

Серии научно-практических рецензируемых журналов



# Медицинский АЛФАВИТ

19 (356) 2018



Modern  
LABORATORY

**MEDICAL ALPHABET**  
Russian Professional Medical Journal

## Современная ЛАБОРАТОРИЯ

ТОМ № 2

- Фундаментальные основы лабораторной медицины
- Разработка, производство, технологии
- Лабораторное оборудование
- Реагенты
- Новые методы
- Практика
- Экспресс-диагностика
- Организация лабораторной службы
- Конгрессы и конференции

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ» 36228

[www.medalfavit.ru](http://www.medalfavit.ru)

## Простые и надежные

- Мультиплекс: одна пробирка, один капилляр, объективный анализ и отчет
- Количественная флуоресцентная ПЦР (КФ-ПЦР)
- 22 маркера для хромосом 13, 18, 21, X и Y (набор QST\*Rplusv2), 12/11 маркеров для анализа микроделечий Y-хромосомы и специфические маркеры для оценки анеуплоидии половых хромосом X и Y (наборы MFI/MFI-Yplus)
- Один образец – одна пробирка
- От экстракции ДНК из амниотической жидкости или ворсин хориона до результата за ~4,5 часа
- Пост-ПЦР манипуляции с реакционной смесью не требуются
- Детекция капиллярным электрофорезом с использованием секвенатора ABI 3500
- Один капилляр – один образец
- Нет необходимости в конвертации или экспорте/переносе данных
- Анализ результатов стандартным программным обеспечением Gene Mapper или Gene Marker
- Простая интерпретация:
  - при нормальном количестве хромосом соотношение высоты пиков выбранных STR-маркеров составляет 1:1, анеуплоидия приводит к изменению соотношения 2:1 или появлению третьего пика 1:1:1;
  - микроделеция в Y-хромосоме приводит к исчезновению маркера, расположенного в данной области



Современная лаборатория Том №2  
 Медицинский алфавит № 19 (356) 2018  
 www.medalfavit.ru

Издатель: издательство медицинской литературы ООО «Альфмед»  
 Тел.: (495) 616-48-00, 221-76-48  
 E-mail: medalfavit@mail.ru

Учредитель и главный редактор издательства  
 Т. В. Синица

Почтовый адрес редакции:  
 1129515, Москва, ул. Академика Королева, д. 13, стр. 1,  
 подъезд 4, яч. 804А

Главный редактор серии журналов  
 «Медицинский алфавит» А. С. Ермолов

Объединенный редакционный совет журнала  
 «Медицинский алфавит»

Акимкин Василий Геннадьевич, акад. РАН, д. м. н., проф.  
 Амхадова Малкан Абдурашидовна, д. м. н., проф.  
 Балан Вера Ефимовна, д. м. н., проф.  
 Брико Николай Иванович, д. м. н., проф.  
 Бутров Андрей Валерьевич, д. м. н., проф.  
 Вавилова Татьяна Владимировна, д. м. н., проф.  
 Голубев Валерий Леонидович, д. м. н., проф.  
 Громова Ольга Алексеевна, д. м. н., проф.  
 Данилов Алексей Борисович, д. м. н., проф.  
 Евдокимов Евгений Александрович, д. м. н., проф.  
 Ермолов Александр Сергеевич, д. м. н., проф.  
 Журова Марина Владимировна, д. м. н., проф.  
 Козлов Игорь Александрович, д. м. н., проф.  
 Королева Ирина Станиславовна, д. м. н., проф.  
 Крихели Нателла Ильинична, д. м. н., проф.  
 Кузнецова Ирина Всеволодовна, д. м. н., проф.  
 Кулаков Анатолий Алексеевич, акад. РАН, д. м. н., проф.  
 Малеев Виктор Васильевич, акад. РАН, д. м. н., проф.  
 Мартынюк Тамара Витальевна, д. м. н., проф.  
 Михин Вадим Петрович, д. м. н., проф.  
 Оганов Рафаэль Гегамович, д. м. н., проф.  
 Орлова Наталья Васильевна, д. м. н., проф.  
 Остроумова Ольга Дмитриевна, д. м. н., проф.  
 Плавунов Николай Филиппович, д. м. н., проф.  
 Проценко Денис Николаевич, д. м. н., проф.  
 Покровский Валентин Иванович, акад. РАН, д. м. н., проф.  
 Покровский Вадим Валентинович, акад. РАН, д. м. н., проф.  
 Скоромец Александр Анисимович, акад. РАН, д. м. н., проф.  
 Стручков Петр Владимирович, д. м. н., проф.  
 Стрюк Раиса Ивановна, д. м. н., проф.  
 Улитовский Сергей Борисович, д. м. н., проф.  
 Ушаков Рафаэль Васильевич, д. м. н., проф.  
 Шилова Маргарита Викторовна, д. м. н., проф.  
 Щербо Сергей Николаевич, д. б. н., проф.  
 Эмануэль Владимир Леонидович, д. м. н., проф.

Председатель редакционного совета журнала  
 «Медицинский алфавит» серии «Современная  
 лаборатория»: С. Н. Щербо

Руководитель отдела рекламы и маркетинга:  
 Т. Е. Чикмарева, medalfavit@bk.ru

Руководитель отдела продвижения,  
 распространения и выставочной деятельности  
 Б. Б. Будович, medalfavit\_pr@bk.ru

Редакция оставляет за собой право сокращения Редакция  
 оставляет за собой право сокращения и стилистической  
 правки текста без дополнительных согласований с авторами.  
 Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения  
 авторов опубликованных материалов. Редакция не несет  
 ответственности за последствия, связанные с неправильным  
 использованием информации.

Журнал зарегистрирован Министерством РФ по делам печати,  
 теле-, радиовещания и средств массовых коммуникаций.  
 Рег. номер ПИ № 77-11514 от 04.01.2002.

Уст. тираж 12000. Формат А4. Цена договорная.

При перепечатке ссылка на журнал «МА» обязательна. За  
 содержание рекламы ответственность несет рекламо-  
 датель. За достоверность сведений, изложенных в статьях,  
 ответственность несет автор.

Подписан в печать 30 июля 2018 года.

Наш индекс в каталоге «РОСПЕЧАТЬ»  
 36228 (комплект)



## Содержание

- 5 «Современные биотехнологии для науки и практики»  
 приуроченной к Международному дню «ДНК-2018»  
*Материалы V Международной научно-практической  
 конференции*
- 19 Core-антиген и РНК вируса гепатита С в пробах сыворотки  
 крови пациентов с антителами к Core-антигену вируса  
*А. А. Потапова, М. М. Шульгина, Т. А. Туполева,  
 Е. Н. Овчинникова, Т. Ю. Романова, М. А. Смердова,  
 М. И. Михайлов, В. С. Кичатова, К. К. Кюрегян*
- 25 Ассоциация полиморфизма BsmI-гена рецептора витамина D  
 (VDR) с воспалительными заболеваниями кишечника  
*Д. А. Кузнецова, А. С. Разумов, В. Л. Эмануэль, Г. В. Вавин,*
- 31 Количественное определение показателей состава  
 и свойств мочи методом «сухой химии» (принципы метода,  
 аналитические характеристики)  
*А. Н. Шибанов, О. А. Куриляк, А. В. Цыганова,  
 П. А. Стариков, И. М. Елькина*
- 37 Применение метода КФ-ПЦР для выявления анеуплоидии  
 по хромосомам 21, 18, 13, X и Y при амниоцентезе  
 у беременных разных групп риска  
*О. А. Тарасенко,*
- 41 Каким должен быть кровяной агар?  
*Б. Ф. Шуляк, С. Г. Марданлы, С. С. Марданлы, Я. В. Мишуткина*
- 46 Подписка

## Contents

- 5 *Materials of the V International Scientific and Practical Conference*
- 19 *Core-antigen and RNA of hepatitis C virus in sera samples of patients with  
 antibodies to virus Core-antigen*  
*A. A. Potapova, M. M. Shulgina, T. A. Tupoleva, E. N. Ovchinnikova,  
 T. Yu. Romanova, M. A. Smerdova, V. S. Kichatova, K. K. Kyuregyan,  
 M. I. Mikhaylov*
- 25 *Association of polymorphism BsmI of vitamin D receptor gene (VDR) with  
 inflammatory bowel diseases*  
*D. A. Kuznetsova, A. S. Razumov, V. L. Emanuel, G. V. Vavin*
- 31 *Quantitative determination of parameters of composition and properties  
 of urine by method of 'dry chemistry' (principles of method, analytical  
 characteristics)*  
*A. N. Shibbanov, O. A. Kurilyak, A. V. Tsyganova, P. A. Starikov, I. M. El'kina*
- 37 *Possibility of using the QF-PCR-method to detect aneuploidy on  
 chromosomes 21, 18, 13, X and Y in amniocentesis in pregnant women of  
 different risk groups*  
*O. A. Tarasenko*
- 41 *What should be blood agar?*  
*B. F. Shulyak, S. G. Mardarly, S. S. Mardarly, Ya. V. Mishytkina*
- 46 *Subscription*

С 2008 года журнал «Медицинский алфавит» включен в Научную электронную библиотеку  
 и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет Импакт-фактор.



Председатель редакционного совета  
журнала серии «Современная лаборатория» Щербо Сергей Николаевич

## Редакционная коллегия

**Вавилова Татьяна Владимировна**, д. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики и генетики ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Гильманов Александр Жанович**, д. м. н., проф., вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, зав. кафедрой биохимии и лабораторной диагностики ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет», г. Уфа

**Годков Михаил Андреевич**, д. м. н., врач высшей категории, рук. отдела лабораторной диагностики ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского», г. Москва

**Долгих Татьяна Ивановна**, д. м. н., проф., зав. центральной научно-исследовательской лабораторией и руководитель академического центра лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии, г. Омск

**Жуковский Александр Васильевич**, д. м. н., проф., кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова», г. Москва

**Косырев Александр Борисович**, к. м. н., доцент кафедры биохимии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», г. Москва, ген. директор ООО ТПО «Медиолаб», г. Москва

**Падюков Леонид Николаевич**, проф. отделения ревматологии медицинского отдела Каролинского института, г. Стокгольм (Швеция)

**Первухин Юрий Владиславович**, к. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет», г. Ставрополь

**Рысулы Мустафа Рысулович**, д. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики Казахского национального медицинского университета имени С. Д. Асфендиярова, президент Казахской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, г. Алматы (Казахстан)

**Терёхина Наталья Александровна**, д. м. н., проф., зав. кафедрой биохимии Пермской государственной медицинской академии им. акад. Е. А. Вагнера, г. Пермь

**Шипулин Герман Александрович**, к. м. н., рук. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

**Щербо Сергей Николаевич**, д. м. н., проф., вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова», г. Москва

**Эмануэль Владимир Леонидович**, д. м. н., проф., зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор научно-методического центра Минздрава России по молекулярной медицине на базе СПбГМУ им. И. П. Павлова, вице-президент Российской ассоциации медицинской лабораторной диагностики, гл. специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному федеральному округу, г. Санкт-Петербург

## Editorial Board

**Vavilova T. V.**, MD, DMSci, professor, North-Western State Medical University n. a. I. I. Mechnikov, St. Petersburg

**Gilmanov A. Zh.**, MD, DMSci, professor, Bashkir State Medical University, Ufa

**Godkov M. A.**, MD, DMSci, Research Institute of Emergency Medicine n. a. N. V. Sklifosovsky, Moscow

**Dolgikh T. I.**, MD, DMSci, professor, Omsk State Medical Academy, Omsk

**Zhukotsky A. V.**, MD, DMSci, professor, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

**Kosyrev A. B.**, PhD, associate professor, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Mediolab, Moscow

**Padyukov L. N.**, professor of Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

**Pervushin Y. N.**, PhD, professor, Stavropol State Medical University, Stavropol

**Rysuly M. R.**, MD, DMSci, professor, Kazakh National Medical University, president of Kazakh Medical Laboratory Diagnostics Association, Almaty, Kazakhstan

**Teryokhina N. A.**, MD, DMSci, professor, Perm State Medical Academy n. a. acad. E. A. Wagner, Perm

**Shipulin G. A.**, PhD, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

**Shcherbo S. N.**, MD, DMSci, professor, Russian National Research Medical University n. a. N. I. Pirogov, Moscow

**Emanuel V. L.**, MD, DMSci, professor, First State Medical University of St. Petersburg n. a. I. P. Pavlov, St. Petersburg

## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ НАШЕГО ИЗДАНИЯ!

Важная информация о форме цитирования материалов, опубликованных в журналах серии «Медицинский алфавит»

В связи с требованием РИНЦ об унификации цитирования ссылки на материалы журнала следует оформлять в строгом соответствии с указанным образцом:

Фамилия И. О. Название статьи. // Медицинский алфавит. — Год. — Том X, № X. — С. XX–XX.

Например: *Имельбаева Э. А., Гильманов А. Ж. Особенности эритроцитарных антигенов // Медицинский алфавит. — 2014. — Том 2 («Современная лаборатория»), № 12. — С. 14–18.*

Вопросы об оформлении ссылок направляйте, пожалуйста, по адресу [medalfavit@mail.ru](mailto:medalfavit@mail.ru).

# Материалы V Международной научно-практической конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» приуроченной к Международному дню «ДНК-2018»

## Разработка ПЦР-теста для выявления мутаций в гене SMARCA4 при мелкоклеточной карциноме яичника гиперкальциемического типа

Ш. Р. Абдуллаева, Н. В. Калашникова, Т. Н. Соколова,  
В. И. Тюрин (научный руководитель к.м.н., доц.  
Суспицын Е. Н.)

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Кафедра общей и молекулярной медицинской генетики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург  
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Мелкоклеточная карцинома яичника гиперкальциемического типа (МКЯГТ) — это редко встречающаяся агрессивная опухоль, частота которой составляет менее 1% от всех новообразований яичника. МКЯГТ преимущественно развивается у молодых женщин (средний возраст 24 года), однако описаны семейные случаи с манифестацией в детском возрасте. До недавнего времени верификация диагноза МКЯГТ являлась сложной задачей в связи с отсутствием специфических диагностических маркеров. Таким маркером является инактивация белка BRG1, происходящая в результате наследственных или соматических мутаций в гене *SMARCA4*.

**Цель.** Разработать дизайн ПЦР теста, совмещенного с анализом кривых плавления в высоком разрешении (high resolution melting curve analysis, HRM) для выявления мутаций в гене *SMARCA4*.

**Материалы и методы.** Последовательности праймеров для разрабатываемого теста подбирались с помощью геномного браузера Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) и программы для анализа ДНК-последовательности Gene Runner ([genefrunner.net](http://genefrunner.net)).

Материалом для проверки работоспособности теста послужила ДНК, выделенная из 13 архивных патоморфологических образцов опухолей яичника (1 МКЯГТ). В связи с большим размером гена было принято решение протестировать экзоны 8, 11, 14, 17, 18, 20, 25, 26, несущие часто встречаемые мутации. Образцы, демонстрирующие кривые плавления, отличающиеся от кривых плавления дикого типа, были подвергнуты секвенированию по Сэнгеру для верификации возможных мутаций.

**Результаты.** В результате тестирования были выявлены следующие подозрительные кривые плавления: в 14 экзоне — 1, 9, 11, 13 образцах; в 26 экзоне — 3, 9 образцах. Однако выполненное секвенирование исключило патологические мутации в вышеперечисленных образцах.

**Выводы.** Разработанный нами ПЦР-тест позволяет анализировать последовательность гена *SMARCA4*. Мы считаем, что необходимо продолжить работу и протестировать образцы на предмет более редких мутаций.

## Корреляция низкомолекулярных белков мочи и морфологических изменений компартментов почки при иммунных гломерулопатиях

А. О. Анпилова, И. М. Зубина, Е. О. Богданова, О. В. Галкина

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Количественное определение мочевого экскреции низкомолекулярных белков позволит проводить дифференциальную диагностику локальных повреждений нефрона.

**Цель работы.** Исследование взаимосвязи мочевого экскреции низкомолекулярных белков  $\alpha 1$ -микроглобулина ( $\alpha 1$ -МГ) и  $\beta 2$ -микроглобулина ( $\beta 2$ -МГ) с выраженностью морфологических изменений компартментов почки.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 97 пациентов с первичными иммунными гломерулопатиями: мембранозной нефропатией (n = 22), болезнью минимальных изменений (n = 13), фокально-сегментарным гломерулосклерозом (n = 30), IgA-нефропатией (n = 32), подтвержденными морфологически. Концентрации  $\alpha 1$ -МГ и  $\beta 2$ -МГ были измерены у 20 здоровых добровольцев. Уровни  $\alpha 1$ -МГ,  $\beta 2$ -МГ и креатинина (Cr) в моче измеряли на автоматическом анализаторе CA-90 (Furuno, Япония) с использованием реактивов Arteck (Бельгия). Стандартизацию концентрации  $\alpha 1$ -МГ и  $\beta 2$ -МГ в разовой порции мочи проводили по Cr.

**Основные результаты.** У всех пациентов экскреция низкомолекулярных белков была достоверно выше, чем в контрольной группе (табл. 1).

Таблица 1  
Концентрации белков мочи в обследованных группах [m (25–75%)]

Группы	$\alpha 1$ -МГ/Cr, мг/ммоль	$\beta 2$ -МГ/Cr, мг/ммоль
Контрольная	0,38 (0,26–0,53) <sup>1</sup>	0,002 (0,00–0,004) <sup>1</sup>
Мембранозная нефропатия	0,77 (0,43–1,27)	0,014 (0,00–0,062)
Болезнь минимальных изменений	1,00 (0,68–23,8)	0,033 (0,00–0,24)
Фокально-сегментарный гломерулосклероз	0,80 (0,55–1,45)	0,049 (0,005–0,61)
IgA-нефропатия	0,54 (0,19–1,00) <sup>2</sup>	0,013 (0,00–0,104) <sup>3</sup>

Примечание. <sup>1</sup>p < 0,001 при сравнении с группами пациентов; <sup>2</sup>p = 0,045 при сравнении с ФСГС; <sup>3</sup>p = 0,023 при сравнении с ФСГС (указаны значения p при статистически значимых межгрупповых различиях).

Экскреция  $\beta 2$ -МГ и  $\alpha 1$ -МГ коррелировала с глобальным склерозом клубочков ( $r = 0,28$ ;  $p = 0,010$  и  $r = 0,21$ ;  $p = 0,049$  соответственно). Экскреция  $\beta 2$ -МГ была значительно выше в подгруппах с тубулоинтерстициальным повреждением: тубулярной атрофией, интерстициальным фиброзом, эластофиброзом артерий, периваскулярным склерозом ( $p < 0,020$ ).

**Заключение.** Исходя из результатов исследования,  $\beta 2$ -МГ в моче может быть рекомендован в качестве интегрального биомаркера повреждения клубочков, тубулоинтерстиция и сосудов.

## Генетические факторы подверженности микобактериальной инфекции

А. А. Бабовская<sup>2</sup>, И. Ж. Жалсанова<sup>1</sup>, Е. Ю. Брагина<sup>1</sup>, Н. П. Бабушкина<sup>1</sup>, О. В. Колоколова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, г. Томск

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск

Туберкулез (ТБ) — широко распространенное хроническое инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis*. Многочисленные семейные и близнецовые исследования указывают на существенный вклад наследственных факторов в патогенез этого социально значимого заболевания.

Целью данного исследования является поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов *IL8* (rs4073), *IL10* (rs1800872), *TNF* (rs2239704), *IL1B* (rs16944), *IL6* (rs2069832), *IP10* (rs4386624, rs56061981), *SLC11A1* (rs2276631), *CD4* (rs7296859, rs7956804) с развитием туберкулезной инфекции.

Генотипирование выполнено в группах больных туберкулезом ( $n = 517$ ) и здоровых индивидов ( $n = 406$ ) с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа и ПЦР в реальном времени. Для статистического анализа использовали критерий  $\chi^2$ , различия считали значимыми при  $p$ -значении  $\leq 0,05$ .

В ходе исследования установлена ассоциация полиморфизма гена *IL10* (rs1800872) с развитием ТБ. В группе пациентов с ТБ частота аллеля А составила 23,9%, что существенно выше в сравнении со здоровыми индивидами (18,3%) ( $p = 0,0075$ ). Аллель С гена *TNF* (rs2239704) преобладал у пациентов с ТБ (51,3%) по сравнению со здоровыми индивидами (43,3%) ( $p = 0,0033$ ). Впервые выявлена ассоциация полиморфного варианта гена *IP10* (rs56061981) с развитием ТБ: аллель А встречался чаще в группе пациентов с ТБ (7,8%) по сравнению с контрольной выборкой (3,0%) ( $p = 0,0023$ ). Аллель G полиморфного варианта гена *IP10* (rs4386624) преобладал в группе пациентов с ТБ (47,6%) по сравнению со здоровыми (41,2%) ( $p = 0,023$ ).

Таким образом, исследование полиморфизма генов *IP10*, *IL10* и *TNF* с развитием ТБ является перспективным направлением для уточнения генетических механизмов реализации иммунного ответа против микобактериальной инфекции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15–04–05852.

## Ассоциации генов систем репарации ДНК с бронхиальной астмой

Н. П. Бабушкина, А. Е. Постригань, А. Н. Кучер

НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр» РАН, г. Томск

Бронхиальная астма (БА) — клинически гетерогенное многофакторное заболевание с существенной генетической компонентой, которая не раскрыта в полном объеме.

Цель исследования заключалась в поиске ассоциаций с бронхиальной астмой полиморфных вариантов в генах белков различных репарационных систем ДНК, продукты которых вовлечены (в том числе) в развитии специфического иммунного ответа, что позволяет предполагать их вовлеченность в формировании атопии.

Проанализированы девять SNP: rs560191 (*TP53BP1*), rs1805800 и rs709816 (*NBS1*), rs473297 (*MRE11A*), rs1189037 и rs1801516 (*ATM*), rs1799977 (*MLH1*), rs1805321 (*PMS2*), rs25487 (*XRCC1*). Исследованы группа больных БА и популяционная выборка г. Томска (134 и 328 человек соответственно; более 95% обследованных являются русскими). Генотипирование проводили с помощью SNaPshot-анализа на платформе ABI Genetic Analyzer 3730 на базе центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ РАН. Статистическая обработка данных проведена с использованием общепринятых методов анализа ( $\chi^2$ , OR с 95% CI); статистически значимым считались различия при  $p < 0,05$ .

Ассоциации с БА установлены для двух SNP. Статистически значимые различия зарегистрированы по частотам аллелей и генотипов для rs1189037 в гене *ATM* ( $\chi^2 = 6,68$  [ $p = 0,010$ ] и  $\chi^2 = 6,81$  [ $p = 0,033$ ] соответственно) и rs1799977 в гене *MLH1* ( $\chi^2 = 7,60$  [ $p = 0,006$ ] и  $\chi^2 = 9,11$  [ $p = 0,011$ ] соответственно). По rs1189037 к развитию БА предрасполагают аллель G (OR = 1,48 [CI: 1,10–1,99],  $\chi^2 = 6,68$ ;  $p = 0,01$ ) и генотип GG (OR = 1,67 [CI: 1,01–2,76],  $\chi^2 = 4,03$ ;  $p = 0,045$ ), генотип AA является протективным (OR = 0,60 [CI: 0,37–0,98],  $\chi^2 = 4,17$ ;  $p = 0,041$ ). По rs1799977 рисковыми являются аллель А (OR = 1,60 [CI: 1,14–2,26],  $\chi^2 = 7,57$ ;  $p = 0,006$ ) и генотип AA (OR = 1,68 [CI: 1,09–2,59],  $\chi^2 = 5,64$ ;  $p = 0,018$ ), протективным — генотип GG (OR = 0,34 [CI: 0,12–0,92],  $\chi^2 = 4,50$ ;  $p = 0,034$ ).

Таким образом, впервые показана ассоциированность полиморфных вариантов генов репарационных систем ДНК (*ATM* и *MLH1*) с бронхиальной астмой. Это свидетельствует о необходимости привлечения генов данного функционального класса в исследования генетической компоненты многофакторных болезней.

## Влияние рациона с высоким содержанием хлорида натрия на сердечно-сосудистую систему и почки спонтанно гипертензивных крыс

О. Н. Береснева<sup>1</sup> М. М., Парастаева<sup>1</sup>, Г. Т. Иванова<sup>2</sup>,  
М. И. Зарайский<sup>1</sup>, И. Г. Каюков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт физиологии имени И. П. Павлова» Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

**Цель исследования.** Изучение влияния рационов питания с высоким или нормальным содержанием поваренной соли на процессы ремоделирования миокарда и уровень экспрессии нуклеарного фактора транскрипции  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) в миокарде и почках спонтанно гипертензивных крыс (SHR).

**Материалы и методы.** Исследованы крысы линии SHR, получавшие два месяца рацион с нормальным (0,34%;  $n = 24$ , контрольная группа) или высоким содержанием NaCl (8,0%;  $n = 25$ ). В конце наблюдения у бодрствующих животных измеряли артериальное давление (АД) манжеточным методом. После выведения из эксперимента у крыс рассчитывали индексы массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ), левой и правой почек (ИМЛП, ИМПП соответственно), выполняли светооптическое исследование миокарда, включая количественную морфометрию. У части лабораторных животных в ткани сердца и левой почки исследовали относительный уровень экспрессии гена нуклеарного фактора транскрипции  $\kappa\text{B}$ . Вычисление относительного уровня экспрессии гена NF $\kappa\text{B}$  проводили по полуколичественному протоколу методом 2- $\Delta\Delta\text{Pct}$ .

**Результаты.** У крыс SHR, получавших рацион с 8-процентным содержанием NaCl, уровень АД ( $190 \pm 10$  мм рт. ст.) существенно не изменялся по сравнению с контролем ( $190 \pm 10$  мм рт. ст.). Однако, несмотря на отсутствие повышения АД, на фоне высокосолевого рациона в нашей работе выявлены отчетливые изменения сердечно-сосудистой системы крыс, увеличение ИММЛЖ, ИМЛП, ИМПП. В миокарде крыс данной группы развивались изменения, выражающиеся в гипертрофии кардиомиоцитов (контроль: площадь ядра —  $36,14 \pm 4,67$  мкм<sup>2</sup>, площадь кардиомиоцитов —  $19011,13 \pm 571,8$  мкм<sup>2</sup>, высокосолевого рацион:  $43,55 \pm 17,39$  мкм<sup>2</sup>,  $21799,31 \pm 579,89$  мкм<sup>2</sup> соответственно; все  $P < 0,001$ ), отмечались значительный периваскулярный фиброз, увеличение толщины стенки артерий (контроль —  $13,51 \pm 8,68$ , высокосолевого рацион —  $15,71 \pm 6,28$  мкм,  $P < 0,001$ ), вакуолизация гладкомышечных клеток.

При этом уровень экспрессии гена нуклеарного фактора транскрипции  $\kappa\text{B}$  в ткани миокарда животных, получавших корм с высоким содержанием NaCl, оказался в 33 раза, а в ткани почек — в 12 раз выше, чем у крыс, получавших рацион с нормальным содержанием соли.

Наши данные позволяют полагать, что активация этого транскрипционного фактора может происходить под непосредственным влиянием значительного потребления хлорида натрия, что, возможно, сопровождается нарастанием экспрессии NF $\kappa\text{B}$ -ассоциированных пролиферативных,

провоспалительных и профибротических цитокинов. Полученные результаты дают основания предполагать, что потребление крысами линии SHR рациона с высоким содержанием NaCl приводит к своеобразному профилю ремоделирования миокарда, который не определяется исключительно нарастанием АД. Возможно, ремоделированию подвергаются и мелкие сосуды миокарда, что может в дальнейшем усугублять поражение сердца.

**Выводы.** Высокое содержание соли в рационе обязательно сопровождается ростом АД, но вызывает ремоделирование миокарда, по-видимому, за счет прямого негемодинамического воздействия. Негативное воздействие на сердечно-сосудистую систему высокосолевого рациона частично реализуется через NF $\kappa\text{B}$ -ассоциированные сигнальные пути. Кроме того, диета с высоким содержанием NaCl вызывает активацию NF $\kappa\text{B}$  в почках.

## Горизонтальный перенос генов устойчивости к $\beta$ -лактамам антибиотикам

М. Вишнепольская, студентка II курса медицинского факультета

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Сохранение в популяции бактерий плазмид с множественной лекарственной устойчивостью и обмен генетической информацией путем горизонтального переноса генов приводит к появлению патогенов человека, которые больше не поддаются антибиотикотерапии (Davies and Davies, 2010). Считается, что способностью к обмену генами устойчивости к антибиотикам обладают бактерии, входящие в состав микробиоты человека, в частности, бактериальное сообщество желудочно-кишечного тракта (Liu et al., 2012). На сегодняшний день наши знания об экологии, скорости и особенностях передачи этих плазмид в микробиоте кишечника остаются ограниченными.

**Целью** данного исследования являлось установление возможности передачи плазмиды устойчивости к  $\beta$ -лактамам антибиотикам при совместном культивировании резистентных условно патогенных микроорганизмов (УПМ) и лактобактерий.

**Материалы и методы.** Культуры *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* и *Lactobacillus plantarum* выращивали на среде ГРМ (НИЦФ, Россия) и на среде МРС (HiMedia, Индия) в присутствии цедекса («С. И. Ф. С.п.А.», Италия) (32 мкг/мл) и ампициллина (ОАО «Мосхимфармпрепараты им. Н. А. Семашко», Россия) (32 мкг/мл). Наличие генов устойчивости к антибиотикам в клетках микроорганизмов подтвердили методом ПЦР Real-time на амплификаторе «ДТ-Лайт» («ДНК-Технология», Россия) выявив ген *bla*<sub>TEM</sub> (праймеры F: 5'-АТААААТТСТТГААГАСГААА-3'; R: 5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3', «Бигль», Россия).

**Результаты.** Биопленки резистентных к цедексу и ампициллину штаммов *S. aureus* и *E. coli* инкубировали совместно с биопленкой *L. plantarum* на плотной питательной среде в тесном контакте в течение 48 часов при температуре

37 °С. С области на границе соприкосновения биопленок отбирали клетки лактобактерий и пересеивали на среды с цедексом и ампициллином. Выделены три штамма *L. plantarum*, устойчивых к цедексу (*ced<sup>R</sup>*) и два штамма, устойчивых к ампициллину (*amp<sup>R</sup>*). ПЦР-анализ выделенных штаммов лактобактерий показал, что у трех из выделенных штаммов (*1amp<sup>R</sup>* и *2ced<sup>R</sup>*) обнаружены гены *bla<sub>TEM</sub>*.

**Выводы.** Подтверждена вероятность передачи генетического материала, отвечающего за устойчивость к β-лактамам антибиотикам, между Гр(+) штаммами разных родов (*Staphylococcus* и *Lactobacillus*) и Гр(-) (*Escherichia*) и Гр(+) (*Lactobacillus*) родами микроорганизмов. Полученные данные свидетельствуют о необходимости более тщательного изучения механизма приобретения антибиотикорезистентности между УПМ и представителями нормальной микробиоты с целью совершенствования принципов рациональной антибиотикотерапии.

## Клиническое значение ПЦР-идентификации экспрессии генов группы *als* при вульвовагинальном кандидозе

**А. С. Гаффарова**, студентка кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинской академии имени С. И. Георгиевского

ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского», г. Симферополь, Россия

Вульвовагинальный кандидоз (ВВК) занимает второе место в структуре воспалительных заболеваний влагалища и вульвы и встречается у 75 % женщин. В 80–90 % случаев ВВК вызывает *Candida albicans*, в связи с чем необходима идентификация микроорганизма с применением полимеразной цепной реакции.

**Цель исследования.** Изучить особенности экспрессии генов группы ALS с применением ПЦР при ВВК для идентификации *C. albicans* и прогнозирования фармакорезистентности к флуконазолу.

**Материалы и методы.** Проведен анализ современной теоретической информации, посвященной генам группы ALS. *C. albicans* и методам их ПЦР-идентификации.

**Результаты.** Резистентность *C. albicans* к флуконазолу была выявлена для 83 % изолятов *C. albicans* при одновременной экспрессии генов *ALS 1* и *ALS 3*, а также при экспрессии одного из исследуемых генов у 79,5 % грибов, что связано с участием ALS в формировании биопленок. При отсутствии идентификации генов группы ALS в 5,5 % случаев грибы были высокочувствительны к флуконазолу. У 9,4 % грибов *C. albicans* фармакорезистентность была ассоциирована с другими причинами и гены *ALS 1* и не экспрессировались в исследуемых образцах. Гену *Tor1* принадлежит ведущая роль в регуляции экспрессии генов, ассоциированных с вирулентностью условного патогена, таких как *ALS 1* и *ALS 3*, и других адгезинов. Кроме того, немаловажное значение имеют регуляторные комплексы генов *Tec1*, *Bcr1*, *Efg1*, *Nrg1*, *Tup1*, *Med31*, *Med20* и *Srb9/Med13*, обеспечивающих активацию адгезинов и генов группы ALS.

**Заключение.** ПЦР-идентификация одновременной или изолированной экспрессии генов группы ALS у штам-

мов *C. albicans* в связи с высокой частотой обнаружения резистентности микроорганизма к антимикотическому препарату флуконазолу, обусловленной формированием биопленок в результате повышенной экспрессии генов ALS, может иметь важное клиническое значение для определения наиболее эффективной этиотропной терапии.

## ДНК-диагностика патогенных бактерий *Yersinia ruckeri* и *Flavobacterium psychrophilum* у рыб

**Н. Е. Гриневич<sup>1</sup>, Р. В. Облап<sup>2</sup>, Н. Б. Новак<sup>2</sup>, Т. Н. Дымань<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Белоцерковский национальный аграрный университет, г. Белая Церковь, Украина

<sup>2</sup>ГП «Укрметрестандарт», г. Киев, Украина

В процессе разведения рыбы неизбежно приходится контактировать с паразитарными, бактериальными и другими видами инфекций, которые негативно сказываются на результатах хозяйственной деятельности, приводят к значительным экономическим потерям, а также представляют угрозу здоровью человека. К таким патогенам можно отнести *Yersinia ruckeri* и *Flavobacterium psychrophilum*, вызывающие кишечный иерсиниоз и бактериальную болезнь «холодной воды».

Традиционные бактериально-биохимические методы диагностики этих патогенов трудоемки, требуют достаточного количества времени и, самое главное, не позволяют выявлять возбудителя непосредственно в патологическом материале. Альтернативой им являются методы ДНК-диагностики, в частности, ПЦР-анализ, который хорошо себя зарекомендовал благодаря высокой чувствительности, специфичности и возможности получения результата в самое короткое время.

В связи с этим целью настоящей работы была разработка двух диагностикумов на основе технологии *TaqMan* метода ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR) для выявления и идентификации бактерий *Yersinia ruckeri* и *Flavobacterium psychrophilum*. Материалом для выделения бактериальной ДНК служили типовые штаммы, а также образцы клинически здоровой и больной радужной форели *Onchorhynchus mykiss*, в которых было подтверждено наличие патогена микробиологическими методами анализа. ДНК экстрагировали методом температурного лизиса с последующей доочисткой на Silica-Spin — колонках. Подбор и оптимизацию условий амплификации проводили с помощью прибора CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве ДНК-мишеней были выбраны последовательности гена *glnA* (глутаминсинтетаза; GenBank AY 333067) *Yersinia ruckeri* и гена *GyrB* (ДНК-гираза, субъединица В; GenBank KT809647.1) *Flavobacterium psychrophilum*. В качестве эндогенного контроля прохождения ПЦР служила последовательность бактериального гена *16S* рДНК. Разработанные тест-системы были выполнены в формате мультиплекса.

Полученные результаты говорят о высокой чувствительности и специфичности разработанных диагностикумов и могут быть предложены к использованию в лабораториях рыбоводческих хозяйств и других заинтересованных служб.

## Стратификация риска внезапной сердечной смерти и уровень циркулирующей микроРНК-21 у молодых пациентов с симптомным течением гипертрофической кардиомиопатии

В. Г. Давыдова, Т. Г. Бежанишвили, А. А. Стрельцова, А. А. Полякова, А. А. Костарева, М. И. Зарайский, А. Н. Куликов, А. Я. Гудкова

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Ежегодная смертность пациентов с гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП) составляет 1–2%, одной из основных причин является ВСС.

**Цель.** Изучить риск ВСС и уровень циркулирующей микроРНК-21 у молодых пациентов с симптомным течением ГКМП.

**Материалы и методы.** В исследование включены 49 пациентов с ГКМП в возрасте от 19 до 86 лет ( $48,32 \pm 2,59$  года). При анализе выделены три группы в зависимости от возраста и клинического течения ГКМП. Стратификация пятилетнего риска ВСС проведена согласно калькулятору HCM Risk-SCD. Тотальная РНК выделялась из плазмы пациентов. Изучение уровней экспрессии генов микроРНК проводилось методом обратной транскрипции с использованием технологии StemLoop с последующим проведением ПЦР в режиме реального времени с помощью микроРНК-специфических праймеров и набора реагентов фирмы «Синтол» на амплификаторе DTLite. Вычисление относительного уровня экспрессии гена проводили в соответствии со стандартной процедурой 2- $\Delta\Delta Ct$ .

**Результаты.** В группе симптомного течения до 44 лет ( $n = 15$ ) риск ВСС составил от 2,44 до 20,71% ( $7,37 \pm 1,34$ ) и был выше ( $p = 0,011$ ) чем в группе бессимптомного течения до 44 лет ( $n = 6$ ), в которой риск варьировался от 1,01 до 4,77% ( $2,52 \pm 0,66$ ) и выше ( $p = 0,001$ ), чем в группе симптомного течения у пациентов старше 44 лет ( $n = 28$ ), в которой риск варьировался от 1,02 до 7,59% ( $2,96 \pm 0,33$ ). В группе симптомного течения до 44 лет зарегистрирован один случай ВСС в возрасте 24 лет при расчетном риске 13,07%, в четырех случаях в рамках профилактики ВСС имплантирован кардиовертер-дефибриллятор (ИКД), еще четыре пациента имеют показания к ИКД. Уровень микроРНК-21 в группе симптомного течения до 44 лет варьировался от 2,46 до 337,79 ( $55,02 \pm 22,45$ ) и был выше ( $p = 0,002$ ), чем в группе бессимптомного течения до 44 лет, в которой уровень микроРНК-21 составил от 1,62 до 5,28 ( $3,12 \pm 0,8$ ) и выше ( $p = 0,002$ ), чем в группе симптомного течения старше 44 лет, в которой уровень микроРНК-21 варьировался от 1,07 до 119,43 ( $10,86 \pm 4,34$ ).

**Выводы.** Повышенный уровень циркулирующей микроРНК-21 обнаружен у молодых пациентов с симптомным течением ГКМП и высоким расчетным риском ВСС.

## Разработка и получение активного компонента комбинированной ДНК вакцины против вирусов герпеса I–VIII типов

О. А. Добровольская, Е. Г. Богомолова, Н. Н. Колмаков, Е. А. Федорова, И. В. Духовлинов

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Герпес — одна из самых широко распространенных вирусных инфекций человека. На данный момент известно, что 90% населения Земли являются носителями одного или нескольких типов вируса герпеса. Используемые в данный момент методы вакцинации подразумевают введение в организм живых или ослабленных форм вируса, что снижает риск развития тяжелой формы заболевания. Однако подобные методы имеют ряд побочных эффектов. Более безопасной стратегией является использование рекомбинантных вакцин.

**Цель и задачи.** Целью данного исследования является разработка ДНК-вакцины против вирусов герпеса I–VIII типов. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: создание штамма-продуцента плазмидной ДНК, разработка технологии ее выделения и получение фармацевтической субстанции на ее основе.

**Материалы и методы.** Синтез и клонирование генов, кодирующих плазмидную ДНК, осуществляли методом ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов. Для получения штамма-продуцента плазмидной ДНК использовали клетки *E. coli* штамма DH10B/R. Очистку плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса с последующим контролем горизонтальным электрофорезом в агарозном геле.

**Основные результаты.** Нами был получен штамм-продуцент плазмидной ДНК *E. coli* DH10B/R pDNA-habg-1–8, и оптимизированы условия его культивирования. Была разработана технология выделения и очистки плазмидной ДНК. Выход составил 21 мг плазмидной ДНК из 1 л культуральной жидкости. В результате очистки был получен препарат плазмидной ДНК с чистотой 98,6%.

**Заключение.** Получен препарат плазмидной ДНК pDNA-habg-1–8, включающий в себя основные эпитопы высоко иммуногенных вирусных белков. Подобранные вирусные белки являются постоянными компонентами оболочек вирусных частиц всех патогенных для человека типов вируса герпеса. Таким образом, вакцина будет являться поливалентной и обеспечивать защиту от широкого спектра типов вируса герпеса. На данный момент планируется изучение иммуногенных и протективных свойств полученного препарата.

## Роль конформационных изменений гена *limk1* в индукции двухцепочечных разрывов у *Drosophila melanogaster*

А. А. Ермилова<sup>1</sup>, Е. А. Никитина<sup>1,2</sup>, А. В. Медведева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет имени А. И. Герцена», г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт физиологии имени И. П. Павлова» Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

В последнее время получены данные, свидетельствующие о том, что, кроме последовательности ДНК в делеционно-дупликационных синдромах, большое значение имеет 3D-архитектура хроматина ядра.

LIMK1 — ключевой фермент ремоделирования актина. Баланс мономерного и полимерного актина является триггером целого комплекса внутриклеточных процессов, включая регуляцию транскрипции и ремоделирование хроматина. Изучение влияния LIMK1 на конформационную организацию ядра позволит лучше понимать механизмы возникновения нейропсихиатрических расстройств.

В качестве материала использовали мутантную линию *agn<sup>ts3</sup>*. Для мутанта характерно наличие инсерций 28 п. н. в интрон 1 и мобильного S-элемента семейства Tc1/*mariner* на расстоянии 460 п. н. от 3'UTR *limk1* (11AB X хромосомы). *agn<sup>ts3</sup>* является удобной для изучения моделью, поскольку LIMK1 влияет на компоненты каскада ремоделирования актина, а также изменяет частоту эктопического спаривания определенных районов интеркалярного гетерохроматина, модифицируя конформационную организацию ядра.

С использованием ана-телофазного метода, был произведен анализ перестроек, включающих двухпочечные разрывы (ДЦР), в нервных ганглиях личинок дрозофилы *Canton-S* (линия дикого типа) и *agn<sup>ts3</sup>*. Было выявлено:

- 1) достоверное увеличение частоты перестроек у самок *agn<sup>ts3</sup>*; возможно, это связано с тем, что у *agn<sup>ts3</sup>* обнаружено наличие множества новых сайтов, способствующих альтернативной конформации ДНК. Таким образом, структура гена для LIMK1 *agn<sup>ts3</sup>* оказалась предрасположенной для формирования крестообразных структур, в центре которых формируются ДЦР, что приводит к формированию мостов и фрагментов;
- 2) достоверное увеличение частоты мостов у самцов *agn<sup>ts3</sup>*. По-видимому, наличие X-хромосомы, содержащей вставки, без гомолога (XY) способствует как ДЦР, так и контакту с другими хромосомами, что увеличивает количество транслокаций.

Таким образом, локус *limk1* — важный фактор организации архитектуры ядра.

## Ген *p53*, отвечающий за апоптоз и пролиферацию клеток эукариот

Г. П. Косякова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ВНИИ генетики и разведения животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», г. Санкт-Петербург.

Ген *P53* имеет несколько кодонов: 47, 72. Обычно у пациентов определяли кодон 72 полиморфизма гена *p-53*. Для идентификации полиморфизма в кодоне 72 гена *p53* мы использовали аллелеспецифическую ПЦР-реакцию и два набора праймеров: один для амплификации аллеля Arg и другой для усиления Pro-аллеля, как описано в разных источниках. Определяли кодон 47 полиморфизма *p53*. Для идентификации полиморфизма на кодоне 47 гена *p53* мы использовали анализ ПЦР-RFLP

с праймерами (5'  $\phi$  CACCCATCTACAGTCCCCC  $\phi$  / 5'  $\phi$  ACCGTAGCTGCCCTGGTAG3  $\phi$ ), который усилил фрагмент в 241 паре оснований. ПЦР проводили в 25 объемах смеси, содержащей 100 нг ДНК, 10 мкл каждого праймера, 10 mM Трис-НСl (рН 8,0), 0,1 mM каждого динуклеотидтрифосфата, 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> и 0,5 U Taq ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили в течение 35 циклов при 94 °С в течение 30 с температурой отжига 60,5 °С в течение 50 с и 72 °С для 1 мин. с начальной стадией денатурации 94 °С в течение 5 мин. и конечный шаг расширения 72 °С в течение 10 мин. с использованием «MJ термоциклер ПЦР РТС-200». Продукты ПЦР были расщеплены *bcnI* (CauII) и проанализированы на 3,0-процентном агарозном геле. Шесть выборок из каждого анализа были непосредственно секвенированы и подтверждены как варианты, предсказанные ПЦР. Положительный и отрицательные контрольные образцы были включены во все ПЦР и RFLP запускались для обнаружения возможного загрязнения, загрузки геля и несоответствия ввода. Статистический анализ проводился с использованием SAS (статистический) системы анализа, версия 8.1, (SAS Institute, США, 1999–2000). Тест Kruskal-Wallis был использован для сравнения возраста между различными группами. Все испытания проводились на P  $\frac{1}{4}$  0,05 уровня значимости.

**Результаты.** Пациенты и группы контроля были статистически похожи в отношении лейкоза (11 мужчин и 7 женщин против 16 мужчин и 9 женщин, возраст 42,76 ± 12,86 против 38,87 ± 14,85 года). Демография и характеристики образа жизни, включая потребление алкоголя, курение сигарет, диетические привычки, образование и физические нагрузки, УФ-излучение и возможное воздействие химических веществ.

## Особенности патогенеза неврологических проявлений у пациентов с конформационными заболеваниями

В. В. Никитина

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Конформационные болезни — группа дегенеративных заболеваний преимущественно центральной нервной системы, в основе которых лежит нарушение трехмерной пространственной укладки белковых молекул, что сопровождается изменением конформации белков, образованием в пораженных клетках нерастворимых белковых агрегатов в виде внутриклеточных включений. В конечном итоге запускает механизм гибели этих клеток. Стабильная конформация белка поддерживается балансом слабых сил между боковыми радикалами аминокислот. Патогенетический механизм конформационных болезней связан с конформационными изменениями физико-химических свойств ряда нейрональных и мышечных белков у больных с дегенеративными заболеваниями (Иллариошкин С. Н., 2003). Патогенетический механизм этих болезней объясняется тем, что мутантный белок меняет свою конформацию таким образом, что у него появляется способность к преципитации. Достаточно сказать, что конформационные нарушения

многих белков являются характерной чертой естественного процесса старения. Термином «нейродегенеративные заболевания» определяют большую группу заболеваний преимущественно позднего возраста, для которых характерна медленно прогрессирующая гибель определенных групп нервных клеток и одновременно постепенно нарастающая атрофия соответствующих отделов головного мозга. За последние несколько десятилетий углубились знания о субклеточных структурах, их роли в нормальном метаболизме и последствиях их дисфункции (Никитина В. В. и соавт., 2013; Никитина В. В. и соавт., 2014; Никитина В. В. и соавт., 2015; Никитина В. В., 2016; Nikitina V. V., 2016).

**Цель исследования.** Улучшить диагностику, терапию пациентов с конформационными заболеваниями.

**Материалы и методы.** Нами был проведен анализ результатов исследования 48 пациентов с конформационными заболеваниями. Диагнозы заболеваний всех пациентов были верифицированы клинически и с помощью методов нейровизуализации: МРТ и (или) КТ ГМ в ангиорежиме. Дополнительно выполнялись нейропсихологическое тестирование, УЗДГ БЦА, ТКДГ, ЭЭГ, генетические, биохимические исследования.

**Заключение.** У исследованных пациентов с конформационными заболеваниями результаты корреляционного анализа биохимических показателей плазмы крови подтверждают, что проявления дисфибриногенемии, активация уровня окислительного стресса играют наибольшее значение в патогенезе сосудистых расстройств.

## Детекция гена колибактина у штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных и детей грудного возраста

И. В. Николаева<sup>1</sup>, Д. Р. Семенова<sup>1</sup>, С. В. Фиалкина<sup>2</sup>, И. Р. Валиулина<sup>3</sup>, Г. С. Шайхиева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Казань

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва

<sup>3</sup>ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Татарстана, г. Казань.

*Klebsiella pneumoniae* является возбудителем широкого спектра заболеваний: от кишечной инфекции до менингита, что обусловлено наличием у бактерии различных факторов патогенности. Колибактин (*clbB*) — фактор патогенности *E. Coli*, *Kl. pneumoniae* и других энтеробактерий, способный индуцировать поломки ДНК в эукариотических клетках, нарушать митотический цикл и вызывать неконтролируемое размножение клеток. Наличие *clbB* ассоциируется с высокой вирулентностью и онкогенным потенциалом энтеробактерий.

**Цель исследования.** Изучение распространенности гена *clbB* среди штаммов клебсиелл, выделенных из различных локусов у новорожденных и детей грудного возраста. Исследование проводилось на базе ГАУЗ «Детская республиканская клиническая больница», «Республиканская клиническая инфекционная больница» и ФГБУ «ФНИЦЭМ имени Н. Ф. Гамалеи» в 2015–2016 годах. Исследовано 85 штаммов *Kl. pneumoniae*, выделенных из различных

локусов у новорожденных и грудных детей, находящихся на стационарном лечении с соматической и инфекционной патологией. Среди обследованных пациентов было 38 новорожденных (44,7%) и 47 (55,3%) детей в возрасте 1–12 мес. Пять штаммов *Kl. pneumoniae* выделено из крови, 6 — из содержимого эндотрахеальной трубки, 12 — из мочи, 19 штаммов — из смывов со слизистой зева, 42 штамма — из фекалий и 1 штамм — из ликвора. Детекцию генов, кодирующих синтез *clbB*, проводили методом ПЦР.

Ген *clbB* был обнаружен у 1 (20%) штамма *Kl. pneumoniae*, выделенного из крови, у 1 (16,6%) штамма, выделенного из содержимого эндотрахеальной трубки, у 2 (16,6%) штаммов, выделенных из мочи, у 2 (10,5%) штаммов, выделенных из зева, и у 1 (2,3%) штамма, выделенного из фекалий.

У штаммов, выделенных из стерильных в норме локусов (кровь, моча, трахея, ликвор) ген *clbB* обнаруживался достоверно чаще (17,4%), чем у кишечных штаммов *Kl. pneumoniae* (2,3%) ( $p < 0,05$ ), что подтверждает роль колибактина в развитии внекишечных форм (в т. ч. генерализованных) клебсиеллеза у детей.

## Необходимость определения субпопуляций Т-хелперов в изучении патогенеза и перспектив лечения саркоидоза

Н. М. Лазарева<sup>1,2</sup>, О. П. Баранова<sup>2</sup>, И. В. Кудрявцев<sup>2,3</sup>, М. К. Серебрякова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург

**Введение.** В настоящее время в патогенетических механизмах образования гранул при острой и хронической формах саркоидоза рассматривают роль Т-хелперов (Th), а также синтезируемых ими растворимых молекул. Определение субпопуляций Th с учетом наличия на их поверхности хемокиновых рецепторов может помочь в понимании различий иммунологических механизмов образования гранул при саркоидозе, течения заболевания, поиске новых подходов к диагностике и лечению.

**Цель и задачи исследования.** Определить субпопуляции Th на основании наличия на поверхности клеток ключевых хемокиновых рецепторов в периферической крови больных с острым и хроническим дебютом саркоидоза.

**Материалы и методы.** С использованием метода многоцветной проточной цитометрии (Navios™, Beckman Coulter, США) исследованы образцы крови больных с впервые выявленным нелеченым хроническим ( $n = 46$ ), острым ( $n = 11$ ) дебютом саркоидоза и условно здоровых лиц ( $n = 26$ ).

**Результаты.** У больных с хроническим дебютом саркоидоза относительное содержание Th (40,48%) достоверно выше, чем у больных с острым началом и группой условно здоровых лиц (52,94 и 47,22%;  $p = 0,006$  и  $p < 0,001$ ). Среди «зрелых» Th (CD 45RA–) количество Th1 (CXCR 5–CXCR 3+CCR 6–CCR 4–) ниже при хроническом начале саркоидоза относительно груп-

пы контроля (11,23 против 15,9%;  $p=0,008$ ). Количество Th17/Th22 (CXCR 5–CXCR 3–CCR 6+CCR 4+) и дубль-позитивных Th17 (CXCR 5–CXCR 3+CCR 6+CCR 4+) повышено при хроническом дебюте относительно группы контроля: (14,54 против 11,43%,  $p=0,028$ ) и (14,22 против 10,82%;  $p=0,001$ ) соответственно.

**Выводы.** Выявленные изменения субпопуляционного состава Th в периферической крови больных саркоидозом свидетельствуют об их участии в иммунопатогенезе образования гранулем на начальных этапах различных форм дебюта заболевания. Полученные данные могут помочь в определении спектра патогенетически значимых цитокинов и хемокинов, в экспериментальном поиске альтернативных, таргетных методов лечения саркоидоза.

## Использование метода газожидкостной хроматографии для оценки метаболической активности кишечной микрофлоры у новорожденных детей

И. В. Николаева, Г. С. Шайхиева

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Казань

Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) дает наиболее полное представление о составе и метаболической активности кишечной микрофлоры, что недоступно при использовании классического бактериологического метода исследования фекалий.

**Цель исследования:** изучить микробиологический состав и метаболическую активность кишечной микрофлоры (КМФ) у новорожденных детей.

Когортное проспективное исследование проводилось на базе отделения новорожденных роддома ГАУЗ клиники им. В. С. Груздева Казанского государственного медицинского университета. В исследование были включены 20 здоровых доношенных детей с массой тела при рождении не менее 2900 г и с оценкой по шкале Апгар 7–10 баллов. Проводилось бактериологическое исследование мекония, а также определение спектра короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в меконии методом ГЖХ.

**Результаты исследования.** При бактериологическом исследовании мекония не выявлено роста микробов у 15 (75%) детей, у 2 (10%) детей обнаружены бифидобактерии в количестве  $10^5$  КОЕ/г и у 3 (15%) детей — в количестве  $10^{10}$  КОЕ/г. У всех новорожденных в меконии выявлена метаболическая активность различных представителей кишечной микрофлоры, однако она была существенно ниже аналогичных показателей взрослой микробиоты. При анализе содержания КЖК у детей в профиле C2–C4 выявлено снижение относительного числа уксусной кислоты ( $C_2 = 0,741 \pm 0,074$ ) при повышенном содержании пропионовой ( $C_3 = 0,18 \pm 0,08$ ) и масляной кислот ( $C_4 = 0,072 \pm 0,05$ ). Содержание изокилот ( $0,128 \pm 0,030$  мг/гр) и индекс изокилот ( $0,485 \pm 0,052$  ЕД) были повышенными. Анаэробный индекс был отклонен в сторону отрицательных значений ( $AI = -0,36$ ), что свидетельствовало о преобладании среды обитания микроорганизмов, способствующей росту анаэробных популяций.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что меконий у новорожденных детей часто содержит бифидобактерии (в том числе в высокой концентрации), а также продукты метаболизма КМФ, что подтверждает предположение о возможной внутриутробной транслокации кишечных микробов от матери ребенку.

## Разработка моноклонального антитела, специфичного к эпитопу белка p17 вич-1

А. А. Луковенко, О. А. Добровольская, Е. Г. Богомолова, Н. Н. Колмаков, И. В. Духовлинов, А. С. Симбирцев

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Матриксный белок p17 ВИЧ-1 является ключевым фактором иммунопатогенеза СПИДа, он играет важнейшую роль во всех этапах развития вируса и прогрессии заболевания. Взаимодействие моноклональных антител к различным эпитопам белка p17 с поверхностью ВИЧ-1 инфицированных клеток приводит к уменьшению продукции вирусных частиц. Также антитела к некоторым эпитопам матриксного белка обладают прямой вируснейтрализующей активностью, ингибируя инфицирование чувствительных клеточных линий после взаимодействия с вирионами.

**Цель и задачи.** Целью данного исследования являются разработка и получение моноклонального антитела, специфичного к эпитопу белка p17 ВИЧ-1. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: создание штамма-продуцента рекомбинантного моноклонального антитела, а также разработка технологии получения фармацевтической субстанции на его основе.

**Материалы и методы.** Синтез и клонирование гена, кодирующего рекомбинантный белок, осуществляли методом ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов. Для создания штамма-продуцента рекомбинантного моноклонального антитела использовали высокопродуктивную линию клеток яичника китайского хомячка СНО-K1. Очистку субстанции моноклонального антитела проводили последовательно с использованием обратнo-фазовой и гель-фильтрационной хроматографии.

**Основные результаты.** Была разработана конструкция моноклонального антитела специфичного к белку p17 ВИЧ-1. Был получен высокопродуктивный штамм рекомбинантного моноклонального антитела. Была разработана технология выделения и хроматографической очистки субстанции моноклонального антитела.

**Заключение.** Таким образом, была осуществлена разработка и получение высокоочищенной субстанции моноклонального антитела, специфичного к эпитопу белка p17 ВИЧ-1. На основе данной субстанции планируется создание лекарственного средства для лечения ВИЧ-инфекции. На данный момент проводится изучение иммуногенных и протективных свойств полученного препарата.

## Влияние сокращения массы действующих нефронов на экспрессию микроРНК-21 в миокарде крыс

М. М. Парастаева<sup>1</sup>, О. Н. Береснева<sup>1</sup>, М. И. Зарайский<sup>1</sup>, А. Н. Куликов<sup>1</sup>, С. В. Оковитый<sup>2</sup>, И. Г. Каюков<sup>1</sup>, Г. Т. Иванова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт физиологии имени И. П. Павлова» Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** В настоящее время не вызывает сомнений наличие взаимосвязи между состоянием почек и сердечно-сосудистой системы, получившей отражение в концепции кардиоренального континуума. Появившиеся данные позволяют полагать, что микроРНК-21 может быть одним из звеньев, связывающих почки и сердечно-сосудистую систему. Тем не менее сведения о роли микроРНК-21 в развитии повреждений сердца и почек и их взаимодействии остаются противоречивыми. В связи с этим мы попытались оценить значение изменений экспрессии микроРНК-21 в ткани миокарда в развитии ремоделирования сердца при хроническом сокращении массы действующих нефронов в эксперименте.

**Материалы и методы.** Исследование выполнено на взрослых самцах крыс стока Wistar. Животные были разделены на две группы. В первую (контроль) вошло девять ложнопериорированных крыс. Во вторую (n = 9) — крысы с поэтапной резекцией 5/6 почечной ткани. Через четыре месяца после операции у животных измеряли артериальное давление (АД), выполняли эхокардиографическое (Эхо-КГ) исследование сердца и определяли уровень относительной экспрессии микроРНК-21 в ткани миокарда.

**Методика** определения уровня экспрессии микроРНК-21 (миРНК-21) в миокарде заключалась в выделении тотальной РНК с помощью фенольного реактива (ExtractRNA, Евроген, Москва) и последующей ее экстракцией хлороформом. Реакция обратной транскрипции для приготовления «копийной» ДНК проводилась по технологии Stem Loop отдельно для микроРНК-21 и U 6, которая рассматривалась, как ген сравнения. При расчетах использовалась полуколичественная оценка уровня экспрессии микроРНК-21 (в ОЕ) по протоколу 2<sup>-ΔΔCt</sup> при лабораторном референте (0,09), где Ct — цикл «выхода» сигнала накопления красителя на экспоненциальный уровень по геометрическому протоколу.

Для статистического анализа применялись критерий Манна-Уитни и непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

**Результаты.** Во второй группе крыс зарегистрированы значимо большие уровни АД (в группе 2: 160 + 5 мм рт. ст., 137 + 8 мм рт. ст. — в контроле; p < 0,001), экспрессии микроРНК-21 в миокарде (более чем в 2,5 раза превышала показатель контрольной группы) и толщина межжелудочковой перегородки (Тмжп по данным Эхо-КГ в группе 2: 2,12 + 0,37 мм, в контроле: 1,72 + 0,36 мм; p < 0,03). В этой же

выборке отмечены меньшие значения конечного систолического размера левого желудочка и систолической экскурсии кольца митрального клапана. В объединенной выборке крыс (n = 10; 5 — опыт, 5 — контроль) относительная экспрессия микроРНК-21 в ткани миокарда значимо негативно коррелировала с КДРлж (конечно-диастолический размер ЛЖ) и СЭКМК (величина систолической экскурсии кольца митрального клапана, и позитивно — с Тмжп и ОТС (относительная толщина миокарда ЛЖ). Прямая связь между микроРНК-21 и АД не достигала заданного уровня статистической значимости.

**Заключение.** Ремоделирование сердца при снижении массы действующих нефронов у крыс Wistar ассоциировано с нарастанием экспрессии микроРНК-21 в ткани миокарда. Однако конкретные механизмы участия данной микроРНК в патогенезе перестройки сердца в такой ситуации требуют дальнейших исследований.

## Содержание малых некодирующих рнк в плазме крови и кардиомиоцитах больных ишемической болезнью сердца

Е. А. Полякова, М. И. Зарайский, О. А. Беркович, Е. И. Баранова

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), в том числе ишемическая болезнь сердца (ИБС), остаются ведущими причинами смертности. Традиционные факторы риска могут объяснить около 70% случаев ИБС, в других 30% случаев связи с известными факторами риска ССЗ нет. Кроме того, не всегда понятно, почему одни пациенты при равных условиях имеют однососудистое поражение, в то время как у других повреждаются два и более коронарных сосуда. Направленность на персонализированный подход в современной медицине диктует необходимость поиска и изучения новых высоко чувствительных и специфичных факторов риска. Результаты недавних исследований указывают на участие микроРНК в патогенезе различных патологических состояний, в том числе коронарного атеросклероза и его клинического проявления — ИБС [1–4].

**Цель исследования** — определить экспрессию микроРНК-27a, —133 и —203 у больных ИБС с различной степенью поражения коронарного русла.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 100 человек, которые составили три группы: 40 пациентов с ИБС и гемодинамически значимым атеросклерозом 1–2 коронарных артерий; 40 пациентов с многососудистым коронарным поражением (трех и более артерий) и 20 обследованных без ИБС и значимой сопутствующей патологии. Проводилось определение трех микроРНК: 27a, 133, 203. Выделение РНК проводилось с использованием набора miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, США), согласно предложенной производителем инструкции. Концентрация водного раствора РНК определялась на спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, США). Обратная транскрипция проводилась, используя набор реагентов для обратной транскрипции микро-РНК TaqMan. Полимеразная цепная реакция в реальном времени проводилась

с использованием наборов для определения экспрессии всех исследуемых микроРНК производства Applied Biosystems (США) TaqMan® Gene Expression Assays в соответствии с инструкцией изготовителя.

**Результаты.** Уровень экспрессии микроРНК-27а у больных ИБС с поражением трех и более коронарных артерий был значимо выше, чем у больных с поражением 1–2 сосудов:  $11,41 \pm 4,45$  УЕЭ и  $4,82 \pm 1,82$  УЕЭ соответственно ( $p < 0,01$ ). У обследованных без коронарного атеросклероза уровень микроРНК-27а был достоверно ниже, чем в описанных выше группах больных ИБС, разделенных по числу пораженных артерий:  $3,05 \pm 0,89$  УЕЭ ( $p < 0,001$  для трехсосудистого поражения и  $p < 0,05$  — для 1–2-сосудистого). Такое же наблюдение было отмечено для уровня экспрессии микроРНК-133: при трехсосудистом поражении коронарных артерий —  $8,42 \pm 4,43$  УЕЭ, при 1–2-сосудистом —  $4,35 \pm 1,23$  УЕЭ и у обследованных без стенозов —  $1,66 \pm 0,57$  УЕЭ (при попарном сравнении с группой сравнения:  $p < 0,01$  для трехсосудистого поражения и  $p < 0,05$  — для 1–2-сосудистого; между группами больных —  $p < 0,01$ ). Самыми значительными оказались различия между группами при анализе уровня микроРНК-203. Так, при трехсосудистом поражении коронарных артерий уровень экспрессии составил  $145,71 \pm 15,73$  УЕЭ, при 1–2-сосудистом —  $43,70 \pm 9,67$  УЕЭ и у обследованных без стенозов —  $4,11 \pm 0,85$  УЕЭ (при попарном сравнении с группой сравнения:  $p < 0,0001$  для трехсосудистого поражения и  $p < 0,01$  — для 1–2-сосудистого; между группами больных —  $p < 0,01$ ).

**Заключение.** Данное исследование расширяет представления о молекулярных основах патогенеза ИБС путем количественной оценки экспрессии микроРНК-27а, микроРНК-133 и микроРНК-203 в доступном для исследования материале — сыворотке крови.

## –87t>c полиморфизм гена — рецептора активатора пролиферации пероксисом дельта и содержание фактора некроза опухолей альфа плазмы крови у больных ишемической болезнью сердца

Е. Г. Сергеева, Ж. И. Ионова, М. И. Зарайский, О. А. Беркович

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Рецепторы активатора пролиферации пероксисом (PPAR)-дельта относятся к группе ядерных рецепторов, регулирующих обмен липидов и глюкозы, активность факторов иммунного воспаления. –87T>C-полиморфизм гена PPAR-дельта ассоциирован с повышенной транскрипционной способностью гена, повышением чувствительности рецептора к соответствующим лигандам, улучшением чувствительности тканей к инсулину и подавлением факторов иммунного воспаления. Фактор некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) связан с развитием артериальной гипертензии, ремоделирования сердца, инсулинорезистентности у больных сахарным диабетом второго типа.

**Цель работы.** Изучить связь –87T>C полиморфизма гена PPAR-дельта с уровнем ФНО-альфа, показателями липидного спектра крови и с особенностями клинического течения ишемической болезни сердца (ИБС).

**Материалы и методы.** TT-, TC-, CC-генотипы гена PPAR-дельта были определены у 202 больных ИБС и у 107 обследованных лиц из группы контроля без клинических ИБС методом полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом. Содержание ФНО-альфа плазмы крови определялось методом иммуноферментного анализа ELISA (DRG).

**Результаты.** Встречаемость TT-, TC-, CC-генотипов гена PPAR-дельта значимо не отличалась у больных ИБС и в группе сравнения без ИБС (TT — 47,2%, TC — 45%, CC — 7,8% и TT — 47,6%, TC — 45,6%, CC — 6,8%,  $P > 0,05$ ), а также у больных ИБС с различной формой дебюта ИБС — с инфаркта миокарда или со стенокардии напряжения (TT — 46,9%, TC — 45,2%, CC — 7,9% и TT — 47,3%, TC — 44,8%, CC — 7,9%;  $P > 0,05$ ). Не выявлено различий показателей липидного спектра крови и индекса массы тела у больных ИБС — носителей различных генотипов 87T>C полиморфизма гена PPAR-дельта ( $P > 0,05$ ).

Носительство CC генотипа и С аллеля уменьшало риск сердечной недостаточности III функционального класса в 1,52 и 1,47 раза соответственно ( $p = 0,006$ ; OR = 1,52 (1,05 ÷ 2,2);  $p = 0,008$ , OR = 1,47 [1,09 ÷ 2,5]). Кроме этого, встречаемость CC-генотипа и С-аллеля была выше в группе больных ИБС с индексом массы миокарда равным или более 115 г/л, чем у обследованных пациентов с индексом массы миокарда менее 115 г/л (9,8 и 7,1% соответственно;  $p = 0,04$ ), но без влияния на риски (OR = 1,26 [0,96 ÷ 1,53]).

Содержание ФНО-альфа было выше у больных ИБС — носителей TT генотипа по сравнению с его уровнем у носителей CC генотипа гена PPAR-дельта (TT генотип —  $13,23 \pm 7,41$  пг/мл, TC генотип —  $11,1 \pm 4,78$  пг/мл, CC генотип —  $9,45 \pm 3,96$  пг/мл;  $p = 0,03$ ).

## Молекулярно-генетическое типирование штаммов *C. difficile* на основе использования идеи двойного расщепления и избирательного мечения фрагментов ДНК

В. П. Терлецкий<sup>1,2</sup>, В. И. Тыщенко<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет имени А. С. Пушкина», г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства) — филиал ФГБНУ Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», г. Санкт-Петербург

**Введение.** Важным элементом в профилактике инфекционных заболеваний является быстрая и точная идентификация возбудителя на штаммовом уровне с целью определить источник инфекции и выявить пути ее распространения. Данная задача решается генотипированием микроорганизма, при котором сравниваются генотипы бактерий.

**Цель и задачи исследования** заключались в разработке метода генотипирования штаммов *Clostridium difficile* и использовании его в выявлении генетического разнообразия бактериальных изолятов.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служили 20 изолятов *Clostridium difficile*, выделенных от больных в условиях стационара. Молекулярно-генетическое типирование штаммов было основано на идее двойного расщепления и избирательного мечения (ДРИМ). Суть подхода заключается в использовании одновременно двух эндонуклеаз рестрикции, одна из которых производит 3'-усеченные концы фрагментов ДНК, а вторая — тупые либо 3'-выступающие концы. Присутствие в реакционной смеси фермента *Taq*-полимеразы и метки биотинилированный дезоксицитозинтрифосфат (Bio-dCTP) обеспечивает эффективное мечение фрагментов ДНК, имеющих хотя бы один 3'-усеченный конец. Таким образом только небольшая часть фрагментов ДНК включит метку и может быть визуализирована после обычного агарозного гель-электрофореза.

**Основные результаты.** Генотипирование изолятов *C. difficile* предлагаемым методом позволяет выявить 25–30 легко учитываемых фрагментов геномной ДНК возбудителя, что дает возможность присвоить каждому штамму уникальный штрих-код и определить пути передачи возбудителя, т. е. решать вопросы молекулярной эпидемиологии.

**Выводы.** Таким образом, метод ДРИМ является привлекательной альтернативой существующим в настоящее время способам генотипирования бактериальных изолятов *C. difficile*.

Исследование выполнено при поддержке государственного задания ФАНО № ГЗАААА-А18–118021590138–1.

## Предиктивная информативность лабораторных технологий в этиологии ишемического инсульта у лиц молодого возраста

И. А. Хоменко, О. С. Рузанова, В. С. Эмануэль, А. В. Артемова

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Верификации групп риска развития ишемического инсульта в молодом возрасте (до 45 лет) обеспечит эффективную профилактику социально значимого заболевания. Изучение прогностичности лабораторных и инструментальных технологий остается актуальной научной задачей в решении этой проблемы.

**Цель.** Изучение клинико-лабораторных параметров при клинической реализации индивидуально-средовых факторов в развитии ишемического инсульта в молодом возрасте.

**Материалы и методы.** Использован широкий спектр лабораторных и инструментальных технологий при конкретном клиническом случае развития ишемического инсульта у женщины в возрасте 42 года.

Наличие инсульта в бассейне правой средней мозговой артерии подтверждено данными МРТ головного мозга. По данным лабораторных тестов признаков воспаления,

патологии печени, почек, углеводного, липидного обмена и функции щитовидной железы выявлено не было. Уровень гомоцистеина в пределах референтных значений. Проведено обследование на наличие антифосфолипидного синдрома: антикардиолипиновые антитела (IgM, IgG), антитела к бетта глипротеину-1 (IgM, IgG), волчаночный антикоагулянт (скрининговые и подтверждающие методы) — патологии не найдено. Данные инструментальных обследований: триплексное сканирование брахиоцефальных и транскраниальных артерий не выявило признаков атеросклеротического повреждения и диссекции сосудов; ЭХО-КГ, ЭКГ — нет признаков патологии и возможной кардиоэмболии; холтеровское мониторирование — без патологии. Обращало на себя внимание усиление головной боли перед заболеванием: пациентке гинеколог назначил комбинированные оральные контрацептивы в лечебных целях. Пациентка не связала усиление головной боли и прием препарата, оценила свое состояние как усталость, следствие стресса.

**Результаты и обсуждение.** Было проведено генетическое обследование на наследственные тромбофилии (Лейден-мутация V-фактора свертывания крови, мутация протромбина G20210A) в соответствии с Российскими клиническими рекомендациями по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоэмболических осложнений (2015). Пациентка оказалась носителем гетерозиготной мутации Лейден и по протромбину. Известно, что генетическая тромбофилия не является заболеванием, но широко распространена (более чем в 50% случаев) при первичном артериальном или венозном тромбозе, особенно у лиц молодого возраста. Рассматривается как фактор риска возникновения тромботических осложнений, особенно при наличии дополнительных факторов. В частности, опасным является сочетание наследственной тромбофилии и приема комбинированных оральных контрацептивов, особенно при увеличении (возникновении) головной боли.

**Выводы.** Генетическое тестирование наличия наследственных тромбофилий можно рассматривать как информативное исследование наличия этиологических факторов развития инсульта в молодом возрасте.

## Диагностическая эффективность применения NGS-секвенирования в алгоритме неонатального скрининга

Ю. А. Чурюмова, Т. В. Вавилова

ФГБОУ ВО «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Наследственные болезни обмена (НБО) представляют собой фенотипически и генетически гетерогенную группу заболеваний, возникающих в результате генетических повреждений, приводящих к недостаточной функции или отсутствию ферментативной активности различных метаболических процессов.

Из-за тяжелых клинических последствий НБО являются актуальной проблемой здравоохранения и составляют

значительную часть в структуре причин заболеваемости и смертности в клинической практике. С целью профилактики осложнений и ранней диагностики излечимых эндокринных и метаболических заболеваний у новорожденных во многих странах проводится неонатальный скрининг. Скрининговые тесты не являются диагностическими и должны сопровождаться проведением специфичных исследований для подтверждающей диагностики тестируемых заболеваний и исключения ложноположительных результатов, которые приводят к излишнему стрессу для семей этих детей и ненужным расходам для системы здравоохранения.

С 2015 года в СПбГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)» для рационализации протоколов скрининга в качестве теста второго уровня в алгоритм скрининга трех моногенных заболеваний (муковисцидоз, галактоземия, фенилкетонурия) был внедрен ДНК-анализ мутаций в генах CFTR, GALT и PAH методом секвенирования нового поколения (NGS). В период с января 2015 года по сентябрь 2017-го методом NGS обследованы 859 новорожденных с повышенными результатами неонатального скрининга из 196 117 скринируемых. По итогам исследования два патогенных аллеля были идентифицированы: в группе обследуемых с повышенными результатами скрининга на муковисцидоз — у 12,5% пациентов (33 из 264); на фенилкетонурию — у 40% пациентов (32 из 80), из которых в 13,75% случаев обнаружены мутации, обуславливающие «мягкий» фенотип и не требующие назначения лечебного питания; в группе с подозрением на галактоземию — в 0,4% случаев (2 из 515). В ходе исследования были выявлены 7% носителей первого патогенного аллеля в гене CFTR, в гене PAH — 6,25%, а при исследовании гена GALT были выявлены 7% носителей биохимического варианта Дуарте, а также 6% носителей первого патогенного аллеля в сочетании с вариантом Дуарте. При анализе результатов скрининговых биохимических тестов процент ложноположительных результатов составил для муковисцидоза — 87,5%, фенилкетонурии — 60% и для галактоземии — 87%.

Таким образом, применение комплексного лабораторного обследования с использованием скрининговых и диагностических тестов позволяет добиться максимальной диагностической эффективности в рамках реализации программы неонатального скрининга.

## Информативность лабораторных и инструментальных технологий в диагностике и формирования лечебной стратегии при первичной прогрессирующей афазии

**В. С. Эмануэль, Е. В. Мельник, Т. А. Пампуло, М. Г. Шабаяева**

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Введение.** Формирование диагностического алгоритма и стратегии ведения пациентов при выявлении афазии у лиц без анамнестических данных наличия патологических изменений головного мозга является актуальной задачей практической неврологии.

**Цель.** Изучение информативности клинических, лабораторных и инструментальных методов в верификации нейродегенеративных заболеваний.

**Материалы и методы.** Представлен клинический случай пациентки Е. 50 лет с фронто-темпоральной деменцией. Дебют заболевания — с 45 лет. Ведущий патологический синдром — прогрессирующая афазия. Пациентка неоднократно обращалась к врачам (невролог, терапевт, психолог) с жалобами на нарушение речи: трудно вспомнить и правильно произнести слова. В первые два года заболевания выявлялась только прогрессирующая афазия. Пациента не работает с 47 лет, себя обслуживает, но за покупками ходить не может. На протяжении пяти лет ей ставился диагноз «соматоформные расстройства», проводилась безуспешная терапия. На момент курации в декабре 2016 года в неврологическом статусе выявлено: смешанная афазия (моторная и амнестическая), симультанная агнозия, зрительно-пространственная агнозия, алексия, акалькулия, апраксия в левой руке, MMSE 16 баллов, батарея лобных тестов 8 баллов, акинетико-ригидный синдром (ахейрокинез и легкая пластичность мышц верхних конечностей), пирамидная недостаточность справа. Госпитальная шкала тревоги и депрессии: данные патологии не выявлены. Проведенные лабораторные тесты: клинический анализ крови; общий анализ мочи; копрограмма; биохимическое исследование крови: функциональное состояние печени, почек, щитовидной железы, углеводный обмен, липидный обмен, уровень витамина B12, фолиевая кислота, кальций крови — патологии не выявили. Определялся дефицит витамина D<sub>3</sub>. С учетом апраксии взора вверх, наличия затянувшейся желтухи новорожденных и деменции в молодом возрасте было проведено обследование на болезнь Нимана-Пика тип С, однако данный диагноз не подтвердился.

**Результаты и их обсуждение.** МР-трактография 2015 года: минимальное обеднение проводников задней трети ствола мозолистого тела. МРТ головного мозга. 2016 год: диффузные атрофические изменения головного мозга. ПЭТ-КТ. 2017 год: признаки гипометаболизма с 18F-фтордезоксиглюкозой в проекции теменных, височных, затылочных долей, в меньшей степени лобных долей. Известно, что прогрессирующая афазия может протекать как самостоятельное заболевание и в течение 6–11 лет сопровождаться постепенным нарастанием афазии, что в итоге приведет к мутизму. Однако с прогрессирующей афазией могут дебютировать другие нейродегенеративные заболевания, в том числе фронто-темпоральная деменция. С учетом данных анамнеза и дополнительного обследования поставлен диагноз «фронто-темпоральная деменция, тип прогрессирующей афазии». На фоне проводимой терапии (ингибиторы холинэстеразы [галантамин], мемантин, витамин D<sub>3</sub>) получен положительный результат в виде увеличения речевой активности, возможности счета от 1 до 10, самостоятельного посещения тренажерного зала, участия в воспитании внука.

**Выводы.** Учитывая редкую распространенность нейродегенеративных заболеваний, отсутствие четких клинических признаков, целесообразна разработка интеллектуальной экспертной системы для оценки совокупности клинической картины и результатов инструментальных и лабораторных технологий.



# Надежность и безопасность в лабораторном секторе

- Профессиональная модель, электронное управление с ЖК-дисплеем и точностью заданной температуры до 0,1 °C
- Визуальная и звуковая сигнализация изменения температуры, открытия двери и отключения питания
- Визуальная и звуковая сигнализация изменения температуры, открытия двери и отключения питания
- Интегрированная регистрация и хранение данных о температуре и случаях аварийной сигнализации
- Последовательный интерфейс RS 485 для регистрации данных о температуре и беспотенциальные контакты для дополнительной сигнализации
- Калибровка по 3 точкам обеспечивает точность температуры хранения

LKPv 6520



lab.liebherr.com



home.liebherr.com

# LIEBHERR

Качество, дизайн и инновации



Точная диагностика -  
эффективное лечение!

Ранняя лабораторная  
диагностика гепатита С

# ВГС core-антиген-ИФА-БЕСТ

РУ № РЗН 2013/1181 № по Кат. D-0779

**Набор реагентов производства АО «Вектор-Бест»  
для иммуноферментного выявления core антигена вируса  
гепатита С (ВГС)**

- » Использование набора обеспечивает значительное сокращение периода серонегативного окна
- » Набор выявляет маркер ВГС на 20 дней раньше, чем тесты для выявления только антител к ВГС
- » Набор выявляет маркер ВГС на 11-12 дней раньше, чем тест, выявляющий одновременно антитела к ВГС и вирусный core антиген.



## » Основные характеристики набора:

- Диагностическая специфичность – 99,8% (оценка по 7032 образцам сывороток крови здоровых доноров)
- В лунках планшета иммобилизованы моноклональные антитела к core антигену ВГС
- Цветовой контроль внесения образцов
- Образцы для исследования не требуют предварительной подготовки.
- Возможно дробное (по одному стрипу) использование набора при ручной постановке и до 6 независимых постановок на автоматических ИФА-анализаторах
- Исследуемый образец – 50 мкл сыворотки/плазмы крови
- Общее время инкубации – 3 часа 30 минут
- Учет результатов – спектрофотометрия на 450/620 нм, либо 450/0 нм
- Срок хранения – 12 месяцев при 2-8°C

## » Кроме того, АО «Вектор-Бест» производит наборы:

- для иммуноферментного выявления и подтверждения наличия антител к ВГС,
- для иммуноферментного выявления спектра антител к отдельным антигенам ВГС,
- для одновременного иммуноферментного выявления core антигена ВГС и антител к ВГС,
- для выявления и количественного определения РНК ВГС и определения генотипа ВГС методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

**Широкий выбор наборов реагентов для ИФА, ПЦР в режиме реального времени  
и клинической биохимии!**

**АО «Вектор-Бест»**

т/ф: (383) 227-73-60, 332-81-34

vbmarket@vector-best.ru

www.vector-best.ru

# Core-антиген и РНК вируса гепатита С в пробах сыворотки крови пациентов с антителами к Core-антигену вируса

**А. А. Потапова**, д.б.н., доцент, врач высшей категории по специальности «клиническая лабораторная диагностика», биолог<sup>1</sup>

**М. М. Шульгина**, врач клинической лабораторной диагностики<sup>1</sup>

**Т. А. Туполева**, к.м.н., зав. отделом вирусологической диагностики<sup>2</sup>

**Е. Н. Овчинникова**, врач клинической лабораторной диагностики<sup>2</sup>

**Т. Ю. Романова**, вед. специалист<sup>2</sup>

**М. А. Смердова**, вед. специалист<sup>3</sup>

**М. И. Михайлов**, д.м.н., проф., член-корр. РАН, рук. научно-исследовательского центра<sup>4</sup>, зав. лабораторией<sup>5</sup>

**В. С. Кичатова**, м.н.с.<sup>4,5</sup>

**К. К. Кюрегян**, д.б.н., проф. РАН, рук. отдела<sup>4</sup>, в.н.с.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ г. Москвы «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» Департамента здравоохранения г. Москвы

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, г. Москва

<sup>3</sup>ЗАО «Вектор-Бест-Европа», г. Москва

<sup>4</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, г. Москва

<sup>5</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», г. Москва

## Core-antigen and RNA of hepatitis C virus in sera samples of patients with antibodies to virus Core-antigen

A. A. Potapova, M. M. Shulgina, T. A. Tupoleva, E. N. Ovchinnikova, T. Yu. Romanova, M. A. Smerdova, V. S. Kichatova,

K. K. Kyuregyan, M. I. Mikhaylov

Moscow Scientific and Practical Centre for Dermatovenereology and Cosmetology, National Medical Research Centre for Hematology, Vector-Best-Europa Co., Russian Medical Academy for Continuing Professional Education, Mosc Scientific and Research Institute for Vaccines and Sera n.a. I.I. Mechnikov; Moscow, Russia

### Резюме

Целесообразность исследования прямого маркера инфекции, вызванной вирусом гепатита С (ВГС) — антигена Core (АГ-Core) ВГС, так же, как и значимость выявления только антител к Core (АТ-Core) антигену, в настоящее время только изучается. Целью представленной работы было выявление АГ-Core и РНК ВГС в пробах сыворотки крови пациентов с АТ-Core, обнаруживаемыми в ИФА с разной оптической плотностью (ОП). Материалы и методы. Выявление АТ-ВГС, АГ-Core, совместное выявление АГ-Core/АТ-ВГС проводили в иммуноферментных тест-системах. Вычисляли коэффициент позитивности (КП) как отношение ОП пробы к ОП критической. РНК ВГС определяли методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов реакции и ПЦР в режиме реального времени. Определяли генотип вируса. Результаты и выводы. Совместное исследование АГ-Core и АТ-ВГС не способствовало уточнению лабораторной диагностики ВГС-инфекции по сравнению с выявлением только АТ-ВГС. В отличие от этого выявление АГ-Core оказалось целесообразным в группах проб, различающихся по КП АТ-Core ВГС. В группе проб с КП АТ-Core ( $\geq 15$ ) АГ-Core обнаруживается в семь раз чаще, чем в пробах с низкими ( $\leq 6,5$ ) КП АТ-Core (соответственно в 66,6 и в 8,82%;  $p < 0,005$ ). РНК ВГС в концентрации более  $3,8 \times 10^5$  МЕ/мл обнаруживается в 75% проб с высокими КП АГ-Core ( $\geq 11$ ) и АТ-Core ( $\geq 15$ ). РНК ВГС в низкой концентрации ( $< 300$  МЕ/мл) обнаруживается в 20% проб с низкими КП АТ-Core ( $\leq 6,5$ ), в которых одновременно обнаруживается АГ-Core с низкими КП ( $< 3$ ). По-видимому, пациенты с АГ-Core в качестве единственного маркера ВГС-инфекции должны быть под динамическим лабораторным и клиническим наблюдением.

Ключевые слова: Core-антиген ВГС, РНК ВГС, иммуноферментный анализ, скрининг.

### Summary

The expediency of studying a direct marker of infection, caused by hepatitis C virus (HCV), Core antigen (Ag-Core), as well as the importance of only detecting antibodies to Ag-Core (Ab-Core) antigen, is just being studied at the present time. The aim of this study was to identify Ag-Core and HCV RNA in blood sera samples obtained from patients with Ab-Core which are found in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with different optical density (OD). Materials and methods. Separate and joint Ab-HCV and Ag-Core identification in patients' blood sera samples was carried out with ELISA test systems. The positivity coefficient (PC), also known as S/Co, was calculated as the ratio of a sample OD to the cut-off OD. HCV RNA was determined by using PCR with both electrophoretic and real-time detection of reaction products. In some samples HCV genotype has been defined. Results and conclusions. In our study the joint research of Ag-Core and Ab-HCV hasn't improved the laboratory diagnostics of HCV infection compared with ELISA screening intended only for Ab-HCV identification. Contrary to this, Ag-Core identification has proved to be expedient in sera samples groups with different Ab-Core HCV S/Co. In a group of samples with Ab-Core S/Co  $\geq 15$  Ag-Core is found 7 times as often as in those with low ( $\leq 6.5$ ) Ab-Core S/Co (66.6 and 8.82% respectively;  $p < 0.005$ ). HCV RNA with a concentration higher than  $3.8 \times 10^5$  ME/ml is found in 75% of samples with high Ag-Core ( $\geq 11$ ) and AT-Core ( $\geq 15$ ) S/Co. HCV RNA with a low concentration ( $< 300$  ME/ml) is found in 20% of samples with low Ab-Core S/Co ( $\leq 6.5$ ) which also contain Ag-Core with low S/Co ( $< 3$ ). Apparently, patients with Ag-Core as the only marker of HCV infection need to be under dynamic laboratory and clinical observation.

Key words: HCV Core-antigen, RNA HCV, ELISA, screening.

**В**ывявление лиц с бессимптомным течением вирусного гепатита С по наличию антител к вирусу гепатита С (АТ-ВГС), определяемых методом иммуноферментного анализа (ИФА) при массовом скрининге, является одной из важнейших задач клинической лабораторной диагностики. Согласно утвержденным в Российской Федерации санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.3112–13 «Профилактика вирусного гепатита С», «наличие антител к ВГС является одним из критериев случая, подозрительного на острый вирусный гепатит С (ОГС) или на хронический вирусный гепатит С (ХГС). Подтвержденным случаем гепатита С является случай, соответствующий критериям подозрительного случая, при наличии рибонуклеиновой кислоты вируса гепатита С в сыворотке (плазме) крови» [1]. Целесообразность исследования другого прямого маркера ВГС-инфекции — антигена Core (АГ-Core) — в настоящее время только изучается [2, 3], так же как и значимость выявления только антител к Core (АТ-Core) антигену в отдельных группах пациентов [4].

**Целью работы** было выявление АГ-Core и РНК ВГС в пробах сыворотки крови пациентов с АТ-Core, обнаруживаемыми в ИФА с разной оптической плотностью.

#### **Материалы исследования**

Для определения АТ-ВГС, РНК ВГС и АГ-Core ВГС использовались пробы сыворотки крови без признаков хилеза и гемолиза, приготовленные без использования ЭДТА и гепарина. До исследования пробы хранились при +4 °С не более 72 часов. Отобранные для дополнительных исследований пробы аликвотировались и замораживались при –40 °С; повторного замораживания и оттаивания проб не допускалось.

#### **Методы исследования**

*Исследование наличия АТ-ВГС* в пробах сыворотки крови пациентов осуществлялось в диагностических иммуноферментных тест-системах (ИФТС) планшетного формата, про-

изведенных и зарегистрированных в РФ. Использована скрининговая ИФТС «Бест анти-ВГС-авто» (ЗАО «Вектор-Бест»), две подтверждающие ИФТС с отдельным определением АТ-Core и антител к неструктурным антигенам (АТ-NS ВГС): «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест» (ЗАО «Вектор-Бест», ВБ) и «ИФА-анти-НСV-спектр-GM» (НПО «Диагностические системы», ДС), и ИФТС «Бест-анти-ВГС-спектр» с определением АТ-Core и антител к отдельным неструктурным антигенам *AT-NS3*, *AT-NS4*, *AT-NS5* ВГС (ЗАО «Вектор-Бест»). Раскапывание проб и внесение реагентов производилось вручную с помощью автоматических пипеток и диспенсеров фирмы Biohit (Финляндия), а также с помощью системы для автоматического пипетирования проб биологического происхождения Freedom Evo Clinical (Tecan). Промывка лунок планшета производилась с помощью автоматического промывателя фирмы Thermo scientific (США). Оптическую плотность (ОП) образцов определяли с помощью ридера Sunrise (Tecan). Пробы, положительные в скрининге на наличие АТ-ВГС, затем исследованы в соответствии с приказом МЗ РФ [5] в диагностических системах для ИФА с отдельным определением АТ-Core и АТ-NS для подтверждения наличия в них АТ-ВГС. Значение коэффициента позитивности (КП) вычислялось как отношение величины ОП образца к величине ОП критической.

*Для совместного определения Core-белка и антител к антигенам ВГС* использован диагностический комплект «ВГС АГ/АТ-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест»).

*Выявление АГ-Core ВГС* проводили с помощью набора реагентов «ВГС-core-антиген-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест»).

#### *Определение РНК ВГС*

При детекции продуктов амплификации полимеразной цепной реакции (ПЦР) методом электрофореза в агарозном геле РНК вируса выделяли с помощью набора MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I и MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I — Large Volume (Roche

Applied Science, Мангейм, Германия) из 400 или 1 000 мкл в зависимости от доступного объема согласно протоколу производителя. Детекцию вирусной РНК проводили методом ОТ-ПЦР с использованием Colored Taq — полимеразы (реактивы компании Sileks, Россия) и праймеров к наиболее консервативному участку вирусного генома — 5'-нетранслируемому региону. Для амплификации участка 5'-НТО использовались следующие праймеры: внешний прямой 5'-ctg-tga-gga-act-act-gtc-tt — 3'; внешний обратный 5' — tat-cag-gca-gta-cca-caa-gg 3'; внутренний прямой 5' — ttc-acg-cag-aaa-gcg-tct-ag — 3'; внутренний обратный 5' — acc-caa-cac-tac-tcg-gct-ag — 3'. Условия первого раунда ПЦР были следующими: обратная транскрипция при 42 °С — 60 мин., 94 °С — 5 мин.; затем 35 циклов — денатурация при 94 °С — 30 с, отжиг праймеров при 55 °С — 30 с и удлинение цепи при 72 °С — 45 с, финальная элонгация — 72 °С — 7 мин. Продукт первой ПЦР амплифицировали во втором раунде ПЦР при следующих условиях: 94 °С — 5 мин.; затем 15 циклов: денатурация при 94 °С — 30 с, отжиг праймеров при 55 °С — 30 с и удлинение цепи при 72 °С — 45 с, финальная элонгация проходила при 72 °С — 7 мин. Полученный продукт ПЦР величиной 207 нт определяли в электрофорезе в агарозном геле (1,5%) в буфере ТБЕ (Tris / Borate / EDTA). Аналитическая чувствительность метода составляла 50 МЕ/мл.

Во-вторых, выявление генетического материала ВГС проведено с использованием набора реагентов «АмплиСенс НСV-Монитор-FL v. 4» (производство ЦНИИЭ Роспотребнадзора), предназначенного для количественного определения РНК вируса гепатита С (НСV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene 6000 Q (Qiagen, Германия). При экстракции РНК из 200 мкл образца с помощью комплекта реагентов «Магно-сорб» аналитическая чувствительность метода составляла 50 МЕ/мл.

Определение генотипа ВГС в пробах с обнаруженной РНК проводили с помощью набора реагентов «АмплиСенс HCV-генотип — FL», формат FRT, форма 6 (определение генотипов ВГС 1–6).

Для ряда показателей определено стандартное отклонение  $\sigma$  и 95-процентный доверительный интервал (95% ДИ).

### Полученные результаты

1. Определение РНК ВГС в пробах сыворотки крови, исследованных в ИФТС для определения АТ-Core и совместного определения АГ-Core / АТ-ВГС.

На наличие РНК ВГС с электрофоретической детекцией продуктов ПЦР (см. рис.) исследована 41 проба с положительными и противоречивыми результатами определения АТ-ВГС. Все пробы исследованы также в ИФТС с совместным определением АГ-Core и АТ-ВГС. Средний возраст пациентов составлял 42,1 года (95-процентный ДИ: 10,6–73,6; min — 1 год, max — 88 лет).

В скрининге средний КП АТ-ВГС равен  $2,37 \pm 1,41$ . При исследовании АТ-Core в данных низкопозитивных в скрининге пробах наблюдались противоречивые результаты в разных под-

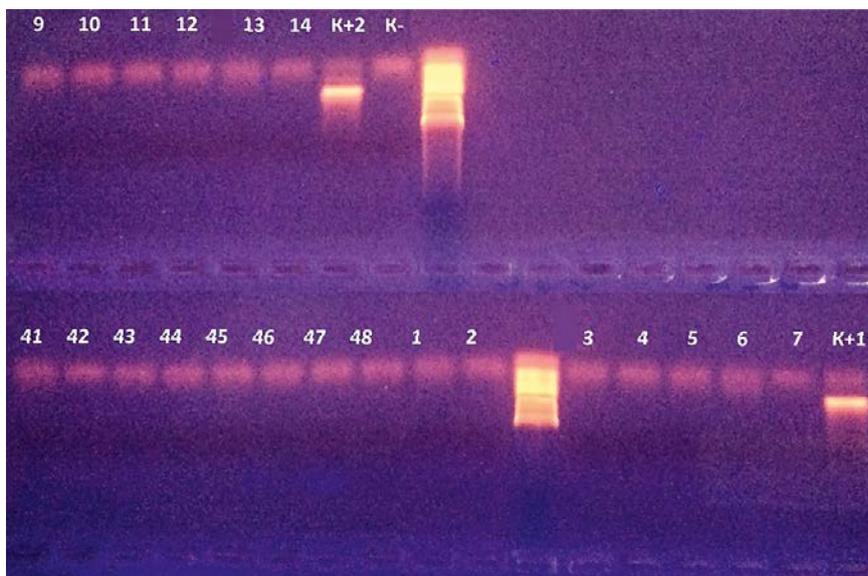


Рисунок. Отрицательный результат определения РНК ВГС в пробах сыворотки крови с положительными и противоречивыми результатами определения АТ-Core (коэффициент позитивности АТ Core от 3,2 до 7,8), и совместного определения АГ/АТ-Core. Пояснения см. в тексте.

тверждающих ИФТС. В ИФТС, предназначенных для выявления АТ-Core и АТ-NS, КП АТ-Core равен  $1,29 \pm 0,29$  (от 1,01 до 1,91); при этом в пяти пробах результат был отрицательным, а в шести находился в так называемой серой зоне (на 10% ниже ОП критической). При исследовании 41 пробы в ИФТС «спектр» результат исследования 18 проб был положительным,

КП АТ-Core в ИФТС «спектр» равен  $1,29 \pm 0,19$  (от 1,04 до 1,62); при этом результат исследования 18 проб был отрицательным, у пяти проб находился в так называемой серой зоне. В целом при выявлении АТ-Core с низкими КП в первой подтверждающей ИФТС, в ИФТС «спектр» в 20 из 30 проб (67%) анти-Core не обнаружены, или результаты измерения ОП

Таблица 1  
Противоречивые результаты определения АТ-ВГС в различных ИФТС в пробах сыворотки крови с положительными результатами совместного определения АГ-Core / АТ-ВГС

№ п/п	№ пробы	Пол	Возраст, лет	Скрининг	Подтверждающий тест (КП)		Подтверждающий тест «спектр» (КП)				Тест Core-АГ/АТ-ВГС	
				КП АТ-ВГС	АТ-Core	АТ-NS	АТ-Core	АТ-НС3	АТ-НС4	АТ-НС5	КП	Результат
1	3458	Ж	88	3,28	Отрицательный	0,29	С. з.	1,31	Отрицательный	Отрицательный	1,64	Положительный
2	4890	Ж	38	2,27	1,32	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	2,83	Положительный
3*	4139	Ж	30	2,65	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	1,93	Положительный
4*	5400	М	20	2,21	1,64	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	3,56	Положительный
5	1533	М	80	1,84	0,99	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	1,08	Положительный
6	2571	Ж	73	1,58	1,16	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	1,55	Положительный
7	1926	Ж	81	1,13	1,08	Отрицательный	С. з.	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	2,07	Положительный
8*	4139	Ж	30	0,53	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	0,72	Положительный
9	1230	Ж	3	0,389	0,403	Отрицательный	0,331	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный	0,053	Отрицательный
10**,**	2996	Ж	33	0,217	0,46	0,43	0,3	0,3	0,3	0,4	0,071	Отрицательный

Примечание: \* — беременные женщины; \*\* — в ИФТС «ИФА-анти-HCV-спектр-GM» результат отрицательный; С. з. — «серая зона».

**Таблица 2**  
**Core-антиген в группе образцов сыворотки крови с антителами к Core-антигену ВГС с высоким коэффициентом позитивности (КП АТ-Core  $\geq$  20). Выделены пробы с обнаруженным Core-антигеном**

№ п/п	Номер пробы	Пол	Возраст, полных лет	Скрининг, *КП	Подтверждение наличия АТ-тел в ИФТС «спектр», КП				Определение АГ-Core, КП
				АТ-ВГС	АТ-Core	АТ-NS3	АТ-NS4	АТ-NS5	
**1	2	М	0	15,04	17,45	13,83	2,7	Отрицательный	1,54
2	226	Ж	46	13,45	19,08	16,91	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
***3	333	М	34	13,0	24,66	7,75	1,06	13,04	32,85
4	336	М	40	14,95	24,66	18,54	3,15	14,5	Отрицательный
***5	371	М	35	14,87	18,04	12,16	5,41	Отрицательный	11,02
***6	640	М	81	16,66	18,95	17,62	1,79	7,29	14,83
Среднее				14,66	20,48	14,47	2,82	11,61	15,06
Стандартное отклонение				1,30	3,30	4,08	1,66	3,81	13,11

Примечания: \*КП — коэффициент позитивности; \*\* — новорожденный ребенок; \*\*\* — потребители наркотических препаратов.

**Таблица 3**  
**Core-антиген в группе образцов сыворотки крови с антителами только к Core-антигену, которые обнаруживаются с коэффициентом позитивности (КП) АТ-Core > 6,5**

№ п/п	№ в исследовании	Пол	Возраст, полных лет	КП АТ-Core	КП АТ-НС	АГ-Core КП
1	3787	Ж	31	9,16	Отрицательный	Отрицательный
2	2107	Ж	52	7,08	Отрицательный	Отрицательный
3	875	М	53	8,75	Отрицательный	1,03
4	1680	Ж	53	9,54	Отрицательный	Отрицательный
5	7091	М	27	5,62	Отрицательный	1,37
6	3633	М	64	9,91	Отрицательный	1,37
7	3123	Ж	32	6,95	Отрицательный	Отрицательный
Среднее				8,14 ср.	–	1,26
Стандартное отклонение				1,60	–	0,20

находились в так называемой серой зоне (примеры в табл. 1, пробы № 1, 2, 4, 5, 6, 7). Кроме того, противоречия обнаруживались при сравнении результатов исследования анти-Core и результатов, полученных при комплексном определении Core-антигена и анти-ВГС. Так, в пробе п/п № 8 анти-Core не были обнаружены, а в ИФТС «Core АГ/АТ-ВГС» результат исследования был положительным (так же, как в скрининге с общим определением антител к ВГС). С другой стороны, в ряде проб анти-Core в подтверждающих ИФТС обнаруживались, а результат исследования в ИФТС «ВГС АГ/АТ-ИФА-Бест» был отрицательным (пробы п/п № 9, 10).

При выявлении РНК ВГС высокоположительные, низкоположительные и отрицательные контроли имели соответствующую интенсивность флуоресценции. При исследовании 41 образца с низкопозитивными (КП АТ-Core от 1,01 до 1,91) и про-

тиворечивыми результатами исследования анти-РНК ВГС не обнаружена ни в одном образце.

## 2. Определение РНК ВГС в пробах сыворотки крови с Core АГ.

2А. Для выявления АГ-Core в пробах сыворотки крови с разной степенью позитивности по антителам к ВГС были сформированы три группы.

В группу № 1 высокого позитивного контроля (табл. 1) были отобраны шесть проб с высоким КП АТ-ВГС в скрининге (средняя величина КП АТ-ВГС 14,66; 95% ДИ: 12,06–17,26). В подтверждающих ИФТС в пробах данной группы обнаружены АТ-Core (среднее КП = 20,48; 95% ДИ: 13,88–27,08). Во всех пробах группы № 1 были обнаружены АТ-NS3 (среднее КП = 14,47; 95% ДИ: от 6,37–22,63), в пяти пробах — АТ-NS4 (среднее КП = 2,82;  $\sigma$  = 1,66), в трех — АТ-NS5 со средним КП = 11,61 (95% ДИ:

3,99–19,23). В четырех пробах из шести (66,6%) был обнаружен АГ-Core, из них три пробы были получены от потребителей наркотических препаратов, а одна — от новорожденного ребенка матери, больной гепатитом С. В пробах сыворотки крови потребителей наркотических препаратов средний КП АГ-Core = 19,57;  $\sigma$  = 11,66; у новорожденного ребенка КП АГ-Core составлял 1,54.

В группу № 2 (табл. 2) отобраны семь проб со средним КП в скрининге 2,90 (95% ДИ КП: 1,6–4,2). В подтверждающей ИФТС в пробах группы № 2 обнаруживались только АТ-Core, средняя величина КП АТ-Core = 8,14; (95% ДИ: 4,94–11,34). АГ-Core в группе № 2 обнаруживался в трех из семи проб (42,86%); КП АГ-Core был низким: от 1,03 (у одной пробы), до 1,37 (у двух проб).

В группу № 3 (табл. 4) отобраны 68 проб с низким КП АТ-ВГС в скрининге (среднее КП АТ-ВГС = 2,54;  $\sigma$  = 1,36;

**Таблица 4**  
**Core-антиген в группе образцов сыворотки крови с антителами только к Core-антигену с низким коэффициентом позитивности в трех подтверждающих тест-системах**

№ п/п	№ в постановке	Пол	Возраст, полных лет	Скрининг АТ-ВГС, КП	ВБ подтверждающий тест, КП		Спектр ВБ, КП	ДС подтверждающий тест, КП		*АГ- Core, КП
					АТ- Core	АТ- NS	АТ- Core	АТ- Core	АТ- NS	
1	3736	М	30	1,8	С. з.**	Отрицательный	**сз	Не исследована	Не исследована	1,04
2	1900	Ж	76	1,8	1,29	Отрицательный	1,04	Не исследована	Не исследована	1,22
3	***2690	Ж	30	1,22	2,13	Отрицательный	0,31	Не исследована	Не исследована	1,06
4	1109	М	80	2,03	1,5	1,8	Не исследована	Отрицательный	Отрицательный	1,09
5	878	Ж	14	3,46	2,8	Отрицательный	Не исследована	Отрицательный	Отрицательный	1,54
6	869	М	2	2,57	1,25	Отрицательный	Не исследована	Отрицательный	Отрицательный	2,83
Среднее				2,15	1,93	Среднее				1,13
Стандартное отклонение				0,78	0,68	Стандартное отклонение				0,13

Примечание: \* — из 68 проб с КП АТ-Core ≤ 6,5 АГ-Core был обнаружен в шести пробах; \*\* — С. з. (серая зона) ниже ОП кр. на 10%; \*\*\* — беременная женщина.

**Таблица 5**  
**Вирусная нагрузка и генотип вируса гепатита С в пробах, содержащих АГ-Core**

Группа, № п/п	КП АТ- Core в группе	№ в постановке на АТ- Core	Результат выявления РНК ВГС	Вирусная нагрузка, МЕ/мл	Генотип ВГС
1	≥ 15	2	Не обнаружена	–	–
		333	Обнаружена	1,23 × 10 <sup>7</sup>	3а
		371	Обнаружена	2,65 × 10 <sup>7</sup>	3а
		640	Обнаружена	3,86 × 10 <sup>5</sup>	1b
3	≤ 6,5	869	Не обнаружена	–	–
		1900	Не обнаружена	–	–
		2690	Не обнаружена	–	–
		1109	Не обнаружена	–	–
		878	Обнаружена	< 300	Не определен

минимальное значение 1,00; максимальное значение 6,5). В подтверждающей ИФТС «Бест-анти-ВГС-подтверждающий тест» средняя величина КП АТ-Core = 1,59,  $\sigma = 0,87$ ; минимальное позитивное значение 1,04, максимальное — 6,25. В ИФТС «спектр» того же производителя средняя величина КП АТ-Core составляла 1,98, стандартное отклонение 1,32; минимальное значение было равно 1,04, максимальное — 3,85. Кроме того, на наличие АГ-Core были исследованы пробы с результатом определения АТ-Core, находящимся в так называемой серой зоне (ниже ОП кр. на 15%). Была использована также подтверждающая ИФТС другого производителя (ДС). Между результатами, полученными при исследовании девяти низкопозитивных проб, в разных системах были обнаружены противоречия. При исследовании 68 проб АГ-Core обнаружен

в шести пробах (8,82%), в том числе в трех с противоречивыми результатами исследования в двух подтверждающих ИФТС (табл. 4).

При сравнении частоты выявления АГ-Core в трех группах было обнаружено различие между первой и третьей группами ( $p < 0,005$ ).

2Б. Выявление РНК ВГС в пробах сыворотки крови с Core-АГ ВГС.

Для исследования возможности выявления РНК ВГС в пробах сыворотки крови, содержащих АГ-Core, пробы были отобраны из всех трех групп, различающихся по величине КП АТ-Core (табл. 5). В первой группе проб (с высокими КП АТ-Core и АТ-NS) из четырех проб сыворотки крови, содержащих АГ-Core с высокими КП, в трех пробах, принадлежащих потребителям внутривенных наркотиков, была обнаружена также РНК. При определении генотипа ВГС в двух

пробах была обнаружена РНК вируса генотипа 3а, в одной пробе — генотипа 1b. В одной пробе из группы № 1, принадлежавшей новорожденному ребенку, РНК ВГС отсутствовала, несмотря на наличие Core-АГ, обнаруженного с низким КП.

Во второй группе проб обнаруживались АТ-Core с КП более 6,5. В трех пробах из этой группы обнаружен АГ-Core с низким КП (менее 1,5); РНК ВГС не была обнаружена ни в одной из проб этой группы.

В третьей группе на наличие РНК ВГС исследованы пробы с низкими КП АТ-Core, в которых обнаружен также АГ-Core. Из шести проб с АГ-Core на наличие РНК исследовали пять. В одной из этих проб с противоречивыми результатами тестирования АТ-Core в разных подтверждающих ИФТС обнаруживался не только АГ-Core, но и РНК ВГС (табл. 5).

## Обсуждение

Результат исследования антител к ВГС при обнаружении только АТ-Core в большинстве подтверждающих диагностических систем интерпретируется как положительный. Определение наличия АТ-Core при диагностической биопсии способствует выявлению так называемой серологически молчащей ВГС-инфекции [6]. В то же время, как показано ранее [7, 8] и в представленной работе, при низких значениях КП АТ-Core в разных диагностических системах возможны неопределенные и противоречивые результаты исследования, которые могут быть обусловлены особенностями антител (например, низкой авидностью), конструктивными особенностями диагностических систем и наличием неспецифической реактивности. Выявление РНК ВГС, которое необходимо в РФ для постановки диагноза ГС [1], в случаях низкой позитивности пробы по АТ-ВГС в ряде случаев представляет значительные трудности [9]. Из других прямых маркеров ГС, а именно структурных и неструктурных антигенов вируса, в сыворотке крови возможно выявление только АГ-Core [10]. В рутинной лабораторной практике имеются немногочисленные сообщения относительно значимости выявления АГ-Core. Так, при сравнении положительных результатов исследования в ИФТС с общим определением АТ-ВГС и АГ-Core (Monolisa HCV Ag-Ab Ultra) с отрицательными результатами в ИФТС для определения только АТ-ВГС и при отсутствии в данных пробах РНК ВГС был сделан вывод о том, что наблюдаемая в ИФТС Monolisa HCV Ag-Ab Ultra реактивность была неспецифической [11].

В нашей работе на наличие РНК ВГС была исследована 41 проба с низкопозитивными (от 1,01 до 1,91) и противоречивыми результатами исследования АТ-Core; РНК ВГС не была обнаружена ни в одной пробе. Предварительно все пробы были протестированы в ИФТС с совместным определением АГ-Core и АТ-ВГС. С нашей точки зрения, использование ИФТС с совместным выявлением АГ-

Core и АТ-ВГС не способствует выяснению природы реактивности пробы (истинной, связанной с антителами, или неспецифической).

Из полученных нами результатов следует, что выявление РНК ВГС целесообразно проводить в позитивных на наличие АТ-Core и АГ-Core пробах. В нашей работе, как и следовало ожидать, в группе потребителей внутривенных наркотиков с высокими КП АТ-Core большинство проб содержали АГ-Core ВГС и РНК ВГС. Как правило, РНК ВГС не обнаруживалась в пробах с низкими КП АТ-Core ВГС. В то же время нам удалось среди проб с низкими КП АТ-Core выделить те, в которых возможно ожидать выявление РНК ВГС, а именно пробы с наличием небольшого количества АГ-Core. Существенно, что АГ-Core возможно выявить даже в пробах с противоречивыми результатами исследования АТ-ВГС и в случаях, когда результат определения АТ-ВГС находится в так называемой серой зоне, например, в пробе № 3736 из табл. 4. По-видимому, выявление АГ-Core, особенно в малых концентрациях, как единственного маркера ВГС-инфекции, не следует считать надежным критерием наличия заболевания, но пациенты с этим единственным маркером должны быть под динамическим лабораторным и клиническим наблюдением. Сыворотку крови пациентов, в которой обнаружен АГ-Core, целесообразно исследовать на наличие РНК ВГС.

## Выводы

1. Совместное исследование АГ-Core и АТ-ВГС не способствует уточнению лабораторной диагностики ВГС-инфекции по сравнению со скрининговой ИФТС, предназначенной для выявления только АТ-ВГС.
2. АГ-Core в группе с высокими КП АТ-Core ( $\geq 15$ ) обнаруживается в семь раз чаще, чем в пробах с низкими ( $\leq 6,5$ ) КП АТ-Core (соответственно в 66,6 и 8,82%;  $p < 0,005$ ).
3. РНК ВГС в концентрации более  $3,8 \times 10^5$  МЕ/мл обнаруживается в 75 % проб с высокими КП АГ-Core ( $\geq 11$ ) и АТ-Core ( $\geq 15$ ).

4. РНК ВГС в низкой концентрации ( $< 300$  МЕ/мл) обнаруживается в 20% проб с низкими КП АГ-Core ( $< 3$ ) и низкими КП АТ-Core ( $\leq 6,5$ ).

## Список литературы

1. СП 3.1.3112-13 «Профилактика вирусного гепатита С».
2. Reddy A. K., Dakshinamurthy K. V., Lakshmi V. Utility of HCV core antigen ELISA in the screening for hepatitis C virus infection in patients on hemodialysis. *Indian J Med Microbiol.* 2006 Jan; 24 (1): 55-7.
3. Кудрявцева Е. Н., Корабельникова М. И., Красавченко К. С., Ястребова О. Н., Туманова О. Ю., Лебедева Е. И., Кузина Л. Е., Кицак В. Я., Калашникова А. С., Семеновко Т. А., Кузин С. Н. О диагностической значимости определения CORE-антигена вируса гепатита С // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2013. — Том 6, № 73. — С. 32-36.
4. Barril G., Quiroga J. A., Arenas M. D., Espinosa M., García-Fernández N., Cigarrán S., Herrero J. A., del Peso G., Caro P., García-Agudo R., Amézquita Y., Blanco A., Martínez-Rubio P., Alcázar J. M., González-Parra E., Martín-Gómez A., Castillo I., Bartolomé J., Carreño V. Impact of isolated hepatitis C virus (HCV) core-specific antibody detection and viral RNA amplification among HCV-seronegative dialysis patients at risk for infection // *J. Clin. Microbiol.* — 2014. — 52 (8): 3053-6. doi: 10.1128/JCM.01339-14.
5. О применении в практике здравоохранения: приказ МЗ РФ № 322 от 21.10.2002 г. 2. Приказ МЗ РФ № 322 от 21.10.2002 г. «О применении в практике здравоохранения иммуноферментных тест-систем для выявления поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-ВГС) в сыворотке крови человека». Ссылка активна на 15.02.2018. <http://base.garant.ru/6963112>.
6. Quiroga JA, Castillo I, Llorente S, Bartolomé J, Barril G, Carreño V. Identification of serologically silent occult hepatitis C virus infection by detecting immunoglobulin G antibody to a dominant HCV core peptide epitope // *J. Hepatol.* 2009 Feb; 50 (2): 256-63. doi: 10.1016.
7. León P1, López JA, Elola C, Lee SR, Calmann M, Echevarría JM. Use of overlapping synthetic peptides to characterize samples from blood donors with indeterminate results to hepatitis C virus core antigen. *Vox Sang.* 1998; 75 (1): 32-6.
8. Потапова А. А. Диагностическая значимость и интерпретация неоднозначных результатов исследования серологических маркеров вирусного гепатита С: дисс. ... д-ра биол. наук / М., 2015. — 275 с.
9. Pereira F. M., Zarife M. A. S., Reis E. A. G., Reis M. G. Indeterminate RIBA results were associated with the absence of hepatitis C virus RNA (HCV-RNA) in blood donors. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47 (1): 12-17.
10. Масалова О. В. Вирусный гепатит С: новые подходы к изучению патогенеза и разработка средств диагностики и профилактики: дисс. ... д-ра биол. наук / М., 2011. — 336 с.
11. Yagci S., Padalko E. Comparison of Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA with two anti-HCV assays for the detection of HCV infection in hospital setting // *Curr. Microbiol.* — 2012. — V. 64, № 2. — P. 148-151.



# Ассоциация полиморфизма BsmI-гена рецептора витамина D (VDR) с воспалительными заболеваниями кишечника

**Д. А. Кузнецова**, врач клинической лабораторной диагностики НМЦ по молекулярной медицине<sup>1,2</sup>  
**А. С. Разумов**, д.м.н., проф. кафедры патологической физиологии, медицинской и клинической биохимии<sup>1</sup>

**В. Л. Эмануэль**, д.м.н., проф. акад. РМА, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины<sup>2</sup>

**Г. В. Вавин**, к.м.н., доцент кафедры патологической физиологии, медицинской и клинической биохимии<sup>1</sup>, зам. гл. врача по лабораторной диагностике<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Кемерово

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>3</sup>ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С. В. Беляева» Минздрава России, г. Кемерово

## Association of polymorphism BsmI of vitamin D receptor gene (VDR) with inflammatory bowel diseases

D. A. Kuznetsova, A. S. Razumov, V. L. Emanuel, G. V. Vavin

Kemerovo State Medical University, Kemerovo; First Saint Petersburg State Medical University n.a. I. P. Pavlov, Saint Petersburg; Kemerovo Region Clinical Hospital n.a. Belyaev, Kemerovo; Russia

### Резюме

Среди многочисленных генетических факторов болезни Крона (БК) и язвенного колита (ЯК) все больше уделяется внимания полиморфизмам гена рецептора витамина D (VDR), ассоциированным с нарушениями врожденного и адаптивного иммунитета, а также барьерной функцией кишечного эпителия. Цель: оценить распространенность, клинико-диагностическую и прогностическую значимость полиморфизма BsmI-гена VDR у пациентов с БК и ЯК, проживающих на территории Кемеровской области РФ. Материал и методы. В исследование включены 60 пациентов с БК, 76 пациентов с ЯК и 85 человек контрольной группы. Генотипирование проводили методом аллель-специфической ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Результаты. Установлено, что частота встречаемости аллеля В полиморфизма Bsm-I гена VDR выше среди пациентов с ЯК по сравнению с пациентами с БК и контрольной группой: 44, 38 и 26,5% соответственно ( $p = 0,02$ ), что в два раза увеличивало риск развития ЯК ( $OR = 2,2$ ; 95% CI: 1,2–4,1). При этом носительство генотипа b/b достоверно уменьшало риск развития ЯК ( $OR = 0,4$ ; 95% CI: 0,2–0,7). Кроме того, у носителей аллеля В клиническая реализация ВЗК развивалась достоверно позже, чем у пациентов с генотипом b/b: у пациентов с БК — 31 vs. 28,5 года, у пациентов с ЯК — 43 vs. 28,5 года соответственно. Показано, что носительство аллеля В в 5,5 раза увеличивало риск развития колита при БК ( $p = 0,03$ ;  $OR = 5,5$ ; CI: 1,1–27,4). Заключение. Носительство аллеля В полиморфизма Bsm I гена VDR является предиктором повышенного риска развития ЯК и колита при БК, а также увеличения возраста постановки диагноза БК и ЯК. Генотип b/b обладает протективным эффектом в развитии ЯК у представителей Кемеровской области РФ.

Ключевые слова: VDR, болезнь Крона, язвенный колит.

### Summary

Among the numerous genetic factors of Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), polymorphisms of the vitamin D receptor gene (VDR) associated with disorders of congenital and adaptive immunity, as well as the barrier function of the intestinal epithelium, are increasingly being addressed. Aim: to assess the prevalence, clinical, diagnostic and prognostic significance of BsmI polymorphism of the VDR gene in patients with CD and UC among the residents of the Kemerovo region of the Russian Federation. Material and methods. The study included 60 patients with CD, 76 patients with UC and 85 controls. Genotyping was performed by allele-specific PCR with electrophoretic detection of amplification products. Results. We have found that the frequency of the allele B polymorphism of the VDR BsmI gene was higher among patients with UC than in patients with CD and controls (44%, 38% and 26%, respectively,  $p = 0.02$ ), which is two times increased the risk of developing UC ( $OR = 2.2$ ; 95% CI: 1.2–4.1). In the case of carriers of the b/b genotype the risk of UC decreased ( $OR = 0.4$ ; 95% CI: 0.2–0.7). It has been shown that in carriers of allele B, the clinical implementation of CD and UC develops later than in patients with the b/b genotype (31.0 vs. 28.5 years and 43.0 vs. 28.5 years, respectively;  $p = 0.04$ ). It was shown that the carriage of allele B by 5.5 times increased the risk of colitis in CD ( $p = 0.03$ ). Conclusions. The B allele of the BsmI polymorphism of the VDR gene is a predictor of elevated risk of UC and colitis in CD with an increase in the age of diagnoses. Genotype b/b has a protective effect in the development of UC among the residents of the Kemerovo region of the Russian Federation.

Key words: VDR-gene, Crohn's disease, ulcerative colitis.

Роль генетических факторов в развитии практически всех мультифакторных заболеваний в настоящее время не подлежит сомнению [6]. К числу таких патологий относятся воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), а именно — болезнь

Крона (БК) и язвенный колит (ЯК), любой вариант патогенеза которых клинически реализуется только при наличии определенных сочетаний генетических и средовых факторов. При этом популяционные и средовые факторы могут определять

особенности клинической реализации нуклеотидных полиморфизмов генов, соответственно их различную клинико-диагностическую и прогностическую значимость для представителей различных стран и регионов [1].

Таблица 1  
Клиническая характеристика пациентов с болезнью Крона и язвенным колитом

Показатель, n (%)	БК (N = 60)	ЯК (N = 76)
	n (%)	n (%)
Локализация	Терминальный илеит (L1)	–
	Колит (L2)	–
	Илеоколит (L3)	–
	Верхние отделы ЖКТ (L4)	–
	L2 + L4	–
	Проктит (E1)	2 (3)
	Левостороннее поражение (E2)	43 (57)
	Тотальное поражение (E3)	31 (40)
Фенотип / клиническое течение	Неосложненный*	71 (93)
	Осложненный**	5 (7)
Хирургическое лечение	Да	6 (8)

Примечание: \* — неосложненный фенотип БК представлен пациентами с люминальными формами (B1), \*\* — осложненный — объединенной группой пациентов с пенетрирующими и стенозирующими формами БК (B2 + B3).

Таблица 2  
Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфизма *BsmI* гена *VDR*

<i>BsmI</i>		БК (N = 60)	ЯК (N = 76)	Контроль (N = 85)	БК vs. контроль	ЯК vs. контроль	БК vs. ЯК
		n (%)	n (%)	n (%)	p		
Генотип	bb	24 (40)	25 (33)	46 (54)	0,09	0,007	0,4
	Bb	26 (43)	35 (46)	33 (39)	0,60	0,300	0,7
	BB	10 (17)	16 (21)	6 (7)	0,10	0,020	0,5
Алель	b	74 (62)	85 (56)	125 (73,5)	0,60	0,020	0,1
	B	36 (38)	51 (44)	39 (26,5)			

Известно более 1 500 нуклеотидных полиморфизмов генов, которые прямо или косвенно связаны с различными звеньями патогенеза ВЗК [3]. При этом в последнее время все больше исследователей уделяют внимание витамину D, а именно полиморфизмам гена рецептора витамина D (*VDR*) [7]. Среди многочисленных полиморфных вариантов гена *VDR* (*Fok I*, *Taq I*, *Ara I*, *Cdx 2*, *poly [A]*, *Bg II*) полиморфизм *BsmI* (*rs1544410*) ассоциирован с недостаточным уровнем стабильности транскрипции гена *VDR* и его посттранскрипционных модификаций, в результате чего снижается эффективность взаимодействия рецепторов витамина D с витамином D [2]. Это, в свою очередь, приводит к снижению барьерной функции кишечника, проникновению бактериальных па-

тогенов в стенку кишки, формированию патологического иммунного ответа и запуску воспалительного процесса, и, в конечном итоге, развитию ВЗК [10].

При этом исследования, посвященные оценке распространенности, клинико-диагностической и прогностической значимости полиморфизма *BsmI* гена *VDR* при БК и ЯК среди различных стран носят единичный характер, а в Российской Федерации отсутствуют, что препятствует однозначному представлению о его роли в развитии ВЗК.

**Цель:** оценить частоту встречаемости, клинико-диагностическую и прогностическую значимость полиморфизма *BsmI* гена *VDR* у пациентов с БК и ЯК, проживающих на территории Кемеровской области РФ.

## Материалы и методы

В исследование включены пациенты (n = 221), которые были госпитализированы в ГАУЗ КО «Кемеровская областная клиническая больница имени С. В. Беляева» в период 2014–2016 годов. Из них основную группу составили 60 пациентов с болезнью Крона (БК) и 77 пациентов с язвенным колитом (ЯК), и контрольную группу составили 90 пациентов различных отделений этой больницы, у которых на основании анамнеза и клинико-лабораторных исследований полностью исключалась патология желудочно-кишечного тракта. Все пациенты основной и контрольной групп на момент обследования проживали на территории Кемеровской области.

Выявление полиморфных аллелей проводилось методом аллель-специ-

Возраст постановки диагноза, лет	Носители аллеля b, n = 24			Носители аллеля B, n = 36			p
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	
Все	32,0	28,0	42,5	30,5	24,0	45,5	0,60
Женщины	32,0	28,0	40,0	43,0	30,0	53,5	0,10
Мужчины	28,5	24,4	42,5	31,0	25,0	44,0	0,04

ифической ПЦР (амплификатор BIORAD C1000, США) с использованием наборов «SNP-экспресс» (НПФ «ЛИТЕХ», Россия) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Детекция продуктов амплификации осуществлялась методом горизонтального электрофореза с последующей визуализацией в УФ-трансиллюминаторе.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0 (Install Shield Software Corporation, 1984–2001, США). Количественные переменные представлялись в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентилей [Q25; Q75]. Для сравнения количественных независимых переменных применялись критерии Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса. Для оценки качественных признаков вычисляли долю (%) признака, значимость различий между которыми оценивали при помощи  $\chi^2$  Пирсона и точного критерия Фишера. При наличии статистически значимых различий между сравниваемыми группами ( $p < 0,05$ ), вычисляли коэффициент соотношения шансов (OR) с 95-процентным доверительным интервалом (CI).

## Результаты

Основная и контрольная группы были сопоставимы по полу и возрасту: пациенты с БК были представлены 28 (47%) мужчинами и 32 (53%) женщинами, с ЯК — 35 (46%) и 41 (54%) соответственно, контрольной группы — 41 (48%) и 44 (52%) соответственно. Медиана возраста у мужчин и женщин с БК составила 33 [27; 44] и 40 [33; 53] лет соответственно, с ЯК — одинаково составила 45 [31; 55] лет, в контрольной группе — 40 [33; 49] и 35 [26; 43] лет соответственно. Медиана возраста постановки

диагноза БК у мужчин и женщин составила 27 [22; 41] и 37 [29; 47] лет соответственно, ЯК — 34 [27; 48] и 39,5 [26; 52] года соответственно. Распределение пациентов основной группы с учетом локализации поражения, фенотипа заболевания и проведения оперативного вмешательства представлено в табл. 1.

Установлено, что частота встречаемости аллеля В полиморфизма *BsmI* гена *VDR* у пациентов с БК была в 1,5 раза выше по сравнению с контрольной группой (38,0 vs. 26,5% соответственно,  $p = 0,6$ ) и достоверно значимо не отличалась от таковой пациентов с ЯК — 44% (табл. 2), тогда как у пациентов с ЯК частота данного аллеля была в 1,7 раза достоверно выше по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,007$ ).

При этом частота встречаемости генотипа ВВ полиморфизма *BsmI* у пациентов с БК была в 2,3 раза чаще по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,1$ ) и в 1,2 раза реже по сравнению с пациентами с ЯК ( $p = 0,5$ ). У пациентов с ЯК генотип ВВ встречался в три раза достоверно чаще по сравнению с контрольной группой — 21 vs. 7% соответственно ( $p = 0,02$ ). Носительство аллеля В более чем в два раза повышало риск развития ЯК (OR = 2,2; 95% CI: 1,2–4,1), тогда как носительство генотипа ВВ увеличивало риск развития ЯК до 3,5 раза (OR = 3,5; 95% CI: 1,4–8,6). Вместе с тем показано, что носительство аллеля В полиморфизма *BsmI* сколько-нибудь значимо не ассоциировано с увеличением риска развития БК (OR = 0,8; 95% CI: 0,4–1,4).

Частота встречаемости генотипа bb у пациентов с БК была в 1,3 раза ниже по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,09$ ) и не отличалась от таковой пациентов с ЯК, тогда как

у пациентов с ЯК генотип bb встречался в 1,6 раза достоверно ниже по сравнению с контрольной группой — 33 и 54% соответственно (OR = 0,4; 95% CI: 0,2–0,7;  $p = 0,02$ ).

Показано, что носительство аллеля В полиморфизма *BsmI* гена *VDR* было ассоциировано с возрастными особенностями фенотипической реализации БК: мужчины-носители имели более поздний возраст постановки диагноза БК по сравнению с мужчинами, не имеющими аллеля В — 31 и 28,5 года соответственно ( $p = 0,04$ ), тогда как у женщин — 43 и 32 года соответственно ( $p = 0,1$ ) (табл. 3).

Установлено, что носительство аллеля В полиморфизма *BsmI* ассоциировано с возрастными особенностями фенотипической реализации ЯК, особенно у мужчин, а именно с более поздним возрастом постановки диагноза ЯК по сравнению с мужчинами, не имеющими данного аллеля — 43,0 и 28,5 года соответственно ( $p = 0,04$ ), тогда как у женщин эта ассоциация отсутствовала (табл. 4).

Показано, что носительство аллеля В полиморфизма *BsmI* ассоциировано с особенностями клинического течения БК, а именно с локализацией БК в виде колита (L2), что в 5,5 раза увеличивало риск развития данной локализации БК (OR = 5,5; CI: 1,1–27,4).

Достоверно значимые различия между носительством аллеля В полиморфизма *BsmI* гена *VDR* и необходимостью проведения оперативного вмешательства у пациентов с БК отсутствовали.

Носительство аллеля В полиморфизма *BsmI* гена *VDR* не показало достоверно значимых ассоциаций с особенностями клинического течения и необходимостью проведения оперативного вмешательства у пациентов с ЯК.

Таблица 4

Возрастные особенности фенотипической реализации полиморфизма *BsmI* гена *VDR* при язвенном колите

Возраст постановки диагноза, лет	Носители аллеля b, n = 25			Носители аллеля B, n = 51			p
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	
Все	31	25	40	40	29	54	0,047
Женщины	32	28	40	31	25	44	0,300
Мужчины	28,5	24,5	42,5	43	30	53,5	0,040

## Обсуждение

Совокупность полученных результатов клинико-диагностической и прогностической значимости полиморфизма *BsmI* гена *VDR* при БК и ЯК у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области, позволяет заключить, что аллель В ассоциирован с риском развития и более поздней постановкой диагноза ЯК, тогда как генотип bb — с возможным протективным эффектом в развитии данной патологии. Кроме того, носительство аллеля В ассоциировано с локализацией БК в виде колита (L2) и более поздней постановкой диагноза БК. Из этого следует, что полиморфизм *BsmI* гена *VDR* обладает клинико-патогенетической значимостью при ВЗК, при этом популяционные особенности других генетических и индивидуально-средовых факторов, скорее всего, определяют особенности клинической реализации данного полиморфизма при БК и ЯК в данном регионе Российской Федерации. Это, в свою очередь, подтверждается тем, что диагностическая и прогностическая значимость аллеля В полиморфизма *BsmI* гена *VDR* при БК и ЯК у пациентов, проживающих на территории Кемеровской области, существенно отличается от Ирландии и Ирана [5, 8], где носительство данного аллеля не ассоциировано с риском развития и особенностями клинического течения БК и ЯК, тогда как совпадают с таковыми Китая и евреев-ашкенази [4, 9]. Отсюда следует, что наряду с особенностями распространенности полиморфизма *BsmI* гена *VDR* в этих странах формируется определенный географический профиль распространенности, клинико-диагностической и прогностической значимости данного по-

лиморфизма при развитии БК и ЯК. При этом чем выше частота встречаемости аллеля В полиморфизма *BsmI* (Иран — 46,3% и европейские страны — 41,0%), тем менее значимы его ассоциации с риском развития и особенностями клинического течения БК и ЯК, тогда как у представителей Китая, Кемеровской области РФ и евреев-ашкенази при меньшей частоте встречаемости (18,7; 26,5 и 38,4% соответственно) определяется существенная диагностическая и прогностическая значимость аллеля В полиморфизма *BsmI* гена *VDR* при развитии БК и ЯК.

Таким образом, полиморфизм *BsmI* гена *VDR* в некоторых странах и регионах, включая Кемеровскую область, обладает диагностической и прогностической значимостью для оценки риска развития и особенностей клинического течения ЯК и БК, что делает необходимым его внесение в список генов-кандидатов, ассоциированных с развитием ВЗК в данном регионе РФ.

Полученные результаты исследования являются предпосылкой создания международных генетических баз данных о популяционных особенностях распространенности, клинико-диагностической и прогностической значимости полиморфизмов, ассоциированных с ВЗК, что позволит повысить клиническую значимость и информативность молекулярно-генетических методов прогнозирования развития и диагностики БК и ЯК в различных странах и в отдельных регионах даже пределах одной страны.

## Список литературы

1. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 12(4): 205–217.

2. Ardesia M, Ferlazzo G, Fries W. Vitamin D and Inflammatory Bowel Disease. *Biomed Res Int*. 2015;2015: 470805.
3. Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A. Genetics of Inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol*. 2015; 21 (43): 12296–310.
4. Dresner-Pollak R, Ackerman Z, Eliakim R, et al. The *Bsm I* vitamin D receptor gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in Jewish Ashkenazi patients. *Genet Test*. 2004; 8 (4): 417–420.
5. Hughes DJ, McManus R, Neary P, et al. Common variation in the vitamin D receptor gene and risk of inflammatory bowel disease in an Irish case-control study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 23 (9): 807–812.
6. Loddo I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Front Immunol*. 2015; 6: 551–557.
7. Lu R, Wu S, Xia Y, et al. The Vitamin D Receptor, Inflammatory Bowel Diseases, and Colon Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2012; 8 (1): 57–65.
8. Naderi N, Farnood A, Habibi M, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms in Iranian patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23 (12): 1816–22.
9. Pei FH, Wang YJ, Gao SL, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and ulcerative colitis susceptibility in Han Chinese. *J DigDis*. 2011; 12 (2): 90–98.
10. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004; 338 (2): 143–156.



**alfresa**

**Photal**  
OTSUKA ELECTRONICS

## Комплекс **NS-Plus** для ранней диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта методом **iFOBT (FIT)**

Комплекс **iFOBT (FIT) NS-Plus** не имеет аналогов благодаря **HTSA**-уникальному одновременному количественному *in vitro* определению уровней гемоглобина и трансферрина в кале человека

Комплекс состоит из:

автоматического анализатора



контейнеров для сбора образца



Набор для сбора образцов по проведению двухдневного исследования содержит 2 индивидуальных контейнера, предназначенных для сбора и хранения образцов, а также для проведения исследований на анализаторе. Каждый контейнер имеет плоский корпус и прямоугольную форму, что упрощает его использование и маркировку. Благодаря специально разработанной конструкции контейнера внутрь попадает строго 10 мг образца. Особый состав буфера позволяет сохранить трансферрин и гемоглобин в стабильном состоянии не менее 7 дней.

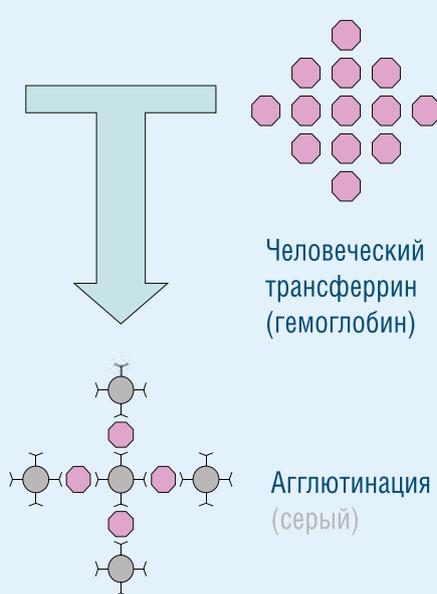
реагентов с содержанием коллоидного золота



Двухдневный метод

Принцип исследования основан на иммунологическом методе в комбинации со спектрометрией коллоидного золота, связанного с античеловеческими поликлональными антителами к трансферрину или гемоглобину, с трансферрином или гемоглобином в кале человека, соответственно.

Частицы коллоидного золота, связанные с античеловеческими поликлональными антителами к Tf (Hb)



Человеческий трансферрин (гемоглобин)

Агглютинация (серый)

**Количественный иммунохимический тест на трансферрин и гемоглобин в кале дает прогноз о вероятности, стадии (I, II) и локализации колоректального рака.**

**AGROS INT.**

АГРОС-ИНТЕРНЕЙШНЛ  
Россия, 196066, Санкт-Петербург,  
Московский проспект, 212

Телефон: +7 (812) 303-8244, факс: +7 (812) 303-8236  
E-mail: agros@agros-int.com, Internet: www.agros.net.ru



# Экспресс-анализ мочи в Вашем ЛПУ



Анализатор мочи

## URiSCAN-strip

**Информативность,  
точность, простота**

Узнать подробнее об анализаторе  
или оформить заказ можно:

Группа компаний



по телефонам: +7 (495) 734-91-31;  
8-800-333-91-31

по эл. почте [zakaz@unimedao.ru](mailto:zakaz@unimedao.ru)  
на сайте: [www.unimedao.ru](http://www.unimedao.ru)

# Количественное определение показателей состава и свойств мочи методом «сухой химии» (принципы метода, аналитические характеристики)

А. Н. Шибанов, к.ф.-м.н.<sup>1</sup>; О. А. Куриляк, к.б.н.<sup>1</sup>; А. В. Цыганова<sup>2</sup>; П. А. Стариков<sup>2</sup>; И. М. Елькина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЗАО «АО Юнимед», г. Москва

<sup>2</sup>ООО «Эйлитон», г. Москва

## **Quantitative determination of parameters of composition and properties of urine by method of «dry chemistry» (principles of method, analytical characteristics)**

A. N. Shibbanov, O. A. Kurilyak, A. V. Tsyganova, P. A. Starikov, I. M. Elkina

Unimed Co., Ailiton LLC., Moscow, Russia

### Резюме

Анализаторы мочи на тест-полосках давно уже стали надежными помощниками врача клинической лабораторной диагностики. Сегодня вряд ли можно найти лабораторию, не оснащенную приборами данного типа, которые позволяют в течение 1–2 минут провести одновременное исследование мочи по 10–13 показателям. Единственным недостатком этих приборов является полуколичественный результат анализа. Таким образом, в большом проценте случаев для уточнения результатов анализа приходится повторять исследование с использованием количественных методов. Сотрудники ООО «Эйлитон» задались вопросом: можно ли создать прибор, работающий по методу «сухой химии» и позволяющий при этом получать количественные результаты анализов. Задача оказалась решаемой. В настоящей статье приведены результаты исследования характеристик аналитической системы: анализатор мочи URICKAH-strip (ООО «Эйлитон», Россия) + тест-полоски Uriscan 11 strip (YD Diagnostics, Ю. Корея). На примере тестовой зоны «Белок» показано, что данная аналитическая система позволяет получать результаты, по точности соответствующие требованиям к количественным методам измерения концентрации белка в моче. Применение анализатора URICKAH-strip в практике лабораторий позволит существенно повысить точность и воспроизводимость результатов исследований, сохранив при этом простоту и удобство работы, характерную для всех экспресс-анализаторов мочи.

**Ключевые слова:** анализ мочи, экспресс-анализаторы мочи, полуколичественные результаты анализа, методы «сухой химии», количественные результаты анализа, концентрация белка в моче.

### Summary

Urine analyzers on test strips have long been reliable helpers of a clinical laboratory diagnosis doctor. Today, it is hardly possible to find a laboratory not equipped with such type of instruments, which allows conducting a simultaneous urine study for 10–13 indicators within 1–2 minutes. The only drawback of these devices is the semiquantitative result of the analysis. Thus, in a large percentage of cases, in order to refine the results of the analysis, it is necessary to repeat the study using quantitative methods. Employees of LLC Ailiton set and completed the task of creating a device that operates on the base of "dry chemistry" method and allows receiving quantitative results of analyzes. The research results on characteristics of the analytical system of urine analyzer URICKAH-strip (Ailiton LLC, Russia) + Uriscan 11 strip test strips (YD Diagnostics, South Korea) are presented in this article. On the example of the test zone "Protein", it is shown that this analytical system allows to obtain results corresponding to the quantitative methods requirements of measuring protein concentration in urine. The use of the URIScan-strip analyzer in the practice of laboratories will significantly improve the accuracy and reproducibility of urine tests, while maintaining the simplicity and convenience of operation characteristic of all urine express analyzers.

**Key words:** urine analysis, urine express analyzers, semiquantitative analysis results, dry chemistry methods, quantitative analysis results, protein concentration in urine.

### Введение

Клинический анализ мочи включает в себя определение ряда показателей молекулярного состава и физико-химических свойств мочи, а также анализ мочевого осадка. К показателям первой группы относят концентрацию белка (альбумина), глюкозы, кетонов, нитритов, билирубина, уробилиногена, pH, удельного веса. Они определяются преимущественно методами «сухой химии». Анализ осадка мочи включает определение эритроцитов, лейкоцитов, клеток эпителия, различных видов цилиндров, органических и неорганических кристаллов и микроорганизмов. Как

правило, он проводится методами микроскопии. В то же время для определения некоторых элементов мочевого осадка (эритроцитов и лейкоцитов) широко применяются и методы «сухой химии».

В основе метода «сухой химии» лежат цветные реакции, приводящие к изменению окраски тестовой зоны полоски. В зависимости от химических свойств определяемого показателя это либо обычные химические, либо ферментативные реакции, а в ряде случаев определяется собственная ферментативная активность аналита [1]. Например,

для определения концентрации гемоглобина (эритроцитов) используется химическая цветная реакция, основанная на пероксидазной активности гемоглобина. Лейкоциты выявляются в моче путем регистрации лейкоцитарной эстеразы.

Изменение окраски тестовых зон определяется либо визуально: сравнивается окраска тестовой зоны с цветовой шкалой на пенале, либо с помощью специализированного отражательного фотометра — анализатора мочи. Последний метод оценки реакции более предпочтителен, поскольку позволяет получить объ-

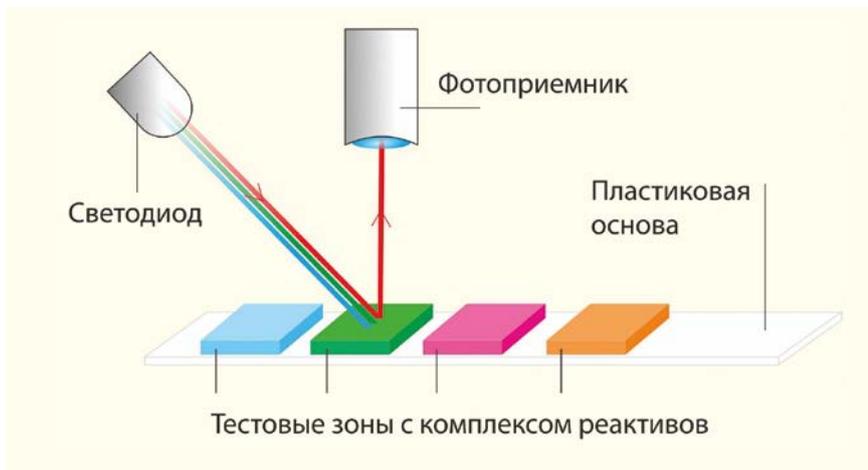


Рисунок 1. Принцип метода «сухой химии» с отражательной фотометрией.

ективный результат анализа. Визуальная оценка реакций существенно зависит как от характера освещения в помещении, так и от особенностей цветовосприятия лаборанта. К тому же, одновременное определение 10–13 показателей в большом количестве проб трудоемко.

Применяемые в современных лабораториях анализаторы мочи на основе отражательных фотометров бывают двух типов. В первом типе приборов реализован метод оценки

изменения цвета тестовых зон, аналогичный цветовому восприятию глаза человека. Тестовые зоны освещаются белым светом, содержащим все длины волн видимого диапазона спектра. Изменение окраски тестовой зоны в результате реакции с аналитом осуществляется сопоставлением сигналов от трех типов селективных фотоприемников в трех диапазонах длин волн: красном, зеленом и синем (RGB) (рис. 1). Точно так же устроено и цветовое зрение человека.

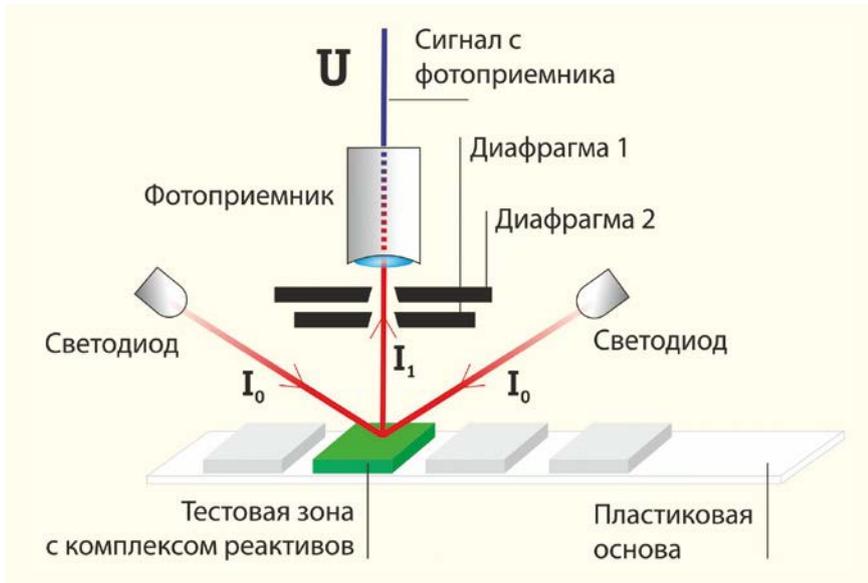


Рисунок 2. Схема фотометрической ячейки отражательного фотометра анализатора мочи URiSCAN-strip.

**Таблица 1**  
Диапазоны концентраций белка, соответствующие принятым для полуколичественных исследований условным обозначениям

Условное обозначение	Отрицательное значение –	Следы ±	Положительные значения			
			+	++	+++	++++
Диапазон концентраций белка в моче, г/л	< 0,1	0,1–0,2	0,21–0,6	0,7–2,0	2,1–6,0	> 6,0

На этом принципе основана работа подавляющего большинства анализаторов мочи, в том числе и таких широко известных в нашей стране приборов, как URiSCAN-Optima, URiSCAN-Pro (производство YD Diagnostics, Ю. Корея), URiSCAN-про (производство ООО «Эйлитон», Россия).

Во втором типе анализаторов применяется метод измерения коэффициента отражения тестовых зон на определенных длинах волн. Для каждой тестовой зоны подбирается оптимальная длина волны света, на которой изменение коэффициента отражения имеет наиболее выраженный характер зависимости от концентрации аналита в моче. В таких анализаторах тестовые зоны освещаются с помощью светодиодов, имеющих узкий спектр излучения, а отраженный сигнал регистрируется неселективным фотоприемником (рис. 2). Данный принцип реализован в анализаторе мочи URiSCAN-strip (ООО «Эйлитон», Россия).

Анализ мочи с использованием классических методов «сухой химии» выполняется на полуколичественном уровне. Полуколичественным результатом анализа является не конкретное число (с определенной погрешностью), а интервал значений, в котором находится измеряемая величина.

В качестве примера интервалов значений для полуколичественных результатов определения концентрации белка в моче в табл. 1 приведены диапазоны концентраций для аналитической системы: анализатор мочи URiSCAN-про + тест-полоски Uriscan 11 strip [5].

Полуколичественные методы анализа мочи вполне адекватно решают задачи скрининга [3, 6]. Однако они малопригодны для мониторинга течения заболевания, в том числе, в ходе проводимого лечения, поскольку, как видно из табл. 1, даже 2–3-кратное изменение концентрации белка в процессе динамического наблюдения пациента при исследовании тест-полосками может быть не выявлено [3]. Поэтому для целей мониторинга течения заболевания и оценки эффективности лечения чрезвычайно актуальны повышение точности и обеспечение высокой вос-

производимости результатов анализа, которые позволят надежно оценить динамику патологического процесса.

### Цель работы

С целью решения задачи повышения точности и воспроизводимости исследований специалистами компании «Эйлитон» был сконструирован уникальный анализатор мочи URiCKAH-strip, позволяющий с использованием тест-полосок Uriscan 11 strip получать результаты анализа мочи, удовлетворяющие требованиям, которые предъявляются к количественным методам исследования.

Для выявления и минимизации суммарной погрешности исследования был выполнен анализ погрешностей измерений с использованием аналитической системы: URiCKAH-strip + тест-полоски Uriscan 11 strip.

При проведении данной работы необходимо было найти связь результатов измерений с концентрацией аналитов, а также количественно оценить погрешности на каждом этапе.

### Анализ погрешностей измерений анализатора мочи

В аналитической системе: анализатор мочи URiCKAH-strip + тест-полоски Uriscan 11 strip (рис. 2) сигнал с фотоприемника  $U$  пропорционален интенсивности падающего на него отраженного света от аналитической зоны  $I_1$ , таким образом,  $U = F I_1$ . В свою очередь, интенсивность отраженного света  $I_1$  пропорциональна интенсивности падающего на аналитическую зону света от светодиодов  $I_0$  и коэффициенту отражения:  $I_1 = I_0(t K_{\text{отр}}(t, C))$ . Коэффициент отражения изменяется со временем, что обусловлено протекающими в аналитической зоне реакциями, и зависит от концентрации аналита ( $C$ ).

В конечном итоге получаем так называемую измерительную функцию аналитической системы:  $U = F I_0(t) K_{\text{отр}}(t, C)$ . Вариации измеряемого сигнала  $\delta U$  связаны с вариациями компонентов аналитической системы следующим образом:

$$\delta U = (\delta F) I_0 K_{\text{отр}} + (\delta I_0) F K_{\text{отр}} + (\delta K_{\text{отр}}) F I_0.$$

Здесь:  $\delta F$  — вариации коэффициента преобразования светового потока

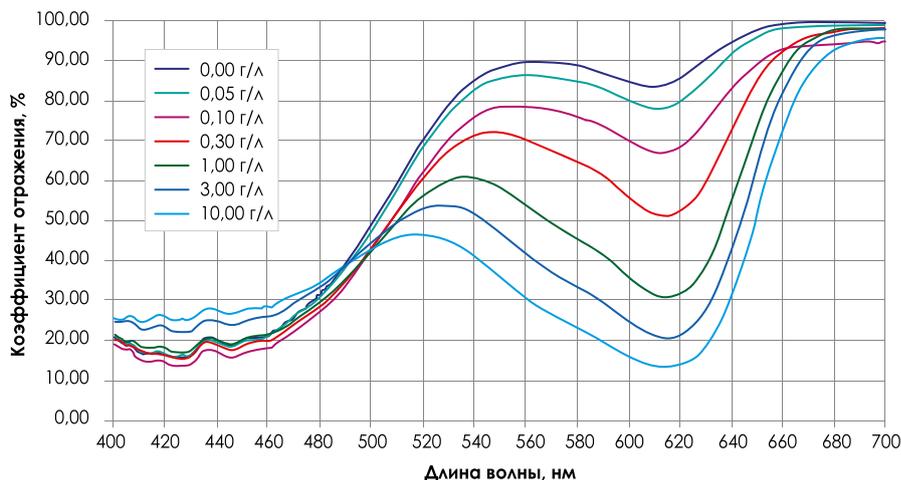


Рисунок 3. Спектры отражения аналитической зоны «Белок» при разных концентрациях белка в моче.

в электрический сигнал фотоприемника;  $\delta I_0$  — вариации интенсивности света от светодиодов;  $\delta K_{\text{отр}}$  — вариации коэффициента отражения аналитических зон тест-полоски. Первые два параметра являются характеристиками анализатора, а последний характеризует качество тест-полосок.

Для уменьшения вариаций ( $\delta F$ ) и ( $\delta I_0$ ) в созданном специалистами ООО «Эйлитон» анализаторе URiCKAH-strip была применена специальная конструкция фотометрической ячейки, изображенная на рис. 2. Принцип работы отражательного фотометра анализатора мочи URiCKAH-strip заключается в следующем: падающий на тестовую зону свет ( $I_0$ ) от двух одинаковых светодиодов диффузно отражается ( $I_1$ ), пройдя через систему диафрагм, попадает на фотоприемник, сигнал от которого ( $U$ ) регистрируется с помощью электронного блока анализатора. Использование пары светодиодов с одинаковой интенсивностью и спектром излучения для каждой тестовой зоны, а также системы диафрагм позволяет минимизировать влияние ( $\delta I_0$ ) и ( $\delta F$ ). Таким образом, в погрешность измерения аналита основной вклад вносят вариации коэффициента отражения аналитических зон тест-полоски ( $\delta K_{\text{отр}}$ ).

### Исследование аналитических характеристик измерения концентрации белка в моче

#### 1. Определение оптимальной длины волны светодиодов

Для выяснения наиболее оптимальной длины волны излучения светодиодов для тестовой зоны «Бе-

лок» были сняты спектры отражения тест-полосок во всем видимом диапазоне длин волн для разных концентраций аналита (рис. 3).

Изменения коэффициента отражения аналитической зоны «Белок» обусловлены протекающей в этой зоне реакцией образования комплекса «белок — бромфеноловый синий». Из приведенных спектров видно, что при разных концентрациях белка в моче наиболее значительные изменения коэффициента отражения наблюдаются в диапазоне 600–630 нм. Поэтому в анализаторе URiCKAH-strip для аналитической зоны «Белок» применяются светодиоды с длиной волны из указанного спектрального диапазона, а именно 605 нм. В то же время при определении белка в моче с использованием методов «сухой химии» следует учитывать тот факт, что бромфеноловый синий высоко чувствителен к альбуминовой фракции и намного менее чувствителен к другим фракциям белка, что существенно ограничивает применение тест-полосок для диагностики протеинурии, обусловленной глобулиновыми фракциями, мукопротеинами, низкомолекулярными белками, а также протеинурии Бенс-Джонса [2, 3, 7].

#### 2. Зависимость коэффициента отражения аналитической зоны «Белок» от концентрации белка

После определения рабочей длины волны излучения была построена калибровочная зависимость аналитического сигнала от различных концентраций белка.

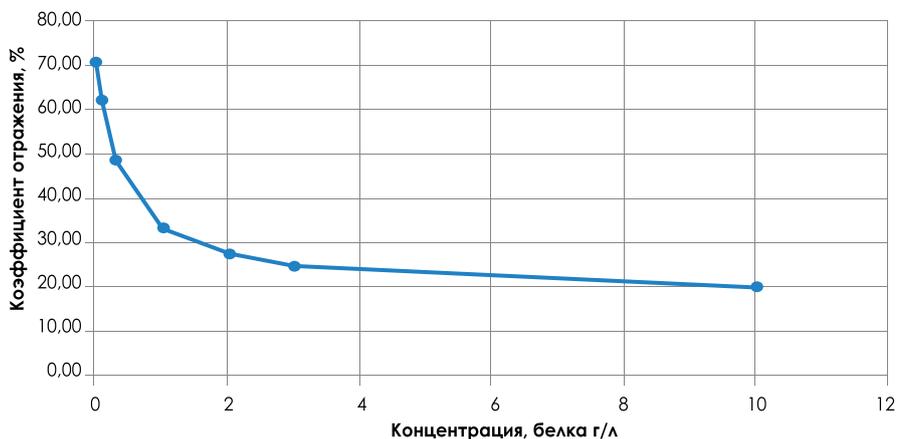


Рисунок 4. Зависимость коэффициента отражения аналитической зоны «Белок» от концентрации белка (альбумина) в моче.

Для этого были приготовлены аттестованные по альбумину образцы мочи с разными концентрациями и на анализаторе мочи URiCKAH-strip выполнены серии измерений для каждого значения концентрации. Как видно из рис. 4, полученная калибровочная кривая имеет нелинейный характер, что вполне характерно для отражательной фотометрии.

Калибровочная зависимость  $K_{отр}(C)$  записывается в память приборов URiCKAH-strip и используется для расчета результата измерения концентрации белка в исследуемых образцах мочи.

На следующем этапе была оценена результирующая погрешность определения белка в моче с использованием анализатора URiCKAH-strip. На результирующую погрешность измерения влияют вариации фотометра и измерения.

### 3. Воспроизводимость измерений коэффициента отражения

Для исследований вариаций измерения коэффициента отражения фотометра были изготовлены специальные стандартные цветные тест-полоски, имитирующие по своим спектральным характеристикам реальные мочевые тест-полоски Uriscan 11 strip. Применение для исследования

стандартных тест-полосок позволяет исключить химические вариации, связанные с качеством и количеством реагентов тестовой зоны полоски, объемом мочи, нанесенным на тестовую зону, интерферентами, содержащимися в образцах мочи, концентрацией аналита, временем инкубации, и оценить исключительно фотометрические вариации.

Вариации коэффициентов отражения для 20 измерений в канале «Белок» представлены в табл. 2.

Столь малые вариации измерения коэффициентов отражения на анализаторе URiCKAH-strip обусловлены вышеописанным алгоритмом измерения и специально разработанной конструкцией фотометра, которые позволили устранить вариации всей измерительной системы прибора:  $\delta F$  и  $\delta I_0$ .

### 4. Воспроизводимость в серии и правильность результатов измерений

Для исследования воспроизводимости в серии и правильности результатов измерений белка в моче были приготовлены стандартные образцы мочи с аттестованными концентрациями альбумина. Для этого были взяты несколько образцов мочи здоровых людей

Таблица 2

Аналитические характеристики измерения коэффициентов отражения специальных цветных тест-полосок

Концентрация белка, г/л	Коэффициент отражения ( $K_{отр}$ )		
	Среднее значение	Стандартное отклонение (SD)	Коэффициент вариации (CV)
0	0,712	0,00026	0,04%
0,3	0,480	0,00019	0,04%
6,0	0,233	0,00012	0,05%

с концентрацией белка, близкой к нулю. Затем в объединенный пул мочи добавлялись строго заданные количества альбумина. Погрешность приготовления стандартных образцов не превышала 1%. Каждый стандартный образец мочи измеряли 20 раз и вычисляли средние значения SD и CV. Результаты измерений представлены в табл. 3.

В верхней строке приведены аттестованные значения концентрации альбумина, строкой ниже — средние значения по 20 измерениям, в нижних строках приведены абсолютные и относительные отклонения средних значений от аттестованных. Из таблицы видно, что полученные относительные отклонения средних значений от референтных (B) не превышают 10,67%, что практически в два раза ниже требований приказа Минздрава РФ N45 от 7.02.2002 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» по предельно допустимым значениям смещения (B) для серии из 20 измерений, а именно:  $\pm B_{20} = 20\%$  [4]. Таким образом, результаты, полученные с использованием аналитической системы: анализатор мочи URiCKAH-strip + тест-полоски Uriscan 11 strip полностью отвечают требованиям к правильности определения концентрации белка в моче количественными методами.

$$\begin{aligned} \text{Общий CV}_{\% \text{ измерения белка}} &= \\ (CV_{\% \text{ фотометра}}^2 + CV_{\% \text{ измерения}}^2)^{1/2} &= \\ (0,05^2 + 15,63^2)^{1/2} &= 15,63\%, \end{aligned}$$

что заметно ниже предельно допустимого коэффициента общей аналитической вариации белка, рассчитанного по результатам 20 измерений для количественного анализа мочи согласно приказу Минздрава РФ N45 от 7.02.2000. В соответствии с данным приказом для белка в моче предельно допустимый  $CV_{20}$  составляет 25% [4]. При этом видно, что сам фотометр вносит в аналитическую систему пренебрежимо малую погрешность.

Если рассмотреть задачу обеспечения точности измерений белка в моче шире, то необходимо также учесть межлотковую вариацию тест-полосок и межприборную вариацию.

## 5. Межлотовые вариации концентрации белка для тест-полосок Uriscan 11 strip

Вариация, обусловленная различиями характеристик тест-полосок разных лотов (серий), является важной характеристикой аналитической системы: анализатор мочи + тест-полоски. Эти отличия, как правило, обусловлены качеством и количеством реагентов, нанесенных на тестовую зону полоски, и являются интегральной характеристикой качества тест-полосок определенного бренда.

В табл. 4 и на рис. 5 представлены данные по исследованию межлотовой вариации результатов измерений белка в моче с использованием аналитической системы: URiCKAH-strip + тест-полоски Uriscan 11 strip.

Из приведенных данных видно, что значения межлотовой вариации близки значениям вариации в аналитической серии (внутрилотовой вариации) и не превышают 13,7%. Высокая сопоставимость результатов при определении белка в моче на анализаторе URiCKAH-strip с использованием тест-полосок Uriscan 11 strip различных лотов свидетельствует о стабильно высоком качестве тест-полосок Uriscan 11 strip.

## 6. Межприборная воспроизводимость результатов измерений

Поскольку калибровка прибора вводится в память каждого прибора при его производстве и не предполагает выполнения процедуры калибровки в лабораториях, важной характеристикой таких приборов является межприборная воспроизводимость. Для исследования этой характеристики были взяты 40 приборов, и на каждом из них было выполнено по одному измерению. Результаты представлены в табл. 5.

Сравнивая показатели точности в табл. 3, 4 и 5, можно сделать вывод: межприборная вариация меньше по сравнению с вариацией в аналитической серии и сопоставима с межлотовой вариацией.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при выполнении анализа мочи в разных лабораториях, оборудованных анализаторами URiCKAH-strip, будут получены сопоставимые результаты и пациенту при мониторинге патологического

Таблица 3  
Результаты измерений стандартных образцов мочи с разными концентрациями альбумина

Референтные концентрации белка, г/л	0,10	0,30	1,00	2,00	3,00	10,00
Измеренные концентрации, г/л	0,11	0,32	0,99	1,96	3,32	9,66
Стандартное отклонение (SD), г/л	0,006	0,050	0,089	0,248	0,511	0,771
Коэффициент вариации (CV), %	5,45	15,63	8,99	12,65	15,39	7,98
Абсолютные отклонения средних значений от референтных, г/л	-0,01	-0,02	0,01	0,04	-0,32	0,34
Относительные отклонения средних значений от референтных (В), %	-10,00	-6,67	1,00	2,00	-10,67	3,40

Таблица 4  
Результаты измерений концентрации белка с использованием различных лотов тест-полосок Uriscan 11 strip

Номер лота	Образец мочи	
	с концентрацией белка 0,5 г/л	с концентрацией белка 1,0 г/л
41411	0,54	1,01
41412A	0,54	1,13
41414B	0,54	1,02
41415	0,68	1,22
41416A	0,49	0,96
41416B	0,41	0,87
41421	0,48	1,14
41422A	0,52	1,19
41423	0,56	1,14
<b>Среднее</b>	0,53	1,08
SD	0,073	0,116
CV	13,7%	10,8%

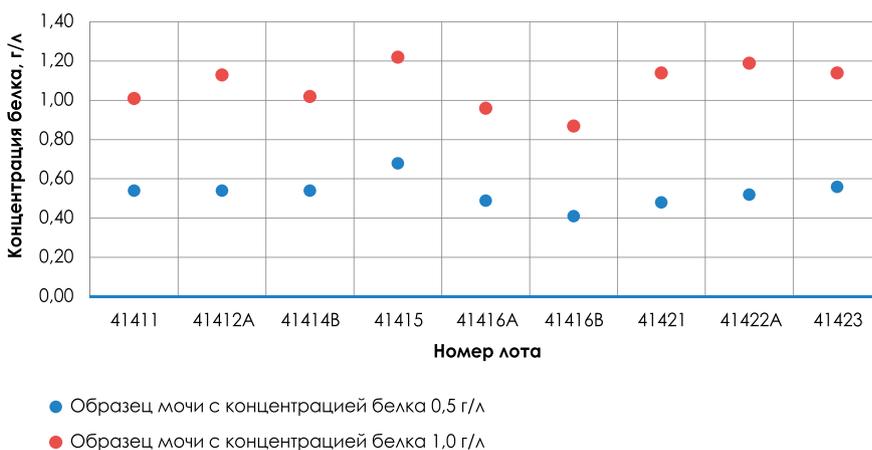


Рисунок 5. Межлотовые вариации концентрации белка для тест-полосок URiCKAH 11 strip.

Таблица 5  
Результаты измерений проб мочи на 40 приборах URiCKAH-strip

Среднее значение концентрации белка в моче, г/л	0,25	3,0	7,1
Стандартное отклонение (SD), г/л	0,03	0,4	0,7
Коэффициент вариации (CV), %	12,0	13,3	9,9

процесса в динамике не обязательно выполнять исследования мочи в одной и той же лаборатории.

Итак, получив данные межлотовой и межприборной вариации, можно оценить суммарную погрешность опреде-

ления белка в моче в диапазоне 0,1–10,0 г/л при самых крайних условиях:

$$CV\%_{\text{измерения белка}} = (CV\%_{\text{фотометра}}^2 + CV\%_{\text{измерения}}^2 + CV\%_{\text{межлотовой}}^2 + CV\%_{\text{межприборной}}^2)^{1/2} = (0,052 + 15,63 + 13,72 + 13,32)^{1/2} = 24,7\%$$

Таким образом, даже с учетом всех возможных видов вариаций, суммарная погрешность определения белка не превышает 25%!

### Выводы

Представленные в настоящей работе результаты показали, что аналитическая система: URiCKAH-strip + тест-полоски Uriscan 11 strip обладает следующими характеристиками:

- вариации измерения коэффициентов отражения не превышают 0,05%, что является уникальной характеристикой для приборов данного класса, позволяющей обеспечить высокую точность исследования показателей мочи на анализаторе URiCKAH-strip;
- относительные отклонения средних значений от референтных (В) не превышают -10,67%, что полностью соответствует требованиям приказа Минздрава РФ от 07.02.2000 N 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» к правильности определения концентрации белка в моче количественными методами;

- коэффициент вариации в аналитической серии из 20 измерений в диапазоне концентраций белка в моче 0,1–10,0 г/л не превышает 15,63% и всецело удовлетворяет требованиям приказа Минздрава РФ от 07.02.2000 N 45 к количественному анализу мочи;
- значения межлотовой вариации близки к значениям вариации в аналитической серии (внутрилотовой вариации) и не превышают 13,7%, что свидетельствует о стабильном качестве тест-полосок Uriscan 11 strip;
- межприборная вариация меньше по сравнению с вариацией в аналитической серии. Коэффициент вариации результатов определения концентрации белка на 40 приборах варьирует в диапазоне 9,9–13,3%, что обеспечивает сопоставимость результатов исследования белка в моче в разных лабораториях региона, оснащенных анализаторами URiCKAH-strip.

Столь высокие для методов «сухой химии» аналитические характеристики представленной системы были достигнуты благодаря применению российскими учеными уникальных

конструкторских и программных решений при создании анализатора мочи URiCKAH-strip и использованию высококачественных тест-полосок Uriscan 11 strip.

### Список литературы

1. Волкова И. А. Общий анализ мочи на современном этапе развития клинической лабораторной диагностики. // Лаборатория ЛПУ.— 2014.— Спецвыпуск № 5.— С. 59–63.
2. Иванова В. Н., Первушин Ю. В., Рогова С. Ш., Абасова Т. В. Трактовка результатов исследования мочи. // [www.stgmu.ru/userfiles/depts/clinical\\_lab\\_diagnosis\\_re/Obschij\\_analiz\\_mochi.rtf](http://www.stgmu.ru/userfiles/depts/clinical_lab_diagnosis_re/Obschij_analiz_mochi.rtf).
3. Куриляк О. А., Шибанов А. Н. Анализ мочи в лаборатории современной поликлиники. // Поликлиника. Спецвыпуск № 12, 2018. «Лаборатория ЛПУ» С. 24–30.
4. Приказ МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 // Управление качеством клинических лабораторных исследований. Нормативные документы. Москва.— Лабпресс, 2000, С. 5–57.
5. Руководство по эксплуатации анализатора мочи URiCKAH-про. Москва, 2017, С. 34.
6. Шибанов А. Н., Куриляк О. А. Лаборатория — клиницисту. Анализ мочи в современной клинике. // Медицинский алфавит.— 2017.— Том 3 (Больница — все для ЛПУ). № 33. С. 54–60.
7. Эмануэль В. Л. Лабораторные технологии оценки мочевого синдрома. // Нефрология.— 2007, Том 11, № 1.— С. 17–27.



## XXII ФОРУМ «НАЦИОНАЛЬНЫЕ ДНИ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ РОССИИ»

### Уважаемые коллеги!

На протяжении многих лет единственным источником финансирования форума «Национальные дни лабораторной медицины России» как научно-образовательного мероприятия являлись взносы участников выставки «Интерлабдиагностика».

К сожалению, текущей финансовой поддержки недостаточно для проведения XXII форума «Национальные дни лабораторной медицины России» на достойном уровне в запланированные сроки 19–21 сентября 2018 года.

В связи с этим организационным комитетом форума принято решение о переносе мероприятия на 2019 год.

**Сроки проведения  
форума будут объявлены  
дополнительно.**

С уважением,  
организационный комитет  
XXII Форума «Национальные  
дни лабораторной медицины  
России»

# Применение метода КФ-ПЦР для выявления анеуплоидии по хромосомам 21, 18, 13, X и Y при амниоцентезе у беременных разных групп риска

О. А. Тарасенко

Лаборатория пренатальной диагностики врожденных и наследственных болезней  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени  
Д. О. Отта», г. Санкт-Петербург

## **Possibility of using QF-PCR-method to detect aneuploidy on chromosomes 21, 18, 13, X and Y in amniocentesis in pregnant women of different risk groups**

O. A. Tarasenko

Scientific and Research Institute for Obstetrics and Gynecology n. a. D. O. Ott, Saint Petersburg, Russia

### Резюме

В настоящей работе представлены результаты диагностики, проведенной 1 480 беременным женщинам с высоким риском хромосомной патологии плода методом КФ-ПЦР. Материал для исследования был получен из внезародышевых клеток плода (амниоцитов). В результате выявлено 49 случаев анеуплоидии (3,3 %). В 34 случаях был определен синдром Дауна (трисомия по хромосоме 21); в шести — синдром Эдвардса (трисомия по хромосоме 18); в одном образце выявлена триплоидия (69, XXУ). Численные нарушения половых хромосом (синдром Кляйнфельтера, синдром Шерешевского-Тернера, трипло-Х) выявлены в восьми образцах. Все случаи хромосомной аномалии были однозначно идентифицированы с помощью разработанной нами системой STR-маркеров для метода количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции (КФ-ПЦР) [6, 7, 10]. В настоящей работе исследовалась эффективность метода в группах беременных с различными показаниями к пренатальной диагностике.

Ключевые слова: анеуплоидия, количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция (КФ-ПЦР), пренатальная диагностика, STR-маркеры.

### Summary

Quantitative fluorescent PCR is a quick method of determining aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X and Y. This article presents the results of a survey of 1,480 pregnant women aged 19 to 49 years with various indications for conducting prenatal researches to identify the most common chromosomal abnormalities of the fetus using the QF-PCR method. The fetal material was obtained from extraembryonic cells of the fetus (amniocytes). As a result of the research, 49 samples with aneuploidy (3.31 %) of 1 480 samples were identified. 69.4 % (34/49) of all detected pathologies are trisomy on chromosome 21 (Down's syndrome). 12.2 % accounted for the trisomy of chromosome 18 (Edwards syndrome) (6/49). In one sample a triploid (2.0 %) was detected. 16.4 % of the detected pathologies made samples with numerical violations of sex chromosomes (Klinefelter syndrome, Shereshevsky-Turner syndrome, triple-X). Based on the obtained data, it is obvious that the most common aneuploidy is the trisomy of chromosome 21 (Down's syndrome).

Key words: aneuploidy, QF-PCR, prenatal diagnostics, STR-markers.

### Введение

Количественная флуоресцентная полимеразная цепная реакция (КФ-ПЦР) — метод определения анеуплоидии по хромосомам 13, 18, 21, X и Y, пригодный для проведения пренатальных исследований с целью выявления наиболее распространенной хромосомной патологии плода. К основным преимуществам КФ-ПЦР относятся: автоматизация процесса, обеспечивающая высокую скорость анализа образцов; возможность проведения молекулярного исследования на некультивируемых эмбриональных клетках; низкая себестоимость анализа. Надежность данного метода была подтверждена многими исследованиями, а сам он определен как быстрый, высокочувствительный и специфичный [1-8].

### Материалы и методы

В настоящей работе представлены результаты обследования 1 480 беременных женщин в возрасте от 19 до 49 лет, направленных на инвазивную диагностику в ФГБНУ «НИИАГиР имени Д. О. Отта» для исключения наиболее распространенной хромосомной патологии плода. Материал для исследования был получен путем амниоцентеза — взятия внезародышевых клеток плода

(амниоцитов). ДНК, выделенная из клеток амниотической жидкости, проанализирована методом КФ-ПЦР. Основные группы и подгруппы сформированы в зависимости от клинических показаний к пренатальной диагностике. Основными показаниями к инвазивному вмешательству и проведению анализа методом КФ-ПЦР являются:

- высокий риск рождения ребенка с синдромом Дауна по результатам биохимического скрининга I и (или) II триместров;
- возраст женщины старше 35 лет;
- обеспокоенность состоянием плода.

Также в группу вошли беременные с ультразвуковыми маркерами хромосомных аномалий плода и отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАГА), которым не рекомендовано проводить биопсию плаценты в связи с угрозой осложнений беременности.

От всех женщин было получено информированное согласие на проведение пренатального исследования методом КФ-ПЦР. Во время медико-генетического консультирования всем беременным предоставлялась детальная информация о возможностях и ограничениях КФ-ПЦР-тестирования.

Молекулярно-генетическое исследование методом КФ-ПЦР проводили с использованием меченых олигопраймеров для STR-маркеров, расположенных на хромосомах

**Таблица 1**  
STR-маркеры, размер амплифицируемых фрагментов, флуоресцентные красители и локализация праймеров на хромосомах

Маркер	Размеры аллелей (п. н.)	Флуоресцентная метка	Локализация
<b>Половые хромосомы</b>			
AMXY	X: 104	TAMRA	Xp22.31
	Y: 110	TAMRA	Yp11.2
DXS6854	90–125	HEX	Xq26.1
DXS981	230–260	FAM	Xq12
XHPRT	263–299	HEX	Xq26.1
X22	194–238	HEX	Xq28
X22	194–238	HEX	Yq12
P39	140–166	FAM	Xq28
<b>Хромосома 13</b>			
D13S628	425–470	TAMRA	13q31.1
D13S634	385–440	FAM	13q21.31
D13S742	235–315	HEX	13q12.11
<b>Хромосома 18</b>			
D18S380	160–200	TAMRA	18q22.3
D18S386	330–400	HEX	18q22.1
D18S391	146–186	HEX	18p11.31
D18S535	455–500	FAM	18q12.1
<b>Хромосома 21</b>			
D21S1411	291–375	TAMRA	21q22.3
D21S226	420–450	HEX	21q21.2
D21S1437	119–143	FAM	21q11.2
D21S11	254–342	FAM	21q11.1-q11.2

**Таблица 2**  
Характеристики и численность исследуемых подгрупп (возраст и показание для пренатального исследования)

	Возраст беременных			
	Группа 1 (до 35 лет)		Группа 2 (35 лет и старше)	
	Количество	Процент	Количество	Процент
1 (КС)	57	10	64	7
2 (УЗМ)	67	12	47	5
3 (БХМ)	432	77	757	83
4 (ОСП)	6	1	50	5
Всего	562	100	918	100

21, 18, 13, X и Y. Локализация праймеров, используемая флуоресцентная метка и размер ПЦР-продукта представлены в табл. 1.

Флуоресцентно меченые ПЦР-продукты, полученные в результате мультиплексной полимеразной цепной реакции, были проанализированы с помощью капиллярного электрофореза на автоматизированном ДНК-секвенаторе ABI 3130-Avant (Applied Biosystems, США). Оценка результатов осуществлялась с использованием программы Gene Mapper (Applied Biosystems, США).

### Результаты и обсуждение

Все образцы ДНК были получены из амниоцитов беременных на сроке 16–22 недель, сгруппированных по возрасту. Группу 1 составили 562 образца ДНК плодов женщин моложе 35 лет. Во вторую вошли 918 образцов ДНК плодов женщин в возрасте 35 лет и старше. Такое формирование возрастных групп обусловлено тем, что еще в 70-е годы XX века было показано значительное увеличение частоты рождения детей с синдромом Дауна, если возраст матери превышает 35 лет. Согласно приказу Министерства здравоохранения РФ № 457 от 28.12.2000, независимо от результатов биохимического скрининга рекомендовано направлять на инвазивную пренатальную диагностику всех беременных 35 лет и старше, поэтому обращения от женщин старшего возраста более многочисленны. Беременных женщин моложе 35 лет направляют на инвазивную пренатальную диагностику при наличии медицинских показаний (ультразвуковые и (или) биохимические маркеры хромосомной патологии плода) или при беспокойности состоянием плода [9].

Распределение беременных по группам представлено в табл. 2.

- Группы 1.1 и 2.1 сформированы из женщин с комбинированным риском, включающим высокий риск хромосомной патологии плода по результатам биохимического скрининга и наличие ультразвуковых маркеров ТВП  $\geq 2,5$  мм. В нее вошли 57 женщин из группы 1 и 64 женщины из группы старшего возраста.
- 1.2 и 2.2 — беременные женщины, у которых были выявлены только ультразвуковые маркеры, свидетельствующие о высоком риске хромосомной патологии плода (УЗМ). Эти группы включают 67 женщин из группы молодых и 47 женщин из старшей группы 2.
- Группы 1.3. и 2.3 состояли из беременных женщин с повышенным риском по результатам биохимического скрининга I (РАР-А и  $\beta$ -ХГЧ) и II (АФП и ХГЧ) триместров беременности (БХМ). Ультразвуковых маркеров хромосомной патологии плода выявлено не было, ТВП не превышала 2,5 мм. Эти подгруппы включали 432 женщины из группы 1 и 757 из группы 2.
- Подгруппы 1.4 и 2.4 составили женщины, направленные на пренатальное исследование в связи с беспокойностью состоянием плода (ОСП). У этих беременных не было выявлено риска хромосомной патологии плода. В эту подгруппу вошли шесть женщин из группы 1 и 50 женщин из группы 2.

Представленные данные демонстрируют, что в группе женщин 35 лет и старше, которым проводили амниоцентез и исследование методом КФ-ПЦР, доля беременных с повышенным риском хромосомной патологии плода по результатам биохимического скрининга, а также при отсутствии повышенного риска хромосомной патологии плода (группа ОСП), достоверно выше. В группе женщин моложе 35 лет выше доля беременных с более серьезными показаниями для проведения пренатального исследования плода (наличие ультразвуковых маркеров хромосомной патологии плода, высокий риск по результатам комбинированного скрининга).

### Результаты исследования

Методом КФ-ПЦР из 1 480 образцов выявлено 49 образцов с анеуплоидией (3,3 %). Большая часть от числа выявленной патологии приходится на трисомию по хромосоме 21 (синдром Дауна) — 34 образца. Трисомия по хромосоме 18 (синдром Эдвардса) выявлена в шести образцах. В одном случае идентифицирован триплоид и в восьми случаях определены образцы с числовыми нарушениями половых хромосом (синдром Кляйнфельтера, синдром Шерешевского-Тернера, трипло-Х). Подавляющее большинство выявленной патологии — трисомия по хромосоме 21 (синдром Дауна) (табл. 3).

При сравнении частот выявленной патологии в группах с различными показаниями к пренатальной диагностике были получены следующие результаты:

- среди женщин моложе 35 лет с комбинированным риском рождения ребенка с хромосомной патологией выявлено четыре случая анеуплоидии: два случая — трисомия по хромосоме 21 и два случая — трисомия по хромосоме 18. В группе женщин старше 35 лет с высоким риском хромосомной аномалии плода синдром Дауна выявлен девяти образцах. Таким образом, доля трисомии по хромосоме 21 в группе женщин старшего возраста (2.1) достоверно выше, чем доля трисомии 21 в группе молодых женщин (1.1), ( $p < 0,05$ ;  $\chi^2 = 4,04$ );
- в группе 1.2 (женщин с ультразвуковыми маркерами хромосомной патологии плода) анеуплоидия выявлена в шести случаях. В трех случаях — трисомия по хромосоме 21 и в трех — трисомия по хромосоме 18. В группе 2.2 патология выявлена у трех плодов. Два случая — трисомия по хромосоме 21 и один — трисомия по хромосоме 18;
- в группе 1.3 (беременных моложе 35 лет с риском рождения ребенка с хромосомной патологией по результатам биохимического скрининга) анеуплоидия выявлена в пяти случаях. В трех случаях — трисомия по хромосоме 21, в одном — синдром Кляйнфельтера (47, ХХУ), и еще у одного плода обнаружена трисомия по хромосоме Х (47, ХХХ);
- в группе 2.3 патология выявлена в 21 образце. Из них в 14 случаях определена трисомия по хромосоме 21, в двух образцах — синдром Кляйнфельтера (47, ХХУ), также в этой группе выявлены патологии: трипло Х (47, ХХХ), триплоидия (69, ХХУ) и 48, ХХУУ. У двух плодов этой же группы определен синдром Тернера (моносомия Х);

Таблица 3  
Хромосомная патология, выявленная методом КФ-ПЦР

Хромосомная патология	Количество	Процент
Трисомия хромосомы 21 (синдром Дауна)	34	69
Трисомия хромосомы 18 (синдром Эдвардса)	6	12
Синдром Кляйнфельтера 47, ХХУ	3	6
Синдром Тернера 45, Х	2	4
Трипло Х – 47, ХХХ	2	4
Триплоид – 69, ХХХ	1	2
48, ХХУУ	1	2
Всего	49	100

Таблица 4  
Анеуплоидия плода в группах беременных разных групп риска хромосомной патологии (N = 1 480)

	47, XY + 21	47, XX + 21	47, XY + 18	47, XX + 18	47, ХХУ	45, Х	47, ХХХ	69, ХХХ	48, ХХУУ	Всего патологий, N, %	Норма, N, %	Всего
1.1	2	2								4 7	53 93	57
2.1	9									9 14	55 86	64
1.2	3	3								6 9	61 91	67
2.2	2	1								3 6	44 94	47
1.3	3		1			1				5 1	427 99	432
2.3	14		2	2	1	1	1			21 3	736 97	757
1.4										0 0	6 100	6
2.4	1									1 2	49 98	50
Всего	34	6	3	2	2	1	1			49 3	1 431 97	1 480

- в группе 1.4, насчитывающей шесть женщин без риска хромосомной патологии, которым проводили инвазивную диагностику по их собственному желанию, патологии плода не выявлено.
- в группе беременных без показаний к пренатальным исследованиям, обеспокоенным состоянием плода женщин старшего возраста (2.4), насчитывающей 50 беременных, в одном случае определена трисомия по хромосоме 21.

Следует отметить, что числовые нарушения половых хромосом были выявлены только в группах беременных, направленных на пренатальное исследование исключительно в связи с повышенным риском хромосомной патологии плода по результатам биохимического скрининга. (табл. 4)

Согласно полученным данным наиболее часто встречающаяся анеуплоидия — трисомия хромосомы 21 (синдром Дауна). Синдром Дауна выявлен в восьми образцах у

**Таблица 5**  
Частоты патологии плода в различных  
возрастных группах женщин

	Группа 1 (женщины моложе 35 лет) (N = 562), N, %		Группа 2 (женщины 35 лет и старше) (N = 918), N, %	
Трисомия хромосомы 21	8	53	26	77
Трисомия хромосомы 18	5*	33	1*	3
Синдром Кляйнфельтера (47, ХХУ)	1	7	2	6
Синдром Тернера (45, X)	–	–	2	6
Трипло X (47, ХХХ)	1	7	1	3
48, ХХУУ	–	–	1	3
Триплоид (69ХХУ)	–	–	1	3
Всего	15	100	34	100

Примечание: \* —  $p < 0,05$ ;  $\chi^2 > 5,0$ .

плодов женщин моложе 35 лет (группы 1). У плодов женщин группы 2 (35 лет и старше) трисомия по хромосоме 21 обнаружена в 26 случаях.

Доля трисомии хромосомы 21 среди выявленных патологий в группе 2 несколько выше, чем в группе 1, однако отличия частот синдрома Дауна в разных возрастных группах не являются статистически значимыми ( $\chi^2 = 1,647$ ;  $p = 0,1994$ ).

Следующей по частоте встречаемости среди обнаруженных анеуплоидий является трисомия по хромосоме 18 (синдром Эдвардса). Данная патология выявлена в пяти образцах из группы 1. В группе 2 трисомия по хромосоме 18 выявлена в одном образце. Частота встречаемости синдрома Эдвардса в разных возрастных группах достоверно отличается ( $\chi^2 = 6,342$ ;  $p = 0,0118$ ), причем данная патология встречается чаще у молодых женщин.

Синдром Кляйнфельтера выявлен в двух случаях в группе 2 и в одном случае в группе 1. Синдром Тернера (45, X) выявлен в двух образцах из группы 2. Трипло-Х (47, ХХХ) выявлен в одном образце из группы 1, и в одном образце из группы 2. Также был определен один образец с кариотипом 48, ХХУУ в группе 2.3 (женщин старше 35 лет, направленных на исследование по результатам биохимического скрининга).

Все случаи анеуплоидии по половым хромосомам выявлены в группах 1.3 и 2.3 (женщин с высоким риском хромосомной патологии плода по результатам биохимического скрининга).

В группе женщин старшего возраста обнаружен один плод с триплоидией (69, ХХУ) (табл. 5.)

Данные, полученные в результате проведенных исследований, подтверждают, что метод КФ-ПЦР имеет ряд преимуществ как скрининговый тест для пренатального выявления наиболее распространенной хромосомной патологии (анеуплоидии). Определение числовых нарушений по «основному набору» хромосом для пренатальной диагностики (13, 18, 21, X, Y) может быть осуществлено в течение 1–2 дней, поскольку метод не требует культивирования клеток плода.

Для проведения анализа достаточно минимального количества биообразца, причем одинаково эффективно могут быть использованы клетки амниотической жидкости, ворсины хориона, плаценты, пуповинная кровь — любой материал, из которого можно выделить ДНК.

Амниоцентез, как наиболее безопасный инвазивный метод, можно рекомендовать беременным женщинам, которым проведение плацентобиопсии и кордоцентеза противопоказано по акушерским показаниям.

Наши результаты и данные литературы подтверждают, что точность метода КФ-ПЦР при выявлении частой анеуплоидии сравнима с традиционным кариотипированием [9, 10]. При назначении исследования необходимо учитывать ограничения данного метода, такие как невозможность определения структурных хромосомных нарушений, в связи с тем, что данная технология разработана только для определения анеуплоидии по «основному набору» хромосом, составляющих до 95 % всех хромосомных аномалий. Однако большинство структурных нарушений встречаются относительно редко и ассоциированы с фенотипами, которые могут быть показанием для проведения дополнительных диагностических тестов.

#### Список литературы

- Adinolfi M., Sherlock J. Prenatal detection of chromosome disorders by QF-PCR // *Lancet*. – 2001. – Vol. 358, N. 9287. – P. 1030-1031.
- Cirigliano V., Sherlock J., Conway G. et al. Rapid detection of chromosomes X and Y aneuploidies by quantitative fluorescent PCR // *Prenat Diagn*. – 1999. – Vol. 19, N. 12. – P. 1099-1103.
- Cirigliano V., Voglino G., Canadas M.P. et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF PCR. Assessment on 18000 consecutive clinical samples // *Mol. Hum. Reprod*. 2004. № 10. P. 839–846.
- Cirigliano V., Voglino G., Ordonez E. et al. Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF PCR, results of 9 years of clinical experience // *Prenat. Diagn*. – 2009. – Vol. 29. – P. 40–49.
- Mann K., Donaghue C., Fox S.P. et al. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy // *Eur. J. Hum. Genet*. 2004. № 12. P. 907–915.
- Демин Г.С., Иващенко Т.Э., Федорова И.Д. и др. Особенности пренатальной диагностики хромосомных болезней с помощью метода количественной флуоресцентной ПЦР // *Медицинская генетика* – 2008. – Т. 7. – № 5. – С. 20-25.
- Тарасенко О.А., Насыхова Ю.А., Иващенко Т.Э. и др. Пренатальная диагностика наиболее распространенных хромосомных аномалий методом QF-PCR в Санкт-Петербурге // *Медицинская генетика* – 2012, т. 11, № 4 (118), с. 42–49.
- Тимошевский В.А., Лебедев И.Н. Технологии молекулярного кариотипирования в практике быстрой пренатальной диагностики клинически значимых анеуплоидий. *Медицинская генетика* № 8, 2010. – 13–22.
- Пренатальный биохимический скрининг. Система, принципы, клинико-диагностические критерии, алгоритмы. / Кашеева Т. К. / Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Санкт-Петербург 2009.
- Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней / Под ред. акад. РАМН, проф. Э.К. Айламазяна, чл.-корр. РАМН, проф. В.С. Баранова. – 2-е изд. – М.: МЕДпрессинформ, 2007. – 416 с.: ил.



# Каким должен быть кровяной агар?

Б. Ф. Шуляк, к. вет. н.

С. Г. Марданлы, д.м.н., акад. АМТН, проф. кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин<sup>2</sup>, президент и директор по науке<sup>1</sup>, заслуженный работник здравоохранения России

С. С. Марданлы, м.н.с. отдела эпидемиологии<sup>3</sup>, зам. ген. директора по коммерческим вопросам<sup>1</sup>

Я. В. Мишуткина, к.б.н., директор НПО «Иммунология» и НПО «Биохимия»<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

<sup>2</sup>ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» Минобразования Московской области, г. Орехово-Зуево, Московская область

<sup>3</sup>ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва

## What should be blood agar?

B. F. Shulyak, S. G. Mardanly, S. S. Mardanly, Ya. V. Mishytkina

ECOLab Co., Elektrogorsk, Moscow Region; State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo, Moscow Region; Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology n.a. honorary academician N.F. Gamalei, Moscow; Russia

### Резюме

ЗАО «ЭКОлаб» выпускает стерильную дефибрированную баранью кровь для приготовления кровяного агара (РУ № ФСР 2008/03081 от 30.07.2008) и разработало технический регламент аналогичного продукта из крови лошадей (проходит регистрацию в России). Эти медицинские изделия позволяют полностью исключить применение не по назначению человеческой донорской крови, которая значительно уступает им по ростовым качествам и малопригодна для индикации гемолитических бактерий по типу вызываемого гемолиза.

Ключевые слова: бактерии, гемолиз, донорская кровь человека, кровяной агар, кровь баранья дефибрированная, кровь лошадиная дефибрированная, микробиологические питательные среды, эритроциты.

### Summary

EKOLab Co. produces sterile defibrinated sheep blood for the preparation of blood agar (RU № ФСР 2008/03081 from 30.07.2008) and has developed a technical regulation of a similar product from the blood of horses (now is registered in Russia). These products will completely exclude the misuse of human blood which is much inferior to them in terms of growth properties and is not so suitable for identification hemolytic bacteria by the type of hemolysis.

Keywords: bacteria, blood agar, defiled sheep blood, equine defibrinated blood, erythrocytes, hemolysis, human blood, microbiological nutrient media.

Основной принцип выделения из патологического материала и объектов окружающей среды бактерий, сформулированный Р. Кохом в статье *Methods for the study of pathogenic organisms* (1881), состоит в том, что используемые с этой целью субстраты (среды) должны содержать необходимые им для роста и размножения питательные вещества.

За последующую более чем 120-летнюю историю развития микробиологии предлагалось огромное количество питательных сред с разной рецептурой, но ни одна из них не отвечает упомянутому выше требованию в такой же степени, как кровяной агар. Это вполне закономерно, поскольку основная функция крови состоит в обеспечении тканей организма всем необходимым (белками, липидами, углеводами, минеральными веществами, витаминами и другими биологически активными соединениями), а эволюция патогенных микроорганизмов направлена на адаптацию к условиям, с которыми они сталкиваются в организме хозя-

ина. Благодаря таким особенностям плотные среды с кровью пригодны для выращивания большинства патогенных бактерий, включая даже многих из тех, которые проявляют особые требования к условиям культивирования *in vitro*. Кроме того, они позволяют дифференцировать микроорганизмы по способности вызывать гемолиз, а также его типу.

В состав плотных сред с кровью, обозначаемых обобщающим названием «кровяной агар», можно включать кровь разных видов млекопитающих, поскольку содержание в ней питательных веществ существенно не различается. Поэтому в ситуации, когда важны только ростовые качества (питательная ценность) субстрата, предназначенного для культивирования бактерий, при выборе вида донора ориентируются в основном на такие критерии, как доступность и стоимость. В ряде стран Западной Европы предпочтение отдают лошадям, в остальных регионах мира — овцам, реже используют с этой целью крупный рогатый скот, и в еще меньшей степени — свиней. Что каса-

ется человеческой крови, то ее включают в состав питательных сред лишь в медицинских лабораториях Российской Федерации и некоторых стран Африки. Это обусловлено не только ее худшими ростовыми качествами для бактерий по сравнению с кровью жвачных и лошадей [5], но также рядом причин, которые подлежат специальному рассмотрению.

Во-первых, донорская кровь людей имеет иное назначение — трансфузия нуждающимся в ней пациентам. Лечебные медицинские учреждения испытывают (особенно в последние 20 лет) острую ее нехватку. В бактериологические лаборатории она попадает не сразу после забора, а после выбраковки в связи с истекшим сроком годности или спонтанным лизисом эритроцитов. В таком состоянии ее можно использовать только для приготовления шоколадного агара, поскольку находящиеся в ней эритроциты претерпели необратимые морфологические изменения (деструкцию мембран и накопление кислых продуктов метаболизма),

**Таблица**  
**Сравнительная оценка эритроцитов различных видов животных и человека**

Вид	Площадь поверхности эритроцитов, мкм <sup>2</sup>	Объем эритроцитов, мкм <sup>3</sup>	Концентрация эритроцитов в крови, млн/мкл
Курица	182,0	127,0	3,0
Свинья	83,4	58,0	7,0
Собака	82,7	70,0	6,7
Крупный рогатый скот	82,0	56,0	6,2
Кролик	81,0	68,0	4,7
Лошадь	68,6	50,0	7,5
Овца	60,5	31,0	9,5
Коза	53,0	25,0	14,5
Человек	136,0	90,0	4,7

Примечание: в таблице приведены усредненные значения показателей.



Медицинское изделие «Кровь баранья дефибринированная для питательных сред, стерильная» по ТУ 9398-073-70423725-2007 и РУ № ФСР 2008/03081 от 30 июля 2008 г. производства ЗАО «ЭКОлаб».

частично, а чаще полностью, утратив способность служить индикатором гемолитической активности бактерий.

Не поддается контролю и соответственно не регистрируется использование донорами накануне сдачи крови антибактериальных препаратов, ингибирующих рост микроорганизмов *in vivo* и в еще большей степени *in vitro*.

В крови многих доноров содержатся специфические антитела, оказывающие отрицательное влияние на рост в питательных средах соответствующих им бактерий. К примеру, при посевах патологического материала пациентов, инфицированных стрептококками (*S. pyogenes*, *S. agalactiae* и др.), на плотные среды с человеческой кровью в 20–30% случаев получают ложноотрицательный результат из-за плохого роста бактерий, а также

проявления ими нехарактерных типов гемолиза [2]. Причина банальна: стрептококки широко распространены среди населения и вызывают антительный иммунный ответ — доноры не являются в этом отношении исключением.

На агаре с человеческой кровью стрептококки индуцируют переменный по степени выраженности гемолиз, что затрудняет идентификацию и дифференциацию этих бактерий. На агаре с кровью барана типичные штаммы *S. agalactiae*, как правило, вызывают β-гемолиз, но некоторые изоляты проявляют слабую гемолитическую активность. Для ее выявления в зарубежных, а в последние годы и отечественных лабораториях широко применяют САМР-тест, основанный на совместном культивировании предполагаемых изолятов *S. agalactiae* с золотистым стафилококком.

Выделяемый последним фермент сфингомиелиназа гидролизует основной липидный компонент стенки эритроцитов (сфингомиелин), усиливая литическое действие гемолизина стрептококка, что ведет к увеличению зон гемолиза вокруг колоний последнего. Однако на агаре с человеческой кровью данный феномен проявляется слабо [6, 7]. На этом основании у многих отечественных бактериологов создалось необоснованное представление о неэффективности САМР-теста.

Площадь поверхности и объем эритроцитов у мелкого рогатого скота значительно меньше, чем у большинства других видов млекопитающих, а по концентрации эритроцитов в крови овцы и козы превосходят других сельскохозяйственных животных (см. табл.). Такие морфологические особенности делают кровь животных этих видов наилучшим компонентом сред, предназначенных для идентификации бактерий.

Взятие крови при убое животных снижает стоимость, но негативно отражается на качестве (стерильности конечного продукта и сохранности в нем эритроцитов). Этого удается избежать посредством использования закрытых стад животных-доноров. От них регулярно берут кровь в количестве, не превышающем 15% ее общего объема, соблюдая при этом асептику. Животные-доноры получают полноценный рацион и находятся в условиях, соответствующих их физиологическим потребностям, что отражается на качестве крови и стабильности ее компонентов. Кроме того, их содержат изолированно и периодически проверяют на отсутствие опасных инфекций, тем самым предотвращая контаминацию крови патогенами и возможность заражения ими лабораторных работников.

На предприятии ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск Московской области) организовано производство консервированной дефибринированной крови овец-доноров. Специалистами компании оптимизирована технология удаления из венозной крови фибрина, а также разработан состав стабилизирующих добавок, обеспечивающих более длительное ее хранение [3]. Результатом проведенных исследований стала регистрация в Российской Федерации медицинского изделия «Кровь баранья дефибриниро-

ванная для питательных сред, стерильная» (см. фото). Срок гарантированного сохранения специфических свойств продукта (в комплектации № 1) составляет 14 суток, а при добавлении в его состав цитрата натрия (комплектация № 2) он увеличивается до 30 суток [4].

Установлены хорошие ростовые свойства 5-процентного кровяного агара, приготовленного на основе выпускаемой ЗАО «ЭКОлаб» дефибринированной бараньей крови, для *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. agalactiae*, *Cl. perfringens*, *L. monocytogenes*.

Приобретенный опыт позволил специалистам компании разработать технические условия производства еще одного медицинского изделия — «Крови лошадиной дефибринированной для питательных сред стерильной» (в стеклянных флаконах по 100 мл), имеющего срок годности 14 суток. Ее включение в состав плотных сред позволяет с большей эффективностью культивировать такие прихотливые бактерии, как *H. pylori*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Streptococcus spp.*, а также дифференцировать их по типу гемолитической активности.

### Заключение

Для приготовления в медицинских лабораториях 5–15-процентного кровяного агара ЗАО «ЭКОлаб» выпускает дефибринированную баранью кровь (РУ № ФСР 2008/03081 от 30.07.2008) и разработало регламент производства дефибринированной крови лошадей (проходит регистрацию в России).

По ростовым качествам для бактерий, а также возможности их дифференциации по типу гемолиза и агалактичного стрептококка в САМР-тесте кровь овец и лошадей значительно превосходит свежую донорскую человеческую кровь. Поэтому применять с диагностической целью последнюю (особенно с истекшим сроком годности или признаками гемолиза) не следует. Более того, для проведения микробиологических исследований в диагностических лабораториях медицинских учреждений Российской Федерации разрешается использовать только зарегистрированные в установленном законом порядке медицинские изделия. Их замена недоброкачественными и незарегистрированными аналогами, в том числе донорской человеческой кровью, предназначенной исключи-

тельно для трансфузии, предусматривает административную или уголовную ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации.

### Список литературы

1. Федеральный закон № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 г.
2. Долгов В.В., Меньшиков В.В. (ред.). Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство в 2 томах // М.: АСМОК, 2012.
3. Марданлы С.Г., Бахилина Н.В., Ротанов С.В., Котляр М.А. Кровь баранья дефибринированная для приготовления питательных сред // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2016. Т. 3. № 19 (282). С. 51.
4. Медицинское изделие «Кровь баранья дефибринированная для питательных сред, стерильная» по ТУ 9398-073-70423725-2007 и РУ № ФСР 2008/03081 от 30 июля 2008 г. // Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий, № 05984 (<http://www.rozdravnadzor.ru/services/misearch/>).
5. Rusell F. M., Biribo S. S. N., Selvaraj G., et al. As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44, 3346–3351.
6. Sterzik B., Fehrenbach F. J. Reaction components influencing CAMP factor induced lysis. *J Gen Microbiol*, 1985, 131 (4), 817–820.
7. Yeh E., Pinsky B. A., Banaei N., Baron E. J. Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, Issue 7, e6141.

Мэрия Москвы,  
14-15 ноября 2018г.

## IV Российская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов»

Документация по данному учебному мероприятию представлена в Комиссию по оценке учебных мероприятий и материалов для НМО. Регистрация на сайте обязательна

www.expodata.info

Оргкомитет конгресса:  
ООО «Экспо пресс»  
Москва, ул. Ак. Королева, 13;  
Тел.: +7 (495) 617-36-43/44;  
Факс: (495) 617-36-79;  
E-mail: lvov.m.g@inbox.ru;  
[www.expodata.info](http://www.expodata.info)



Посвящается 120-летию со дня рождения И.А. Кассирского

# XIII Национальный конгресс терапевтов

21–23 ноября 2018 года

Москва  **КРОКУС ЭКСПО**

ст. метро Мякинино, 65 км МКАД

Зарегистрироваться на сайте [www.congress.rnmot.ru](http://www.congress.rnmot.ru)

**Оргкомитет:**

117420, Москва, а/я 1  
телефон: +7 (495) 518-26-70  
электронная почта: [mail@interforum.pro](mailto:mail@interforum.pro)  
[www.rnmot.ru](http://www.rnmot.ru)

**Конгресс-оператор:**



ООО «КСТ Интерфорум»  
Москва, ул. Профсоюзная, д. 57  
телефон: +7 (495) 722-64-20  
электронная почта: [mail@interforum.pro](mailto:mail@interforum.pro)  
[www.rnmot.ru](http://www.rnmot.ru)



# IV РОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ

3-5 ОКТЯБРЯ 2018

МОСКВА

ВДНХ, ПАВИЛЬОН 75

## 8000 СЛУШАТЕЛЕЙ

Более **300 ДОКЛАДЧИКОВ** российских и иностранных  
Более **150 КОМПАНИЙ-УЧАСТНИКОВ** – ведущих российских  
и зарубежных производителей и поставщиков лабораторного  
оборудования и расходных материалов

Свыше **50 НАУЧНЫХ СЕКЦИЙ**

### ТРАДИЦИОННЫЕ ФОРУМЫ

- День сепсиса
- Клиническая цитология
- Этиология, диагностика и профилактика инфекционных заболеваний
- Лабораторная диагностика социально значимых инфекций
- Обращение медицинских изделий in vitro
- Экономика и организация лабораторной службы
- Медицина 5П
- Молекулярно-генетическая лабораторная диагностика в онкологии

### НОВЫЕ ТЕМАТИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЕНИЯ

- Цифровая медицина. Big data и системы поддержки врачебных решений
- Стандартизация и гармонизация – путь к сопоставимости результатов исследований. Где мы сейчас?
- Хромато-масс-спектрометрия – ключ к решению сложных диагностических задач
- Мужское здоровье и новые маркеры в клинической практике уролога

### КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ КОНФЕРЕНЦИИ

Лабораторная диагностика в клинической практике:

- Кардиология
- Эндокринология
- Гематология
- Урология
- Дерматовенерология
- Орфанные заболевания

### IV МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА «ЛАБОРАТОРНЫЙ ГОРОД»

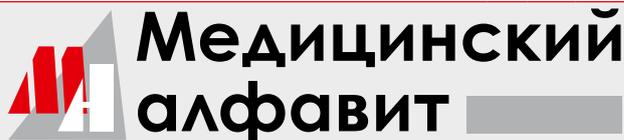
- ПОСТЕРНАЯ ЗОНА
- ГАЛЕРЕЯ ART LAB – специальные арт-зоны (музей, художественные выставки)
- ФОТОВЫСТАВКА «Израиль глазами российских лабораторных работников», «Лабораторный город и его жители»
- МУЗЫКА И ИСКУССТВО

### СПЕЦИАЛЬНЫЕ ПРОЕКТЫ

- ДЕНЬ ИЗРАИЛЯ
- ПРЕМИЯ В ОБЛАСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ им. В. В. МЕНЬШИКОВА
- КОНКУРС ДЛЯ ЖУРНАЛИСТОВ «СПЕКТР»



## БЛАНК-ЗАКАЗ на подписку на журнал 2018 год



Название организации (или Ф.И.О.) \_\_\_\_\_

Адрес (с почтовым индексом) \_\_\_\_\_

Телефон: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_ Контактное лицо: \_\_\_\_\_

- «Медицинский алфавит». Серия «Стоматология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Современная лаборатория» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Эпидемиология и гигиена» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Больница» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Неотложная медицина» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Диагностика и онкотерапия» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Современная поликлиника» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Кардиология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Практическая гастроэнтерология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Неврология и психиатрия» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Современная гинекология» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Современная функциональная диагностика» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)
- «Медицинский алфавит». Серия «Артериальная гипертензия» — 4 выпуска в год (1 600 руб. в год)

Наш индекс в каталоге  
«РОСПЕЧАТЬ» 36228

Извещение	<b>ООО «Альфмед»</b> (наименование получателя платежа) 7716213348 (ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773 (номер счета получателя платежа) ПАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА (наименование банка и банковские реквизиты) К/с 3010181040000000225 БИК 044525225 Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2018 год (наименование платежа)
	Дата _____ Сумма платежа _____ Плательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____
Квитанция	<b>ООО «Альфмед»</b> (наименование получателя платежа) 7716213348 (ИНН получателя платежа) Рс № 40702810738090108773 (номер счета получателя платежа) ПАО «СБЕРБАНК РОССИИ» г. МОСКВА (наименование банка и банковские реквизиты) К/с 3010181040000000225 БИК 044525225 Годовая подписка на журнал «Медицинский алфавит. _____» на 2018 год (наименование платежа)
	Дата _____ Сумма платежа _____ Плательщик (подпись) _____ Адрес доставки: _____

### Как подписаться

1. Заполнить прилагаемый бланк-заказ и квитанцию об оплате. 2. Оплатить квитанцию в любом отделении Сбербанка у кассира с получением кассового чека. Журналы высылаются по указанному в квитанции или бланке адресу. 3. Отправить бланк-заказ и скан квитанции с кассовым чеком, выданным кассиром банка на e-mail: medalfavit\_pr@bk.ru, или podpiska.ma@mail.ru. Оплата через банки-онлайн издательством временно не принимается и будет возвращена на Ваш счет.



# ЭКОлаб

ISO 9001:2015, 13485:2003

142530, РФ, Московская обл.,  
г. Электрогорск, ул. Буденного, д.1  
тел: 8-800-333-17-45

(звонок из регионов России бесплатный)

+7 (495) 287-44-48, 287-44-49

+7 (49643) 3-23-11, 3-30-85, 3-30-93

e-mail: [ekolab-sbyt@mail.ru](mailto:ekolab-sbyt@mail.ru)

<http://www.ekolab.ru>

*Верная диагностика-  
качественное лечение!*

## Реагент «Кровь баранья дефибрированная для питательных сред, стерильная»

Комплект №1

"Кровь баранья дефибрированная для питательных сред, стерильная"

Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03081 от 30.07.2008

Каталожный номер 50.99

Реагент представляет собой кровь барана, взятую стерильно, дефибрированную и профильтрованную через стерильный трехслойный марлевый фильтр. Непрозрачная жидкость ярко-красного цвета, разделяющаяся при стоянии на рыхлый ярко-красный осадок и прозрачную желтовато-розового цвета надосадочную жидкость.

**НАЗНАЧЕНИЕ:** Обогащение бактериологических питательных сред; определение гемолитической активности микроорганизмов.

**ФОРМА ВЫПУСКА:** По 50 или 100 мл в стеклянных флаконах (бутылках) вместимостью 100 мл, укупоренных резиновыми пробками и завальцованными металлическими колпачками. Флакон (бутылку) с инструкцией по применению помещен в коробку из картона или в пакет из полиэтиленовой пленки.

**ХРАНЕНИЕ:** В упаковке предприятия-изготовителя в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.124803. Замораживание не допускается.

**ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ:** При температуре от 2 °С до 8 °С в соответствии с СП 3.3.2.1248-03. Замораживание не допускается. Допускается транспортирование при температуре от 9 °С до 25 °С в течение 24 ч. На дальние расстояния - только авиатранспортом.

**СРОК ГОДНОСТИ:** Срок годности реагента - 14 сут. Реагент с истекшим сроком годности применению не подлежит.





## ЛАБОРАТОРНАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА

### ТЕХНОЛОГИЯ УСПЕХА



117519, г. Москва, Варшавское шоссе, д. 132  
Тел.: (495) 314-29-24, 314-71-30, факс 315-63-84  
E-mail: [marketing@altey.ru](mailto:marketing@altey.ru)  
[www.altey.ru](http://www.altey.ru)