2019. – Том 18, №5. – С. 69-76.

THE ROLE OF DNA CONTENT IN THE COMPOSITION OF MICROBIAL BIOFILM IN THE PATHOGENESIS OF SEVERE RESPIRATORY INFECTIONS AND THE DISEASE OUTCOME MODELLING

ZIAMKO V.Y.¹, OKULICH V.K.¹, DZYADZKO A.M.², KOLCHANOVA N.E.¹, KORNILOV A.V.¹, SENKOVICH S.A.¹

¹Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

²Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2019;18(5):69-76.

Резюме.

Цель – разработать способ определения процентного содержания дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в составе биопленки и установить его значимость в патогенезе тяжелых респираторных инфекций и моделировании исхода заболевания.

Материал и методы. Изучено 238 изолятов, выделенных из мокроты и зева 175 пациентов из Витебской областной клинической больницы и амбулаторно-поликлинических учреждений в течение 2016-2019 гг. Пациенты были разделены на две группы: в 1-ой группе из 139 человек (79,4%) пациенты имели тяжелые респираторные инфекции, во 2-ой группе из 36 человек (20,6%) – инфекции дыхательных путей средней степени тяжести.

Результаты и обсуждение. Разработан способ определения процентного содержания ДНК в составе микробного сообщества с использованием в качестве флуорохрома раствора красителя 4'6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид. Средний возраст 1-ой группы был выше второй ($p < 0,05$). Наибольшую массу образуемой биопленки, а также процентное содержание ДНК имела *P. aeruginosa*, выделенная при тяжелых респираторных инфекциях в ОРИТ, составив 48,25 [30,5-70,1] мкг/мл и 5,21 [2,17-7,67] %, $p = 0,04$. Выявлена сильная связь между процентным содержанием ДНК в биопленке *P. aeruginosa* и степенью тяжести заболевания $r = 0,73$, слабая – при *Acinetobacter spp.*, $r = 0,35$, $p < 0,05$. Частота неблагоприятного исхода при выделении антибиотикоустойчивых изолятов была выше, чем при выделении антибиотикочувствительных ($p < 0,05$). Анализ результатов позволил предположить летальный исход с высокой степенью вероятности при массе микробной биопленки $> 47,5$ мкг/лунку и процентном содержании ДНК в ее составе $> 2,33\%$ ($p < 0,01$).

Заключение. Предложен способ определения процентного содержания ДНК в составе микробного сообщества, позволяющий судить об агрессивности микроорганизма и тяжести вызываемой им инфекции, что дает возможность обеспечить персонализированный подход к выбору антибактериальной терапии на основе способности лекарственного средства проникать через биопленку.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, биопленка, дезоксирибонуклеиновая кислота, 4'6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид.

Abstract.

Objectives. To develop a method for determining deoxyribonucleic acid (DNA) percentage in the biofilm composition

and to ascertain its significance in the pathogenesis of severe respiratory infections and their outcome modelling. Material and methods. A total of 238 isolates taken from the sputum and pharynx of 175 patients treated at Vitebsk Regional Clinical Hospital and outpatient clinics during 2016-2019 were studied. Patients were divided into two groups: the 1st group consisting of 139 people (79.4%) had severe respiratory infections, the 2nd group composed of 36 persons (20.6%) suffered from respiratory infections of moderate severity.

Results. The method for determining DNA percentage in the composition of microbial community using 4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride was developed. The average age of the 1st group was higher than that of the second group ($p < 0.05$). *P. aeruginosa* had the largest mass of the biofilm formed and DNA percentage in group 1, making up 48.25 [30.5-70.1] $\mu\text{g/ml}$ and 5.21 [2.17-7.67] %, $p = 0.04$. A strong relationship was found between DNA percentage in *P. aeruginosa* biofilm and the disease severity, $r = 0.73$, and a weak one – in *Acinetobacter spp.*, $r = 0.35$, $p < 0.05$. The incidence of adverse outcomes in case of antibiotic-resistant isolates was higher than that in case of antibiotic-sensitive ones ($p < 0.05$). The analysis of the results made it possible to prognosticate to a high degree probability fatal outcome when the microbial biofilm mass was $> 47.5 \mu\text{g/well}$ and DNA percentage was $> 2.33\%$, ($p < 0.01$).

Conclusions. The method for determining DNA percentage in the microbial community has been proposed allowing to judge the aggressiveness of the microorganism and the severity of the infection caused by it, which enables the providing of a personalized approach to the choice of antibiotic therapy based on the ability of the drug to penetrate through the biofilm.

Key words: antibiotic resistance, biofilm, deoxyribonucleic acid, 4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride.

Давно известно о возможности существования микроорганизмов в специфических многослойных структурах, называемых биопленками (БП), что, в свою очередь, объясняет тяжелое течение многих воспалительных процессов [1]. В регуляции свойств биопленок активное участие принимает внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) матрикса биопленки, присутствие которой необходимо для нормального образования биопленок. Так, в биопленках перенос генетической информации, в том числе генов, отвечающих за чувствительность к антибактериальным лекарственным средствам, происходит гораздо чаще, чем в отдельно живущих бактериальных клетках [2, 3]. Однако, несмотря на участие внеклеточной ДНК в адгезивных процессах и межклеточных взаимодействиях, ее роль полностью не изучена [4, 5].

Существующие в настоящее время способы определения ДНК не адаптированы для изучения биопленки и достаточно трудоемки в исполнении [6, 7]. Предлагаемый нами метод определения процентного содержания ДНК в составе микробной биопленки основан на определении количества ДНК в биологическом образце путем флуоресценции с использованием в качестве флуорохрома раствора красителя 4'-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид (DAPI). Определение процентного содержания ДНК в биопленке позволяет судить об агрессивности микроорганизма и тяжести вызываемой им инфекции, что, в свою очередь, позволяет обеспечить персонализированный подход к выбору антибактериальной

терапии на основе способности лекарственного средства проникать через биопленку [8, 9].

Цель исследования – разработать способ определения процентного содержания ДНК в составе микробной биопленки и установить его значимость в патогенезе тяжелых респираторных инфекций и моделировании исхода заболевания.

Материал и методы

Изучено 238 изолятов, выделенных из мокроты и зева 175 пациентов в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), пульмонологического и отоларингологического отделений УЗ «Витебская областная клиническая больница» в течение 2016-2019, а также из амбулаторно-поликлинических учреждений г. Витебск. Забор материала производили утром до приема пищи в стерильные емкости для сбора биологического материала и отправляли в микробиологическую лабораторию Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» на базе Витебской областной клинической больницы, где проводили идентификацию микроорганизмов согласно инструкции по применению № 075-0210 «Микробиологические методы исследования биологического материала», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 13.03.2010 г. [10]. Факультативно-аэробные и аэробные микроорганизмы идентифицировали с использованием тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux». Принад-

лежность стафилококков к MRSA определяли по резистентности к цефокситину [11].

Пациенты были разделены на две группы в зависимости от тяжести течения заболевания: в 1-ой группе из 139 человек (79,4%) пациенты имели тяжелую полисегментарную или нижне-долевую пневмонию и находились на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Во 2-ой группе из 36 человек (20,6%) пациенты имели инфекции дыхательных путей средней степени тяжести и находились на лечении в пульмонологическом и отоларингологическом отделениях, а также в амбулаторно-поликлинических учреждениях. Во 2-ой группе 10 человек (5,7%) имели внегоспитальную пневмонию средней степени тяжести, по 6 человек (3,4%) – тонзиллит и фарингит, 2 (1,14%) человека – ринофарингит, 4 (2,3%) – хроническую обструктивную болезнь легких, по 1 пациенту (0,6%) – бронхит, полисинусит и острое респираторное заболевание, 3 человека (1,7%) находились на обследовании.

Для обработки данных применяли непараметрические методы статистики. Статистическую значимость между несвязанными группами оценивали по критерию Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Связь между двумя количественными признаками оценивалась с помощью корреляционного анализа Спирмена. Для оценки диагностической и прогностической эффективности метода использовали ROC-анализ. Определение вероятности наступления неблагоприятного исхода исследовали на основе расчета отношения шансов с 95% доверительным интервалом. Точный критерий Фишера использовали для сравнения двух относительных показателей, характеризующих частоту определенного признака, имеющего два значения. Значения достоверны при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По видовому составу из мокроты и зева преобладали *Klebsiella pneumoniae* (102 изолята), *Acinetobacter spp.* (60 изолятов), *Pseudomonas aeruginosa* (54 изолята); *Staphylococcus aureus* составил 22 изолята ($p < 0,05$).

Средний возраст 1-ой группы пациентов составил $55,7 \pm 22,9$ года, мужчины составили – 71 человек, женщины – 28 человек. Средний возраст 2-ой группы пациентов был $33,8 \pm 25,6$ года,

мужчины составили – 33 человека, женщины – 62 человека ($p < 0,05$).

Исследуемые группы пациентов различались чувствительностью к антибактериальным лекарственным средствам выделяемых из биологических сред микроорганизмов. Так, все стафилококки принадлежали к MRSA в первой группе и были чувствительны к цефокситину во второй в 100% случаев ($p < 0,05$). В первой группе пациентов выделяемая *K. pneumoniae* была резистентна к карбапенемам, цефалоспорином и фторхинолонам, во второй – чувствительна к вышеперечисленным группам антибактериальных препаратов ($p < 0,05$). Синегнойная палочка была чувствительной к ципрофлоксацину, цефалоспорином и карбапенемам только во второй группе, проявив умеренную устойчивость в 23% случаев ($p < 0,05$). В обеих группах *P. aeruginosa* была чувствительной к тигециклину и колистину ($p > 0,05$). В свою очередь, *Acinetobacter spp.* был чувствителен к тигециклину и сульбактаму в 100% случаев, проявив резистентность к карбапенемам, фторхинолонам и цефалоспорином в исследуемых группах ($p > 0,05$).

В ходе проведенного исследования определяли массу формируемой биопленки с использованием в качестве красителя генцианвиолет по ранее описанной методике [12] и процентное содержание ДНК в составе биопленки по предложенной нами методике. Предлагаемый нами метод определения процентного содержания ДНК в составе микробной биопленки основан на определении количества ДНК в биологическом образце путем флуоресценции с использованием в качестве флуорохрома раствора красителя DAPI. Получена приоритетная справка о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение «Способ определения процентного содержания ДНК в составе микробной биопленки» от 06.08.2018 № а20180266 [13].

Для проведения вышеописанного способа формировали биопленку в полистироловом планшете и определяли концентрацию ДНК в ее составе [12]. Для этого из суточной культуры микроорганизмов, выращенной на мясо-пептонном агаре, готовили взвесь на бульоне Мюллера-Хинтона с оптической плотностью 0,5 единицы ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). По 150 мкл полученной взвеси микроорганизмов вносили в лунки плоскодонного планшета. Отрицательным контролем были лунки, содержащие по 150 мкл бульона Мюллера-Хинтона.

Планшет герметично закрывали и инкубировали в термостате при 37°C в течение 48 часов в капнофильных условиях. Для того чтобы максимально очистить биопленку, ее четырехкратно промывали дистиллированной водой с помощью автоматической мойки (150 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл). В лунки добавляли по 160 мкл 2,5% раствора глутаральдегида для фиксации биопленки, через 5 минут вновь промывая дистиллированной водой по вышеописанному методу. Для того чтобы окрасить ДНК в составе биопленки в лунки вносили по 180 мкл раствора флуоресцентного красителя DAPI в концентрации 4 мкг/мл, вновь промывая дистиллированной водой через 10 минут и после высушивая в течение 10 минут. Добавлением по 200 мкл 96% раствора этилового спирта экстрагировали краситель в лунки. Через 15 минут содержимое всех лунок собирали стерильным наконечником и разводили в 8 раз дистиллированной водой. Для определения уровня флуоресценции полученный раствор, содержащий биопленку, помещали в кварцевую кювету и измеряли на флуориметре при λ_{ex} 358 нм и λ_{em} 461 нм интенсивность флуоресценции, возникающую при облучении ультрафиолетовыми лучами полученного раствора.

После построения калибровочного графика, который отражал зависимость концентрации ДНК от интенсивности флуоресценции, возникающей при облучении ультрафиолетовыми лучами (рис. 1), была получена формула для расчета концентрации ДНК в биопленке (мкг/мл):

$$\text{ДНК} = 0,44 + 5,93 * E,$$

где:

ДНК – концентрация ДНК в составе био-

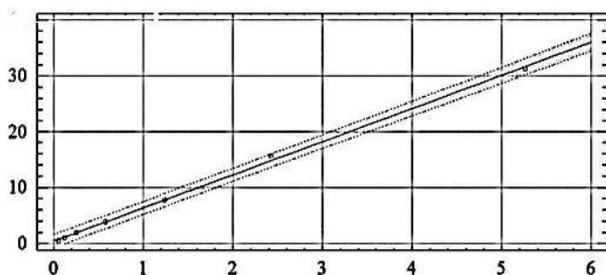


Рисунок 1 – Калибровочный график зависимости концентрации ДНК от интенсивности флуоресценции, возникающей при облучении ультрафиолетовыми лучами: на оси абсцисс показаны значения интенсивности флуоресценции раствора, а на оси ординат – значения концентрации ДНК в мкг/мл.

пленки в мкг/мл;

E – интенсивность флуоресценции полученного раствора.

Исходя из процентного содержания ДНК в биопленке и массы биопленки в лунке, рассчитывали процентное содержание ДНК в биопленке по формуле:

$$\% \text{ ДНК} = \text{ДНК} / m * 100\%;$$

где:

% ДНК – процентное содержание ДНК в биопленке;

ДНК – концентрация ДНК в составе биопленки, мкг/мл;

m – масса биопленки в одной лунке, мкг [12].

Предложенный способ позволяет определить процентное содержание ДНК в биопленке, что дает возможность обеспечить персонализированный подход к выбору антибактериальной терапии. С использованием предложенного нами способа были определены вес микробной биопленки и процентное содержание ДНК в ней у 238 изолятов, выделенных из мокроты и зева пациентов с респираторными инфекциями средней и тяжелой степени тяжести. Полученные результаты массы микробной биопленки и процентного содержания ДНК в ней исследуемых групп пациентов представлены в таблице 1.

Микроорганизмы, выделяемые при тяжелых респираторных инфекциях у пациентов, находящихся на лечении в ОРИТ, отличались устойчивостью к большинству используемых препаратов и имели большой вес образуемой ими микробной биопленки и процентное содержание ДНК в ней. Микроорганизмы, выделяемые при респираторных инфекциях средней степени тяжести, наоборот, отличались сохранением чувствительности к используемым лекарственным средствам. Из исследованных микроорганизмов наибольшую массу образуемой биопленки, а также процентное содержание ДНК в ее составе имела *P. aeruginosa*, выделенная при тяжелых респираторных инфекциях в ОРИТ, составив 48,25 [30,5-70,1] мкг/мл и 5,21 [2,17-7,67] %, соответственно, $p=0,04$. Масса биопленки, образуемая *P. aeruginosa*, и процентное содержание ДНК в ней были значимо выше массы биопленки и содержания ДНК в ней у *Acinetobacter spp.* ($p=0,01$ и $p=0,03$). Масса микробной биопленки и содержание ДНК среди остальных микроорганизмов, выделяемых при тяжелых респираторных инфекциях внутри группы, статистически значимо не различались, как и масса микробной биопленки

Таблица 1 – Масса микробной биопленки и процентное содержание ДНК в ней у пациентов с респираторными инфекциями средней и тяжелой степени тяжести

Микроорганизм	1-ая группа пациентов		2-ая группа пациентов		Достоверность результатов	
	Масса БП, мг/мл Me LQ-UQ n=183	% ДНК, Me LQ-UQ n=87	Масса БП, Me LQ-UQ n=55	% ДНК, Me LQ-UQ n=60	Масса БП	% ДНК
<i>P. aeruginosa</i>	48,25 30,1-70,2	5,21 2,17-7,67	29,43 20,3-53,7	0,00 0,00-0,00	p=0,00	p=0,00
<i>Acinetobacter spp.</i>	46,87 36,8-65,3	2,59 1,85-4,53	32,39 19,62-40,66	0,86 0,3-3,55	p=0,03	p=0,048
<i>K. pneumoniae</i>	41,0 31,79-64,94	3,75 2,99-4,86	19,0 4,84-74,32	1,9 1,59-4,69	p=0,02	p=0,048
<i>S. aureus</i>	47,5 35,37-70,98	2,05 1,94-2,16	25,7 15,56-29,35	1,32 0,71-1,59	p=0,01	p=0,04

Таблица 2 – Распределение пациентов на умерших и выживших в зависимости от антибиотикочувствительности выделяемых изолятов

Группы выделенных изолятов	Количество пациентов	
	Умерли	Выжили
Изоляты, выделенные из 1-ой группы пациентов	77	60
Изоляты, выделенные из 2-ой группы пациентов	0	182

и количество ДНК среди микроорганизмов, выделяемых при инфекциях средней степени тяжести. Выявлена сильная связь между процентным содержанием ДНК в микробной биопленке *P. aeruginosa* и степенью тяжести заболевания $r=0,73$ $p<0,05$, слабая связь – при *Acinetobacter spp.* $r=0,35$, $p<0,05$. Между степенью тяжести заболевания и процентным содержанием ДНК в микробной биопленке, образуемой *K. pneumoniae* и *S. aureus*, статистически значимой корреляции обнаружено не было ($p>0,05$).

При изучении влияния антибиотикочувствительности выделяемых из патологического очага изолятов на показатель летальности использовался точный критерий Фишера. Пациенты были распределены на группы следующим образом (табл. 2).

Учитывая, что $p<0,01$ делаем вывод о наличии прямой взаимосвязи между резистентностью выделяемого изолята к антибактериальным препаратам и вероятностью летального исхода. Частота неблагоприятного исхода при выделении антибиотикоустойчивых изолятов статистически значимо выше, чем при выделении антибиотикочувствительных. При изучении влияния выделяемого вида микроорганизма на показатель

летальности последний при выделении грамотрицательных микроорганизмов был значимо выше, чем при выделении грамположительных микроорганизмов. Летальность не отличалась при выделении *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* ($p=0,29$), однако риск неблагоприятного исхода возрастал при сравнении с *Acinetobacter spp.* ($p<0,01$ и $p<0,01$).

Было выдвинуто предположение: чем выше процентное содержание ДНК в составе микробной биопленки микроорганизма, тем более патогенный микроорганизм, имеющий больший вес микробной биопленки, что в свою очередь препятствует доступности антибактериальных препаратов, требует замены на лекарственные средства, способные проникать через биопленку, а также ухудшает прогноз развития заболевания и повышает летальность.

Анализ результатов с применением ROC-анализа позволил предложить летальный исход заболевания с высокой степенью вероятности при массе микробной биопленки более 47,5 мг/лунку и процентном содержании ДНК в составе биопленки более 2,33% ($p<0,01$).

ROC-анализ полученных данных представлен в таблице 3 и на рисунках 2 и 3.

Таблица 3 – ROC-анализ данных, полученных при исследовании массы биопленки и процентного содержания ДНК в них для оценки прогноза выживаемости

Оцениваемый показатель	Д	ДС, %	ДЧ, %	Площадь под кривой	p
Масса БП, мкг/лунку	>47,5	100	91,6	0,98	0,00
Процентное содержание ДНК в БП, %	>2,33	98,2	86,4	0,96	0,00

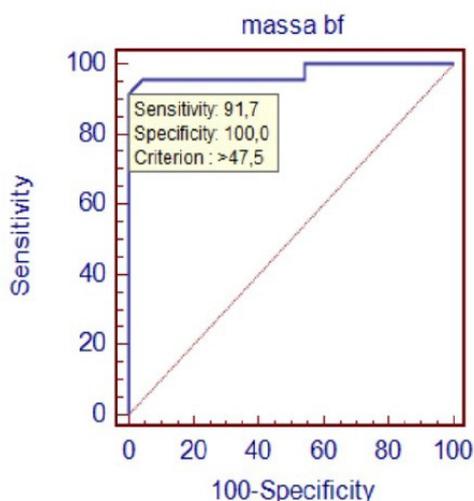


Рисунок 2 – ROC-анализ данных массы биопленки для оценки прогноза выживаемости.

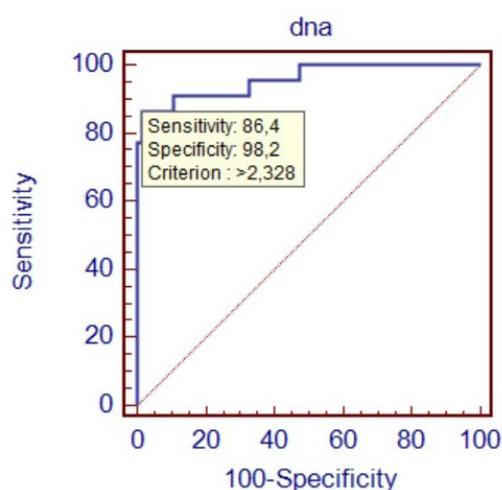


Рисунок 3 – ROC-анализ данных процентного содержания ДНК в составе биопленки для оценки прогноза выживаемости.

Исследование показало, что шансы летального исхода в 348,3 раза выше при уровне процентного содержания ДНК в составе микробной биопленки более 2,33%, чем в группе выживших пациентов при процентном содержании ДНК, равном или менее 2,33% и в 506 раз выше при уровне массы микробной биопленки 47,5 мкг/лунку, чем в группе выживших пациентов при массе микробной биопленки менее 47,5 мкг/лунку (95% ДИ 34,15 – 3553,53 и 95% ДИ 27,77 – 3553,53).

Заключение

Разработан способ определения процентного содержания ДНК в составе микробного сообщества с использованием в качестве флуорохрома раствора красителя 4'6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид, позволяющий судить об агрессивности микроорганизма и тяжести вызываемой им инфекции, что дает возможность обеспечить персонализированный подход к выбору антибактериальной терапии на основе способности лекарственного средства проникать через биопленку.

Средний возраст лиц, заболевших тяжелыми формами респираторных инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми микроорга-

низмами, был статистически больше группы с заболеваниями средней степени тяжести, вызванными микроорганизмами, чувствительными к антибактериальной терапии ($p < 0,05$). Частота неблагоприятного исхода при выделении *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae* ($p = 0,29$) не различалась, однако риск неблагоприятного исхода возрастал при сравнении с *Acinetobacter* spp. ($p < 0,01$) и *S. aureus* ($p < 0,01$).

Микроорганизмы, формирующие биопленку и отличающиеся большим количеством жизнеспособных бактерий в ней, более патогенны и способны инициировать тяжелый воспалительный процесс. При массе микробной биопленки более 47,5 мкг/лунку и процентном содержании ДНК в составе биопленки более 2,33% вероятность летального исхода заболевания увеличивается в 506 и 348,3 раза соответственно ($p < 0,01$).

Работа выполнена в рамках темы НИР «Системная воспалительная реакция при тяжелой бактериальной пневмонии: молекулярно-генетические механизмы патогенеза и их прогностическая роль в оценке эффективности антибактериальной терапии», договор с БРФФИ № М19М-028 от 02.05.2019.

The investigation was conducted within the frames of the scientific research work theme «Systemic inflammatory reaction in severe bacterial pneumonia: molecular-genetic mechanisms of the pathogenesis and their prognostic role in the evaluation of the antibiotic therapy efficacy», agreement with Belarusian Republican Fund of Fundamental Research № M19M-028 dated 02.05.2019

Литература

1. Лямин, А. В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы / А. В. Лямин, Е. А. Боткин, А. В. Жестков // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия*. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 17–22.
2. Тец, В. В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии / В. В. Тец, Г. В. Тец // *Практ. пульмонология*. – 2013. – № 4. – С. 60–64.
3. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И. В. Чеботарь [и др.] // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия*. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 51–58.
4. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation / T. Das, [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010 May. – Vol. 76, N 10. – P. 3405–3408.
5. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms / D. M. Goeres [et al.] // *Microbiology*. – 2005 Mar. – Vol. 151, pt. 3. – P. 757–762.
6. Ormerod, M. G. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology

References

1. Lyamin AV, Botkin EA, Zhestkov AV. Methods for identifying biofilms in medicine: opportunities and prospects. *Klin Mikrobiologiya Antimikrob Khimioterapiia*. 2012;14(1):17-22. (In Russ.)
2. Tets VV, Tets GV. Microbial biofilms and problems of antibiotic therapy. *Prakt Pul'monologiya*. 2013;(4):60-4. (In Russ.)
3. Chebotar' IV, Mayanskiy AN, Konchakova ED, Lazareva AV, Chistyakova VP. Antibiotic resistance of biofilm bacteria. *Klin Mikrobiologiya Antimikrob Khimioterapiia*. 2012;14(1):51-8. (In Russ.)
4. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol*. 2010 May;76(10):3405-8. doi: 10.1128/AEM.03119-09
5. Goeres DM, Loetterle LR, Hamilton MA, Murga R, Kirby DW, Donlan RM. Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology*. 2005 Mar;151(Pt 3):757-62. doi: 10.1099/mic.0.27709-0
6. Ormerod MG, Tribukait B, Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. *Anal Cell Pathol*. 1998;17(2):103-10.
7. Sackoet M, Delacotte N, Bah M, Conti M, inventors; No voste Corporation, assignee. Method for assaying nucleic

7. Method for assaying nucleic acids by fluorescence : patent GOIN 21164, C12Q 1/68 / M. Sackoet, N. Delacotte, M. Bah, M. Conti. – № WO 2008017948 A2 ; applicated 10.08.07 ; published 14.02.08.
8. Smith, R. A. Antibiotic Resistance: a primer and call to action / R. A. Smith, N. M. M'ikanatha, A. F. Read // *Health Commun.* – 2015. – Vol. 30, N 3. – P. 309–314.
9. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hoiby [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2010 Apr. – Vol. 35, N 4. – P. 322–332.
10. Микробиологические методы исследования биологического материала : инструкция по применению № 075-0210 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 13 марта 2010 г. – Минск, 2010. – 75 с.
11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, valid from 2019-01-01 [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. – Date of access: 08.10.2019.
12. Окулич, В. К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В. К. Окулич, А. А. Кабанова, Ф. В. Плотников. – Витебск : ВГМУ, 2017. – 300 с.
13. Способ определения процентного содержания ДНК в составе микробной биопленки : пат. Респ. Беларусь, МКП С 12Q 1/04 / Окулич В. К., Колчанова Н. Э., Корнилов А. В., Земко В. Ю. ; заявитель и патентообладатель Витеб. гос. мед. ун-т. – № а 20180266 ; заявл. 18.06.18 ; опубл. 06.08.2018.

Поступила 28.06.2019 г.

Принята в печать 27.09.2019 г.

- acids by fluorescence. WO patent 2008017948 A2, GOIN 21164, C12Q 1/68. 2008 Feb 14.
8. Smith RA, M'ikanatha NM, Read AF. Antibiotic Resistance: a primer and call to action. *Health Commun*. 2015;30(3):309-14. doi: 10.1080/10410236.2014.943634
9. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Apr;35(4):322-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
10. Microbiological methods for the study of biological material: instruktisiia po primeneniiu № 075-0210: utv M-vom zdravookhraneniia Resp Belarus' 13 marta 2010 g. Minsk, RB; 2010. 75 p. (In Russ.)
11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, valid from 2019-01-01. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. [Accessed 08th Oct 2019].
12. Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy. Vitebsk, RB: VG MU; 2017. 300 p. (In Russ.)
13. Okulich VK, Kolchanova NE, Kornilov AV, Zemko VYu; zaiavitel' i patentoobladatel' Viteb gos med un-t. The method for determining the percentage of DNA in the composition of the microbial biofilm: pat Resp Belarus', МКП S 12Q 1/04. № а 20180266; zaiavl 18.06.18; opubl 06.08.2018. (In Russ.)

Submitted 28.06.2019

Accepted 27.09.2019

Сведения об авторах:

Земко В.Ю. – аспирант кафедры анестезиологии и реаниматологии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6753-2074>;

Окулич В.К. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8226-6405>;

Дзядзько А.М. – д.м.н., заведующий отделом анестезиологии и реанимации, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1965-1850>;

Колчанова Н.Э. – к.м.н., доцент кафедры терапевтической стоматологии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный медицинский университет;

Корнилов А.В. – аспирант кафедры хирургии ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8709-6639>;

Сенькович С.А. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Information about authors:

Ziamko V.Y. – postgraduate of the Chair of Anesthesiology and Resuscitation with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6753-2074>;

Okulich V.K. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Clinical Microbiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8226-6405>;

Dzyadzko A.M. – Doctor of Medical Sciences, head of the Department of Anesthesiology and Resuscitation, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1965-1850>;

Kolchanova N.E. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Restorative Dentistry with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;

Kornilov A.V. – postgraduate of the Chair of Surgery of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8709-6639>;

Senkovich S.A. – Candidate of Medical Sciences, associate professor of the Chair of Clinical Microbiology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра анестезиологии и реаниматологии с курсом ФПК и ПК. E-mail: torinet@tut.by – Земко Виктория Юрьевна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Anesthesiology and Resuscitation with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining. E-mail: torinet@tut.by – Viktoriya Y. Ziamko.