

© МАНАЕНКОВА Е.В., САВИН А.А., 2015

УДК 616.24-002.5-078:577.21:083

Манаенкова Е.В., Савин А.А.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «ТБ-БИОЧИП» В ТАМБОВСКОЙ ОБЛАСТИ

ГБУЗ «Тамбовский областной клинический противотуберкулезный диспансер», 392513, пос. «Георгиевский», Тамбовская область, Российская Федерация

Проведен анализ использования метода биологических микрочипов, разработанного в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, – "ТБ-Биочип", предназначенного для выявления ДНК возбудителя туберкулеза в диагностическом материале из органов дыхания человека и определения его лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду. Показано, что "ТБ-Биочип" является чувствительным и высокоспецифичным методом определения лекарственной чувствительности к основным противотуберкулезным препаратам, при этом время анализа не превышает 72 ч.

Проведен сравнительный анализ результатов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза двумя ускоренными методами: "ТБ-Биочип" (ООО "Биочип"-ИМБ) и ВАСТЕС™ MGIT™ 960 ("Becton Dickinson"). Данные, полученные двумя методами, совпали в 97,6% случаев для рифампицина и в 92,1% для изониазида.

Ключевые слова: туберкулез; лекарственная чувствительность; МЛУ ТБ; биочип.

Manaenkova E.V., Savin A.A.

THE EXPERIENCE OF APPLICATION OF TEST SYSTEM "TB-BIOCHIP" IN THE TAMBOV OBLAST

The Tambov oblast clinical ant-tuberculosis dispensary, 392513 Georgievskii settlement, Tambov oblast, Russia

The analysis was implemented concerning application of biological chips technique developed by the V.A. Engelgardt institute of molecular biology - "TB-Biochip" designed for detecting DNA agent of tuberculosis in diagnostic samples of human respiratory organs and establishing its medicinal sensitivity to rifampicin and isoniazid. It is demonstrated that "TB-Biochip" is a sensitive and highly specific method of detecting medicinal sensitivity to main anti-tuberculosis pharmaceuticals. At that, analysis time amount to less than 72 hours. The comparative analysis was carried out concerning results of detection of medicinal sensitivity of mycobacteria by two express techniques - TB-Biochip (Biochip-IMB) and VASTECTM MGITM 960 ("Becton Dickinson"). The data obtained by two techniques matched in 97.6% for rifampicin and in 92.1% for isoniazid.

Keywords: tuberculosis; medicinal sensitivity; multiple medicinal resistance; tuberculosis agent.

В последнее время в Российской Федерации, так же как и во всем мире, уделяется особое внимание изучению распространения с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя туберкулеза (МЛУ ТБ), когда микобактерии туберкулеза устойчивы как минимум к двум основным противотуберкулезным препаратам – изониазиду (INH) и рифампицину (RMP).

МЛУ ТБ оказывает существенное влияние на частоту распространения туберкулеза за счет позднего выявления при использовании культурального метода и неадекватного применения лекарственных средств, при котором против генетически различных вариантов *M. tuberculosis* применяются не соответствующие им типы лекарственных препаратов.

В течение последних трех лет на территории Тамбовской области, несмотря на некоторую стабилизацию показателя заболеваемости туберкулезом (2008 г. – 56 на 100 000, 2009 г. – 57,7, 2010 г. – 55,5), количество случаев МЛУ ТБ среди впервые выявленных больных туберкулезом легких увеличилось в 3 раза: 2008 г. – 6,2%, 2009 г. – 11,7%, 2010 г. – 18,2% [1].

В рамках реализации мероприятий Федеральной целевой программы "Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007–2011 годы)" централизованная бактериологическая лаборатория ГБУЗ "Тамбовский областной клинический противотуберкулезный диспансер" получила комплект оборудования, расходные материалы и наборы тест-системы "ТБ-Биочип" для отдела биочип-диагностики туберкулеза. В мае 2009 г. оборудование введено в эксплуатацию.

Проведен анализ использования метода биологических микрочипов, разработанного в Институте молекулярной био-

логии им. В.А. Энгельгардта, – "ТБ-Биочип" [2]. Тест-система "ТБ-БИОЧИП" предназначена для выявления ДНК возбудителя туберкулеза в диагностическом материале из органов дыхания человека и определения его лекарственной чувствительности (ЛЧ) к RMP и INH методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе [3–5]. Проведен сравнительный анализ результатов определения ЛЧ МБТ двумя ускоренными методами: биочип-анализ и ВАСТЕС™ MGIT™ 960 ("Becton Dickinson").

Материалы и методы. Респираторный материал (мокрота) поступал от больных, проходящих лечение в ГБУЗ «Тамбовский областной противотуберкулезный диспансер». Всего за период 2009–2010 гг. обследовано 873 больных с клинически подтвержденным диагнозом туберкулеза легких, среди которых выявлено 57,6% ($n = 503$) бацилярных больных. Этой категории больных проведен комплекс лабораторно-диагностических исследований, используемых в нашей лаборатории: люминесцентная микроскопия, культуральный метод, посев в жидкую питательную среду (ВАСТЕС™ MGIT™ 960), биочип-диагностика.

Для выявления микобактерий туберкулеза и определения ЛЧ возбудителя от каждого пациента получали по две порции мокроты. Одна порция направлялась для культурального анализа на жидких и плотных питательных средах, другая – использовалась для анализа с помощью биочипов.

Деконтаминацию образцов мокроты проводили в соответствии с рекомендациями CDC. К мокроте добавлялся равный объем раствора NALC-NaOH, пробирка встряхивалась в течение 15–20 мин. Затем разжиженный образец разводился стерильным буфером PBS (рН 6,8) и центрифугировался при 3000 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Супернатант удалялся, а осадок использовался для приготовления мазков (с окраской флюорохромными красителями) и посева на плотную питательную среду Левенштейна–Йенсена (НИЦФ, Санкт-Петербург). Пробир-

Для корреспонденции:

Манаенкова Елена Владиславовна, врач-бактериолог, зав. лаб.
Адрес: 392513, Тамбовская область, п. «Георгиевский»
E-mail: madam.manaenkova@yandex.ru

Таблица 1

Диагностическая чувствительность обнаружения возбудителя туберкулеза из мокроты методом "ТБ-Биочип" по сравнению с традиционными методами

Метод обнаружения <i>M. tuberculosis</i> и показатель	Число				Итого	
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	абс.	%
Люминесцентная микроскопия	289	0	13	0	302	69,1
Посев на плотные питательные среды	289	133	0	0	422	96,6
Выявлено методом "ТБ-Биочип"	258	58	4	2	322	73,7
Количество образцов	289	133	13	2	437	(100)

ки с плотной питательной средой инкубировали до 10 нед с еженедельным контролем роста.

Молекулярно-генетическое исследование с помощью тест-системы "ТБ-Биочип" (ООО «Биочип-ИМБ», Россия) проводилось по методике, рекомендованной производителем. Метод включает в себя выделение ДНК *M. tuberculosis* из респираторных образцов, проведение двух последовательных мультиплексных ПЦР, гибридизации продуктов амплификации II стадии ПЦР на биочипе. Результаты гибридизации регистрировали на портативном анализаторе биочипов (ООО "Биочип-ИМБ", Россия) с соответствующим программным обеспечением.

Идентификацию МБТ культуральным методом выполняли с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 ("Becton Dickinson", Sparks, MD). Полученный после центрифугирования отмытый осадок засеивали в индикаторные пробирки MGIT с жидкой питательной средой Middlebrook 7H9, обогащенной ростовой MGIT Growth Supplement и обеззараживающей MGIT PANTA добавками. Параллельно проводился посев осадка диагностического материала на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена (НИЦФ, Санкт-Петербург). Положительный результат, свидетельствующий о росте *M. tuberculosis* в пробирке MGIT, подтверждали микроскопией по Ziehl-Neelsen, отсутствием роста на среде Левенштейна-Йенсена с салициловым натрием и пара-нитробензойной кислотой.

ЛЧ *M. tuberculosis* к изониазиду и рифампицину с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960 определяли с использованием стандартных критических концентраций изониазида – 0,1 мкг/мл и рифампицина – 1 мкг/мл. Результаты регистрировали в автоматическом режиме, исходя из учета роста референс-штамма *M. tuberculosis* в контрольной пробирке на 4–13-й день.

Результаты и обсуждение. По данным лабораторно-диагностического комплекса исследований образцов мокроты ($n = 437$), полученной от бациллярных больных (в 2009 г. $n = 161$, в 2010 г. $n = 276$), диагностическая чувствительность обнаружения возбудителя туберкулеза разными лабораторными методами представлена в табл. 1. Все случаи разделены на четыре группы по результатам микроскопии и посева на плотные питательные среды и для каждой группы приведено количество образцов, подтвержденных методом "ТБ-Биочип". Из табл. 1 видно, что наибольшая чувствительность метода биочипов достигается при анализе образцов положительных по микроскопии – 87% (258 ± 4 из 289 ± 13), в то время как в группе образцов, отрицательных по микроскопии, но обнаруживших рост на плотных средах выявляемость составляет только 44%.

Относительно невысокая диагностическая чувствительность биочип-анализа при прямом исследовании мокроты образцов с отрицательными результата-

ми бактериоскопического исследования на наличие кислотоустойчивых микобактерий (39% в 2009 г. и 47% в 2010 г.) могла быть обусловлена: контингентом обследуемых больных, низкой концентрацией возбудителя в образцах респираторных образцов.

Таблица 2

Спектр мутаций в гене *rpoB* МБТ в образцах ДНК из мокроты впервые выявленных и повторно леченных больных

Кодон	Впервые выявленные				Повторно леченные				
	абс.	%	типы мутаций	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Ser531	67	68,4	Leu	65	66,3	39	54,2	35	48,6
			Gln	2	2			1	1,4
			Cys					2	2,8
			Gly					1	1,4
His526	7	7,1	Cys	4	4,1	14	19,4	2	2,8
			Leu	2	2			2	2,8
			Arg	1	1			3	4,2
			Pro					2	2,8
			Tyr					3	4,2
			Gln					2	2,8
Asp516	4	4,1	Tyr	2	2			2	2,8
			Gln	2	2	4	5,6		
			Val					2	2,8
Met515	1	1	Ile	1		2		2	
Leu511	5	5,1	Arg	5	5,1	3	4,2		
			Pro					3	4,2
Gln513	3	3,1	Gly	3	3,1	1	1,4	1	1,4
Ser522	1	1	Leu	1	1	2	2,8	2	2,8
Ser512	3	3,1	Arg	2	2				
			Thr	1	1				
Leu533	4	4,1	Pro	4	4,1				
Двойные мутации									
Ser531	3	3,1	Leu	1	1	7	9,7		
His526			Cys						
Ser531			Leu			2			
Leu511			Arg						
Ser531			Gly					2	2,8
His526			Pro						
Ser531			Leu					2	2,8
Asp516			Val						
Ser531			Leu					2	2,8
Met515			Ile						
Ser531			Leu					1	1,4
Ser512			Thr						
Всего ...	98					72			

Таблица 3

Спектр мутаций, приводящих к устойчивости к INH, в образцах ДНК из мокроты впервые выявленных и повторно леченных больных

Локус	Позиция	Замены	Впервые выявленные		Повторно леченные	
			абс.	%	абс.	%
katG	Ser315	Thr (1)	86	78,9	39	46,4
		Gly	5	4,6	9	10,7
inhA	A-8	G			1	1,2
	C-15	T	6	5,5	7	8,3
ahpC-oxyR	A-16	G	2	1,8	3	3,6
	9	A	1	0,9		
	10	T	2	1,8	2	2,4
	12	T			4	4,8
Двойные мутации						
katG	Ser315	Thr (1)				
inhA	C-15	T	3	2,8	8	9,5
	Ser 315	Gly	2	1,8	3	3,6
inhA	C-15	T				
	C-15	T	1	0,9	6	7,1
ahpC-oxyR	12	T				
katG	Ser315	Gly	1	0,9	2	2,4
	Trp328	Gly				
Всего ...			109		84	

ракторного материала, кратностью исследования (прямое исследование мокроты на биочипах проводилось однократно). Увеличение кратности анализа до трех исследований мокроты от одного больного, по данным методических указаний, способно повысить диагностическую информативность и клиническую значимость ПЦР-анализа на 30% [6, 7].

Начиная с февраля 2011 г. пробы от диагностических больных на исследование методом биочип-анализа отбираются в лаборатории самостоятельно по результатам положительной микроскопии осадка с целью максимально эффективного использования биочип-технологии в условиях ограниченного финансирования для охвата наиболее эпидемически опасной группы больных с легочной формой туберкулеза.

В 2010 г. в лаборатории введена автоматизированная система ВАСТЕС™ MGIT™ 960. Методом посева на среду Левенштейна-Йенсена (НИЦФ, Санкт-Петербург) в 2010 г. было выявлено 268 (78%) положительных образцов, методом биочип-анализа – 233 (68%). Для методики Бактек количество положительных образцов составило 336 (98%).

352 положительных образца ДНК МБТ из мокроты больных туберкулезом легких протестированы на чувствительность к RMP и INH с помощью тест-системы "ТБ-Биочип": 254 (72,2%) пациентов относились к впервые выявленным и 98 (27,8%) больных получали лечение ранее.

Из образцов мокроты больных, взятых на учет за 2009–2010 гг., выделено 98 (38,5%) МЛЮ-штаммов *M. tuberculosis*, 11 (4,3%) штаммов с моноустойчивостью к INH. Среди больных, получавших лечение ранее, процент выделения МЛЮ-штаммов составил 68,4 ($n = 67$), на долю штаммов с моноустойчивостью к INH пришлось 17,3% ($n = 17$), с моноустойчивостью к RMP – 5,1% ($n = 5$).

В ходе исследования проанализировано 170 RMP-резистентных штаммов МБТ (табл. 2). Среди впервые выявленных больных ($n = 98$) обнаружено 16 типов различных мутаций, затрагивающих 9 кодонов гена *rpoB*, из которых 14 – изолированные нуклеотидные замены и 2 двойные мутации. Среди больных, повторно получавших лечение ($n = 72$), выявлено 20 типов мутаций, затрагивающих 8 кодонов гена *rpoB*, из которых 16 – единичные нуклеотидные замены и 4 двойные мутации.

Таблица 4

Сравнение результатов лекарственной устойчивости к RMP и INH методом биочипов и методом ВАСТЕС MGIT 960

Метод определения ЛЧ <i>M. tuberculosis</i>		ВАСТЕС MGIT 960		
		INH ^R	INH ^S	всего
"ТБ-Биочип"	INH ^R	100	9	109
	INH ^S	11	134	145
	Всего ...	111	143	254
ВАСТЕС MGIT 960				
		RMP ^R	RMP ^S	всего
"ТБ-Биочип"	RMP ^R	95	3	98
	RMP ^S	3	153	156
	Всего ...	98	156	254

На долю мутаций, обеспечивающих высокий уровень резистентности к RMP (мутации в кодонах 531, 526 и 513), в исследованной выборке пришлось 77% ($n = 131$), в том числе среди впервые выявленных больных 78,6% ($n = 77$), среди повторно леченных больных 75% ($n = 54$). Доминирующей является мутация в кодоне 531, она выявлена в 106 (62,4%) из 170 образцов ДНК МБТ, устойчивых к RMP: среди впервые выявленных больных 68,4% ($n = 67$), среди повторно леченных больных 54,2% ($n = 39$).

На 2-м месте по частоте встречаемости находятся мутации в кодоне 526, их распространенность составила 12,4% (21 из 170). 3-е место – мутации в кодонах 516 – 4,7% ($n = 8$) и 511 – 4,7% ($n = 8$).

По данным литературы, мутации в кодонах 533, 512, 522 и 513 являются редкими [8]. В нашем исследовании на их долю пришлось 11,2% ($n = 11$) среди впервые выявленных больных и 3,1% ($n = 3$) среди повторно леченных больных.

Мутации, ассоциированные с устойчивостью к INH, выявлены в 193 (54,8%) образцах ДНК из 352 протестированных, в том числе от впервые выявленных больных – в 109 образцах, от повторно леченных больных – в 84 образцах. В спектре мутаций преобладали замены в гене *katG* ($n = 158$), суммарная доля которых составила 81,8%, причем изолированные замены в кодоне 315 ($n = 139$) имели наибольший удельный вес – 72%. Среди них чаще встречалась замена *katG* 315Ser → Thr (AGC → ACC) – 64,7% ($n = 125$). Сочетанные мутации, обуславливающие устойчивость к INH, идентифицированы в 26 (13,5%) образцах мокроты (табл. 3).

Исходя из приведенных данных, в обеих группах пациентов чаще встречались штаммы МБТ с мутацией кодона 315 гена *katG* (Ser → Thr) : для впервые выявленных больных – 83,4% ($n = 91$), для больных, получавших лечение повторно, – 57,1% ($n = 48$). Устойчивость к INH, связанная с изолированной мутацией в гене *inhA*, выявлена в 7,3% случаев ($n = 8$) у впервые выявленных больных и в 13,1% случаев ($n = 11$) у повторно леченных. На долю мутаций в локусе *aph-oxyR* пришлось 2,7% ($n = 3$) и 7,1% ($n = 6$) соответственно. Сочетанные мутации в группе впервые выявленных больных определялись в 6,4% случаев ($n = 7$), в группе повторно леченных больных в 22,6% случаев ($n = 19$).

С целью сравнительного анализа результатов исследования ЛЧ фенотипическим и генотипическим методами было проанализировано 254 штамма МБТ, выделенных от впервые выявленных больных с легочной формой туберкулеза. Исследование культур МБТ на чувствительность к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда проводили с помощью автоматизированной системы культуральной диагностики на жидких средах ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и молекулярно-генетическим методом посредством тест-системы "ТБ-Биочип".

По данным исследований, проведенных в нашей лаборатории, совпадение результатов определения ЛЧ к RMP и INH методом гибридизации на биочипах и методом пропорций (ВАСТЕС MGIT 960) составило для RMP 97,6% ($n = 248$), для INH 92,1% ($n = 234$). Данные приведены в табл. 4.

При этом чувствительность биочип-анализа составила 96,9% для рифампицина и 90% для изониазида. Специфичность данного метода 98 и 93,7% соответственно (см. табл. 4).

Дополнительно в 2010 г. с помощью тест-системы "ТБ-Биочип" протестировано 20 штаммов МБТ (ФСВОК). Результаты исследования чувствительности контрольных культур к INH и RMP совпали с референсными, доля совпадения 100%.

Выводы. 1. Использование биологических микрочипов дает возможность работы как с клиническими образцами (при соблюдении кратности обследования диагностических больных), так и с культурами для быстрого определения ЛЧ к основным противотуберкулезным препаратам.

2. Тест-система "ТБ-Биочип" позволяет точно определять и дифференцировать конкретные мутации в наиболее значимых кодонах основных генов, ассоциирующихся с устойчивостью к RMP и INH, что способствует правильному выбору тактики лечения больных и поможет пресечь дальнейшее распространение штаммов МБТ с МЛН в регионе.

3. Молекулярно-биологический метод гибридизации на микрочипах является быстрым (время проведения анализа, включая обработку биологического материала, составляет 72 ч), с высоким процентом чувствительности и специфичности методом определения ЛЧ к основным противотуберкулезным препаратам.

4. Результаты определения ЛЧ МБТ посредством тест-системы "ТБ-Биочип" совпали с данными, полученными при культуральном исследовании на жидких питательных средах (ВАСТЕС MGIT 960) для RMP в 97,6% образцов, для INH – в 92,1%.

5. Профиль мутаций генов *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC-oxuR*, выявленных на территории Тамбовской области, имеет сходство по частоте и спектру мутаций в ЦФО и Российской Федерации в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Туберкулез в Российской Федерации 2009. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации. М.; 2010.
2. Мирзабеков А.Д., Прокопенко Д.В., Четкин В.Р. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине. *Информационные медико-биологические технологии*. М.; 2002: 166–98.
3. Грядун Д.А., Михайлович В.М., Лапа С.А. и др. Идентификация штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с одновременным определением их лекарственной устойчивости методом гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2003; 4: 24–31.
4. Михайлович В.М., Лапа С.А., Грядун Д.А. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТБ-микрочипе для обнаружения рифампицинрезистентных штам-

мов *Mycobacterium tuberculosis*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2001; 1: 112–7.

5. Скотникова О.И., Галкина К.Ю., Носова Е.Ю. и др. Характеристика чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину и изониазиду посредством определения мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR*, *kasA* различными молекулярно-биологическими методами. *Проблемы туберкулеза*. 2005; 8: 39–42.
6. Журавлев В.Ю., Нарвская О.В. и др. Молекулярно-генетические технологии в этиологической диагностике диссеминированного туберкулеза легких. *Журнал Микробиология*. 2010; 3: 77–81.
7. Исакова Ж.Т., Гончарова З.К., Алдашев А.А. Биологические микрочипы в экспресс-идентификации штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью у больных туберкулезом в Республике Кыргызстан. *Пульмонология*. 2008; 3: 64–6.
8. Степаншин Ю.Г., Степаншина В.Н., Шемякин И.Г. Молекулярные механизмы устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам. *Антибиотики и химиотерапия*. 1999; 4: 39–43.

REFERENCES

1. Tuberculosis in Russian Federation in 2009. Analytic review of statistic indicators by tuberculosis, used in Russian Federation. Moscow; 2010. (in Russian)
2. Mirzabekov A.D., Prokopenko D.V., Chechetkin V.R. Application of matrix biochips with immobilized DNA in biology and medicine. *Informatsionnye mediko-biologicheskie tekhnologii*. Moscow; 2002: 166–98. (in Russian)
3. Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Lapa S.A. et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* with determination of drug resistances by hybridization method on oligonucleotide microchips. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2003; 4: 24–31. (in Russian)
4. Mikhailovich V.M., Lapa S.A., Gryadunov D.A. et al. Use of hybridization methods and PCR on special TB-microchips for identification of rifampicin-resistant stamms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2001; 1: 112–7. (in Russian)
5. Skotnikova O.I., Galkina K.Yu., Nosova E.Yu. et al. Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* sensitivity to rifampicin and isoniazid by determination of mutations in the gens *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR*, *kasA* by different molecular-biologic methods. *Problemy tuberkuleza*. 2005; 8: 39–42. (in Russian)
6. Zhuravlev V.Yu., Narvskaya O.V. et al. Molecular-genetic technologies at etiologic diagnostics disseminated lung tuberculosis. *Zhurnal Mikrobiologiya*. 2010; 3: 77–81. (in Russian)
7. Isakova Zh.T., Goncharova Z.K., Aldashev A.A. Biologic microchips in express-identification of *M. tuberculosis* stamms with multiple drug resistance by patients with tuberculosis in Kyrgyzstan Republic. *Pulmonologiya*. 2008; 3: 64–6. (in Russian)
8. Stepanshin Yu.G., Stepanshina V.N., Shemyakin I.G. Molecular mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to drugs. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 1999; 4: 39–43. (in Russian)

Поступила 01.09.14
Received 01.09.14